

Nghiên cứu ảnh hưởng của các hợp chất cao phân tử ngoại bào từ vi khuẩn lactic lên đáp ứng miễn dịch của tôm Sú (*Penaeus monodon*)

Trương Tiến Công^{1*}, Nguyễn Minh Chơn¹, Nguyễn Hữu Thanh²,
Nguyễn Phú Thọ², Trịnh Thị Lan², Nguyễn Hữu Yên Nhi², Nguyễn Thị Thúy Hằng²

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ, Khu II, đường 3/2, phường Xuân Khánh, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ, Việt Nam

²Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 18 đường Ung Văn Khiêm, phường Đồng Xuyên, TP Long Xuyên, tỉnh An Giang, Việt Nam

Ngày nhận bài 25/10/2021; ngày chuyển phản biện 28/10/2021; ngày nhận phản biện 7/12/2021; ngày chấp nhận đăng 10/12/2021

Tóm tắt:

Các hợp chất cao phân tử ngoại bào (EPS - Extracellular polymeric substances) được biết đến là một hợp chất có khả năng như prebiotic để thúc đẩy sự phát triển của vi khuẩn có lợi trong đường ruột của người và động vật. Để chứng minh tiềm năng prebiotic của các EPS được sản xuất từ vi khuẩn lactic, *Lactobacillus plantarum* và *Bifidobacterium bifidum*, nghiên cứu này đã đánh giá ảnh hưởng của các vi khuẩn trên với đáp ứng miễn dịch ở tôm khi lây nhiễm với vi khuẩn gây bệnh *Vibrio parahaemolyticus*. Kết quả cho thấy, khẩu phần ăn có bổ sung các loại EPS khác nhau đã kích thích miễn dịch của tôm Sú đối với bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND - Acute hepatopancreatic necrosis disease), hay còn gọi là hội chứng chết sớm (EMS - Early mortality syndrome) ở tôm do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây ra. Việc bổ sung EPS vào thức ăn của tôm đã làm tăng đáng kể tổng số lượng bạch cầu, hoạt tính suy hô hấp cấp, hoạt tính của phenoloxidase (PO) và superoxide dismutase. Kết quả nghiên cứu cho thấy, EPS do vi khuẩn lactic sản xuất thể hiện tiềm năng như prebiotic, có thể trở thành giải pháp thay thế việc sử dụng kháng sinh trong nuôi tôm nhằm gây ức chế sự phát triển của mầm bệnh.

Từ khóa: *Bifidobacterium bifidum*, lactic, *Lactobacillus plantarum*, prebiotic, tôm Sú, *Vibrio parahaemolyticus*.

Chỉ số phân loại: 4.5

1. Đặt vấn đề

Tôm biển, đặc biệt là tôm Sú chiếm tỷ trọng lớn trong ngành nuôi trồng giáp xác [1]. Tuy nhiên, những năm gần đây dịch bệnh trên tôm xuất hiện và bùng phát ngày càng nghiêm trọng đã gây thiệt hại lớn về kinh tế cho ngành nuôi tôm [2].

Các EPS của vi khuẩn với thành phần chính là các polysaccharide đã được sử dụng như một chất thay thế tự nhiên cho thuốc kháng sinh vì những lợi ích sức khỏe mà nó có thể mang lại [3]. Prebiotic là các thành phần không tiêu hóa có tác dụng thúc đẩy sự phát triển của vi khuẩn đường ruột một cách có chọn lọc và có khả năng kích thích hệ thống miễn dịch của động vật thủy sản [4]. Prebiotic được lên men bởi vi khuẩn lactic tạo ra các chất chuyển hóa khác nhau như axit béo mạch ngắn với các hoạt động chống viêm và điều hòa miễn dịch [5]. Như vậy, các EPS do vi khuẩn lactic sản xuất có tiềm năng như những prebiotic [6] có thể được sử dụng cho nuôi tôm.

Sản xuất EPS ở vi khuẩn lactic được kích thích bởi các điều kiện căng thẳng và gây sốc môi trường khác nhau như một phản ứng bảo vệ tế bào, cũng có thể tăng cường sự hình thành màng sinh học xung quanh tế bào [7]. EPS của vi khuẩn lactic thể hiện các hoạt tính sinh học đặc trưng như khả năng chống oxy hóa, kháng vi-rút, chống ung thư, chống viêm và điều hòa miễn dịch [8]. Với tiềm năng prebiotic của EPS, nghiên cứu đã đánh giá ảnh hưởng của khẩu phần ăn chứa các loại EPS được sản xuất bởi vi khuẩn lactic dưới các điều kiện sốc môi trường khác nhau nhằm kích thích miễn dịch đối với bệnh do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây ra ở tôm Sú.

*Tác giả liên hệ: Email: truongtiencong68@gmail.com

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Chuẩn bị EPS của vi khuẩn

Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* VAL6 và *Bifidobacterium bifidum* VAR2 được nuôi cấy trong môi trường de Man, Rogosa và Sharpe (MRS broth) dưới các điều kiện sốc nhiệt và tăng nồng độ CO₂. Trong mỗi điều kiện, EPS được chiết xuất theo phương pháp được mô tả bởi N. Salazar và cs (2009) [9] và H.T. Nguyen và cs (2014) [10]. Kết quả 4 loại EPS đã được thu thập từ các điều kiện sốc môi trường được trình bày ở bảng 1. Hai mẫu EPS thương mại được sử dụng để so sánh là 1,3-β glucan (Sigma-Aldrich) và Immuno-LP20 (Japan), được đặt tên là Glucan và LP20.

Bảng 1. EPS sản xuất từ các điều kiện khác nhau.

Vi khuẩn	Điều kiện stress kích thích	Loại EPS
<i>L. plantarum</i>	42°C, 3 giờ	EPS <i>L. plantarum</i> temperature (EPS LPn)
<i>L. plantarum</i>	CO ₂ , 24 giờ	EPS <i>L. plantarum</i> CO ₂ (EPS LPc)
<i>B. bifidum</i>	42°C, 3 giờ	EPS <i>B. bifidum</i> temperature (EPS BFn)
<i>B. bifidum</i>	CO ₂ , 24 giờ	EPS <i>B. bifidum</i> CO ₂ (EPS BFc)

2.2. Chuẩn bị thức ăn thí nghiệm

Bổ sung lần lượt 4 g BFc, BFn, LPc, LPn, Glucan, LP 20 trong 1 kg thức ăn ban đầu (thành phần: 40% đậm, 4% chất béo, 11% độ ẩm, 13% tro, 3% xơ thô). Nghiền nát và trộn đều để được hỗn hợp thức ăn tôm có bổ sung 0,4% prebiotic.

Effect of extracellular macromolecules from lactic acid bacteria on the immune response of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

Tien Cong Truong^{1*}, Minh Chon Nguyen¹,
Huu Thanh Nguyen², Phu Tho Nguyen²,
Thi Lan Trinh², Huu Yen Nhi Nguyen²,
Thi Thuy Hang Nguyen²

¹Institute of Biotechnology Research and Development, Can Tho University,
Area II, 3/2 Street, Xuan Khanh Ward, Ninh Kieu District, Can Tho City, Vietnam

²An Giang University, Vietnam National University, Ho Chi Minh City,
18 Ung Van Kiem Street, Dong Xuyen Ward, Long Xuyen City, An Giang Province, Vietnam

Received 25 October 2021; revised 7 December 2021; accepted 10 December 2021

Abstract:

Extracellular polymeric substances (EPS) are known as prebiotic-like compounds that promote the growth of beneficial bacteria in the intestinal tract of humans and animals. To demonstrate the prebiotic potential of EPSs produced from lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium bifidum*, this study demonstrated the influence of these bacteria on the immune response in shrimp to infection with pathogenic bacteria. *Vibrio parahaemolyticus* disease. The results showed that the diet supplemented with different types of EPS stimulated immunity of black tiger shrimp against acute hepatopancreatic necrosis disease, also known as early mortality syndrome in shrimp caused by *Vibrio parahaemolyticus*. The addition of EPS to shrimp feed significantly increased total white blood cell count, respiratory burst activity, phenoloxidase and superoxide dismutase activity. The study results show that EPS produced by lactic acid bacteria shows potential as a prebiotic, which can become an alternative to the use of antibiotics in shrimp farming to inhibit the growth of pathogens.

Keywords: *Bifidobacterium bifidum*, Black tiger shrimp, lactic acid, *Lactobacillus plantarum*, prebiotic, *Vibrio parahaemolyticus*.

Classification number: 4.5

2.3. Bố trí thí nghiệm xác định các chỉ tiêu miễn dịch của tôm Sú

Tôm Sú thử nghiệm có trọng lượng trung bình $5,45 \pm 0,02$ g được thu mua từ các trại sản xuất giống ở Kiên Giang, Việt Nam. Tôm được thích nghi và cho ăn với khẩu phần cơ bản 2 lần/ngày trong 7 ngày trong bể nuôi composite ở điều kiện phòng thí nghiệm (độ mặn là 25‰ và nhiệt độ là $27 \pm 2^\circ\text{C}$). Sau khi thích nghi, tôm được bố trí ngẫu nhiên vào 24 bể nuôi (500 l, diện tích đáy tròn 1 m²) với mật số ban đầu 30 con/bể. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 8 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức được lặp lại

3 lần. Các thí nghiệm cho ăn bao gồm đối chứng âm (khẩu phần cơ bản và không cảm nhiễm vi khuẩn gây bệnh), đối chứng dương (khẩu phần cơ bản và được cảm nhiễm vi khuẩn gây bệnh), nhóm khẩu phần bổ sung Glucan (khẩu phần cơ bản có bổ sung 1,3-β glucan với lượng 3 g/kg thức ăn và được cảm nhiễm vi khuẩn gây bệnh), nhóm khẩu phần bổ sung LP20 (khẩu phần cơ bản có bổ sung LP20 với lượng 1 g/kg thức ăn và được cảm nhiễm vi khuẩn gây bệnh) và 4 nhóm khẩu phần bổ sung EPS (khẩu phần cơ bản được bổ sung LPn, LPc, BFn, BFc với lượng 4 g/kg thức ăn và được cảm nhiễm vi khuẩn gây bệnh).

Trong quá trình thử nghiệm, tôm được cho ăn với khẩu phần thí nghiệm 5-6% trọng lượng cơ thể, 5 lần mỗi ngày vào lúc 7, 10, 13, 17 và 21 giờ. Nhiệt độ nước duy trì ở $29 \pm 1^\circ\text{C}$, độ mặn là $25 \pm 0,5$ ‰, hàm lượng NH_4^+ là $0,05 \pm 0,005$ mg/l và độ pH là $8,0 \pm 0,2$.

2.4. Cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*

Cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* được thực hiện sau 2 tuần thử nghiệm cho ăn. *V. parahaemolyticus* được nuôi cấy qua đêm ở 28°C trong môi trường Thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS broth). Vi khuẩn được định lượng bằng cách trải trên đĩa thạch chứa môi trường TCBS, sau đó dịch được nuôi cấy đến mật số 10^7 CFU/ml. Quá trình cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* được thực hiện bằng cách bổ sung trực tiếp vi khuẩn vào bể nuôi tôm ở mật số $5,0 \times 10^4$ CFU/ml, bể nuôi được lấy đi thức ăn thừa và nước được làm sạch phân mỗi ngày. Nhóm nghiên cứu đã khảo sát các bể nuôi thực nghiệm được bổ sung một lượng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* tương ứng với các nồng độ 5×10^3 , 5×10^4 và 5×10^5 CFU/ml, quan sát, ghi nhận lượng tôm Sú chết theo thời gian. Kết quả nghiên cứu cho thấy, ở nồng độ vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây cảm nhiễm cao 5×10^5 CFU/ml lượng tôm Sú chết rất nhanh và chết hết trong 24 giờ sau khi gây cảm nhiễm, tỷ lệ tôm còn sống giảm dần và bằng 0 sau 24 giờ gây cảm nhiễm. Ngược lại, ở nồng độ vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây cảm nhiễm là 5×10^3 CFU/ml tỷ lệ tôm Sú còn cao và duy trì ở mức 100% sau 16 giờ đầu, sau đó tỷ lệ sống có giảm và duy trì được tỷ lệ tôm còn sống ở mức 70%. Trong khi đó, nồng độ vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây cảm nhiễm là 5×10^4 CFU/ml làm tỷ lệ tôm sống giảm còn 20% sau 60 giờ gây cảm nhiễm. Qua đó cho thấy, *V. parahaemolyticus* là chủng có khả năng gây bệnh cho tôm ở các mật số cảm nhiễm khác nhau sẽ ảnh hưởng đến tỷ lệ sống và thời gian duy trì số lượng sống sót làm cơ sở cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.5. Phân tích miễn dịch của tôm

Để tiến hành phân tích miễn dịch của tôm, ở mỗi thí nghiệm tiến hành thu 3 con/bể/nghiệm thức. Các thông số miễn dịch của tôm được xác định trước khi gây nhiễm và ở 1, 3, 6 và 9 ngày sau khi cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*. Tổng số bạch cầu được đếm theo phương pháp được mô tả bởi C.H. Chiu và cs (2007) [11].

Hoạt tính PO được xác định dựa theo phương pháp của J. Hernández-López và cs (1996) [12] sử dụng L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) với sự có mặt của cacodylate.

Hoạt tính suy hô hấp cấp (RES - respiratory burst) được xác định bằng cách khử nitroblue tetrazolium (NBT) thành formazan, như một biện pháp tạo thành anion superoxide [13].

Hoạt tính superoxide dismutase (SOD) được xác định dựa theo phương pháp của C. Beauchamp và cs (1971) [14] sử dụng nitroblue tetrazolium (NBT) với sự có mặt của riboflavin.

2.6. Phương pháp phân tích thống kê

Sử dụng Excel để nhập, lưu trữ số liệu và sử dụng phần mềm Minitab 16 để thống kê so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức bằng phép thử Tukey với độ tin cậy 95%.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của EPS lên tổng số tế bào bạch cầu trong máu của tôm Sú

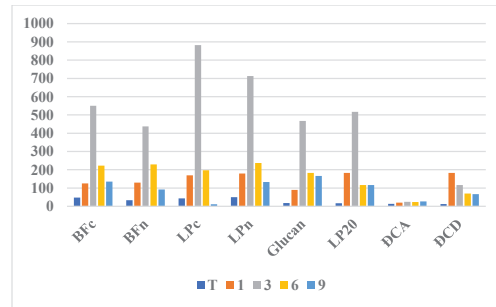
Các chất kích thích miễn dịch như β -glucan và các prebiotic có khả năng kích thích quá trình melanin hóa và quá trình thực bào thông qua sự nhận biết bởi các protein đặc biệt như LGBP (lipopolysaccharide và β -1,3-glucan-binding protein) và β GBP (β -glucan-binding protein) trên tế bào bạch cầu. Do đó, nghiên cứu đã phân tích tổng số tế bào bạch cầu trong máu của tôm và kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của EPS lên tổng số bạch cầu trước và sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.

Nghiệm thức	Thời gian (ngày)				
	T	1	3	6	9
BFc	47,50 ^a	125,00 ^a	550,00 ^b	222,50 ^a	135,00 ^a
BFn	32,92 ^a	129,58 ^a	437,50 ^b	229,17 ^a	91,67 ^a
LPc	42,92 ^a	169,17 ^a	881,67 ^a	197,50 ^a	105,83 ^a
LPn	50,00 ^a	179,17 ^a	713,33 ^{ab}	236,67 ^a	132,50 ^a
Glucan	18,33 ^b	90,00 ^b	466,67 ^b	183,33 ^a	166,67 ^a
LP20	16,67 ^b	183,33 ^a	516,67 ^b	116,67 ^a	116,67 ^a
ĐCA	13,67 ^c	20,00 ^c	25,00 ^d	23,33 ^a	26,67 ^c
ĐCD	12,00 ^c	183,33 ^a	116,67 ^c	70,00 ^b	66,67 ^b

T: trước khi cảm nhiễm; giá trị trung bình với các chữ cái theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) theo phép thử Tukey. Đơn vị bảng: 10^3 tế bào/ml.

Theo kết quả ở bảng 2, trước khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*, tôm Sú ở các nghiệm thức bổ sung EPS có tổng số tế bào bạch cầu dao động trong khoảng $32,92-50,00 \times 10^3$ tế bào/ml, khác biệt không có ý nghĩa so với các nghiệm thức bổ sung prebiotic thương mại và đối chứng. Đáng chú ý, ở nghiệm thức bổ sung LPc và LPn (EPS được sản xuất bởi *L. plantarum*) có tổng số bạch cầu cao nhất (đạt $713,33-881,67 \times 10^3$ tế bào/ml) và khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$) (hình 1).



Hình 1. Ảnh hưởng của EPS lên tổng số bạch cầu của tôm Sú.

3.2. Ảnh hưởng của EPS lên hoạt tính PO trong máu của tôm Sú

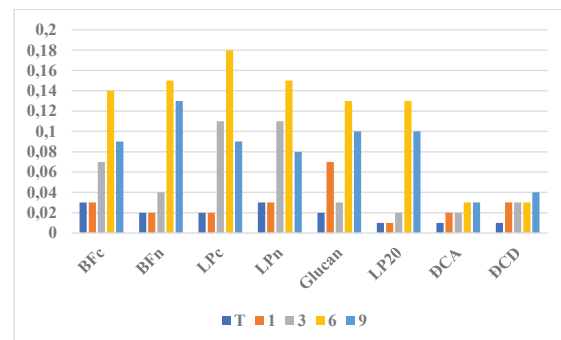
Ảnh hưởng của EPS lên hoạt tính PO trong máu của tôm Sú được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của EPS đến hoạt tính PO (490 nm) của tôm Sú trước và sau khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*.

Nghiệm thức	Thời gian (ngày)				
	T	1	3	6	9
BFc	0,03 ^a	0,03 ^{ab}	0,07 ^a	0,14 ^a	0,09 ^a
BFn	0,02 ^{ab}	0,02 ^b	0,04 ^{ab}	0,15 ^a	0,13 ^a
LPc	0,02 ^{ab}	0,02 ^{ab}	0,11 ^a	0,18 ^a	0,09 ^a
LPn	0,03 ^a	0,03 ^{ab}	0,11 ^a	0,15 ^a	0,08 ^a
Glucan	0,02 ^{ab}	0,07 ^a	0,03 ^b	0,13 ^a	0,10 ^a
LP20	0,01 ^b	0,01 ^b	0,02 ^b	0,13 ^a	0,10 ^a
ĐCA	0,01 ^b	0,02 ^{ab}	0,02 ^b	0,03 ^b	0,03 ^b
ĐCD	0,01 ^b	0,03 ^{ab}	0,03 ^b	0,03 ^b	0,04 ^b

T: trước khi cảm nhiễm; trong cùng một cột, giá trị trung bình với các chữ cái theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Đánh giá ảnh hưởng của khẩu phần chứa EPS lên hoạt tính PO cho thấy, khẩu phần ăn chứa EPS có thể kích thích làm tăng hoạt tính PO của máu tôm Sú và kết quả khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ($p < 0,05$). Hoạt tính PO sau khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* đạt cao nhất ở nhóm bổ sung EPS được sản xuất bởi *L. plantarum* (LPc và LPn). Tuy nhiên, không giống như tổng số tế bào bạch cầu, kết quả ghi nhận hoạt tính PO được tăng cường mạnh mẽ vào ngày thứ 6 và giảm vào ngày thứ 9 sau khi cảm nhiễm (bảng 3, hình 2).



Hình 2. Ảnh hưởng của prebiotic đến hoạt tính PO của tôm Sú.

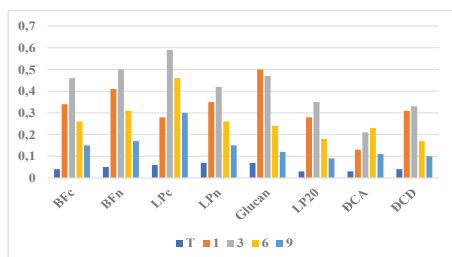
3.3. Ảnh hưởng của EPS lên hoạt tính RES trong máu của tôm Sú

Bảng 4. Ảnh hưởng của EPS đến hoạt tính RES của tôm sú trước và sau khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*.

Thí nghiệm thức	Thời gian (ngày)				
	T	1	3	6	9
BFC	0,04 ^a	0,34 ^a	0,46 ^a	0,26 ^b	0,15 ^b
BFn	0,05 ^a	0,41 ^a	0,50 ^a	0,31 ^{ab}	0,17 ^b
LPc	0,06 ^a	0,28 ^a	0,59 ^a	0,46 ^a	0,30 ^a
LPn	0,07 ^a	0,35 ^a	0,42 ^a	0,26 ^b	0,15 ^b
Glucan	0,07 ^a	0,50 ^a	0,47 ^a	0,24 ^b	0,12 ^b
LP20	0,03 ^a	0,28 ^a	0,35 ^b	0,18 ^b	0,09 ^b
DCA	0,03 ^a	0,13 ^b	0,21 ^c	0,23 ^b	0,11 ^b
ĐCD	0,04 ^a	0,31 ^a	0,33 ^b	0,17 ^b	0,10 ^b

T: trước khi cảm nhiễm; giá trị trung bình với các chữ cái theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả bảng 4 cho thấy, hoạt tính RES thay đổi theo chiều hướng tăng dần từ trước và sau cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*. Đến ngày thứ 3, hoạt tính RES đạt cao nhất ở nhóm bổ sung EPS được sản xuất bởi *L. plantarum* (LPn và LPc) từ 0,42 đến 0,59. Đến ngày thứ 6 và thứ 9 thì giá trị trung bình hoạt tính RES của thí nghiệm LPc khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các thí nghiệm thức còn lại và các đối chứng ($p < 0,05$) (hình 3).



Hình 3. Ảnh hưởng của probiotic đến hoạt tính RES của tôm Sú.

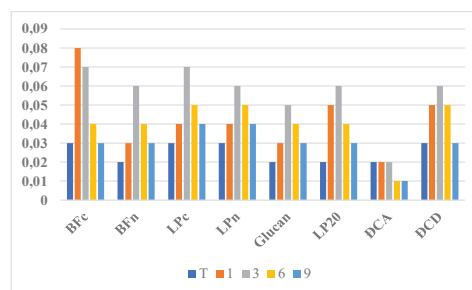
3.4. Ảnh hưởng của EPS lên hoạt tính SOD trong máu của tôm Sú

Bảng 5. Ảnh hưởng của probiotic đến hoạt tính SOD của tôm Sú trước và sau khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*.

Thí nghiệm thức	Thời gian (ngày)				
	T	1	3	6	9
BFC	0,03 ^a	0,08 ^a	0,07 ^a	0,04 ^a	0,03 ^a
BFn	0,02 ^a	0,03 ^a	0,06 ^a	0,04 ^a	0,03 ^a
LPc	0,03 ^a	0,04 ^a	0,07 ^a	0,05 ^a	0,04 ^a
LPn	0,03 ^a	0,04 ^a	0,06 ^a	0,05 ^a	0,04 ^a
Glucan	0,02 ^a	0,03 ^a	0,05 ^a	0,04 ^a	0,03 ^a
LP20	0,02 ^a	0,05 ^a	0,06 ^a	0,04 ^a	0,03 ^a
DCA	0,02 ^a	0,02 ^b	0,02 ^b	0,01 ^b	0,01 ^b
ĐCD	0,03 ^a	0,05 ^a	0,06 ^a	0,05 ^a	0,03 ^a

T: trước khi cảm nhiễm; giá trị trung bình với các chữ cái theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

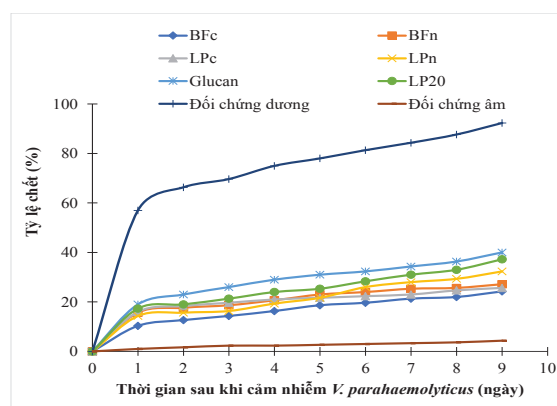
Kết quả bảng 5 và hình 4 cho thấy, hoạt tính SOD cũng có xu hướng tăng sau 3 ngày cảm nhiễm vi khuẩn gây bệnh, sau đó giảm vào ngày thứ 6 và 9. Nhóm khẩu phần bổ sung EPS từ LAB có hoạt tính SOD dao động 0,06-0,07, cao hơn so với sản phẩm thương mại và nhóm đối chứng. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).



Hình 4. Ảnh hưởng của probiotic đến hoạt tính SOD của tôm Sú.

3.5. Tỷ lệ chết của tôm Sú

Theo dõi tỷ lệ chết của tôm sau khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* cho thấy, việc áp dụng chế độ ăn có bổ sung LPn, LPc, BFn, BFC, Glucan và LP20 đã làm giảm đáng kể ($p < 0,05$) tỷ lệ chết của tôm so với đối chứng. Sau 9 ngày cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*, tỷ lệ chết tích lũy ở các nhóm LPn, LPc, BFn và BFC dao động từ 24 đến 32%. Tỷ lệ chết lần lượt là 37 và 40% ở các thí nghiệm thức bổ sung LP20 và Glucan. Trong khi đó, tỷ lệ chết của đối chứng dương là 92,3% (hình 5).



Hình 5. Tỷ lệ chết của tôm Sú sau khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*.

4. Bàn luận

Tăng tổng số bạch cầu giúp tăng cường khả năng miễn dịch ở động vật giáp xác. Bạch cầu là nhân tố chính gây ra các phản ứng miễn dịch tế bào (nhận biết, thực bào và melanin hóa) ở tôm [15]. Giảm và tăng tổng số bạch cầu sau khi nhiễm vi khuẩn có thể xảy ra nhanh chóng do nỗ lực bảo vệ của cơ thể. Thực tế kết quả nghiên cứu hiện tại cũng đã chứng minh tổng số tế bào bạch cầu tăng mạnh vào ngày thứ 3 sau khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* nhưng sau đó lại giảm vào ngày thứ 6 và 9.

Hoạt tính RES có liên quan đến hoạt động thực bào và chúng được theo dõi để xác định mức độ bảo vệ của cơ thể liên quan đến hoạt động của anion superoxide (O_2^-), được đặc trưng bởi khả năng tế bào máu giảm NBT (nitrobluetetrazolium). Kết quả nghiên cứu đã chứng minh khẩu phần ăn chứa EPS có thể làm tăng hoạt tính RES trong máu của tôm Sú.

PO là một enzyme của cơ chế bảo vệ của động vật giáp xác, là tác nhân dẫn đến sự melamin hoá các tế bào lạ để làm bất hoạt chúng và ngăn chặn sự lây lan của chúng khắp cơ thể. Sự gia tăng hoạt động PO trong các nghiệm thức bổ sung EPS càng khẳng định tác dụng có lợi của EPS từ vi khuẩn lactic đối với hệ thống miễn dịch của tôm.

SOD là một trong những enzyme bảo vệ chống oxy hóa chính được tạo ra để phản ứng với stress oxy hóa [16]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, mức độ SOD trong các nhóm tôm thí nghiệm đã tăng lên không đáng kể so với nhóm đối chứng trước và sau thí nghiệm cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*. Kết quả này cho thấy, khả năng kích thích hoạt tính SOD phụ thuộc vào đặc điểm polysaccharide được sử dụng.

Tỷ lệ chết của tôm Sú tích lũy sau khi cảm nhiễm mầm bệnh phản ánh trực tiếp tình trạng sức khỏe của tôm và hiệu suất phản ứng miễn dịch. *V. parahaemolyticus* có thể gây ra bệnh hoại tử gan tụy cấp tính, hay còn gọi là hội chứng chết sớm ở tôm [17]. Trong nghiên cứu này, sau khi gây nhiễm với *V. parahaemolyticus*, tỷ lệ chết của tôm Sú được cho ăn EPS thấp hơn đáng kể so với đối chứng nhờ bổ sung EPS trong khẩu phần ăn.

Trong nghiên cứu này, EPS được sản xuất bởi vi khuẩn lactic đã được chứng minh là có thể kích thích hoặc điều chỉnh nhanh chóng các đáp ứng miễn dịch và điều này cho thấy rằng, EPS sản xuất từ vi khuẩn lactic có khả năng miễn dịch giúp tôm Sú chống lại các bệnh do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây ra.

5. Kết luận

2 loại EPS là LPn (được sản xuất bởi vi khuẩn lactic bằng cách gây stress nhiệt 42°C, 3 giờ) và LPc (được sản xuất bởi vi khuẩn lactic bằng cách gây stress CO_2 , 24 giờ) có khả năng tăng cường miễn dịch của tôm Sú chống lại *V. parahaemolyticus*. Trong đó, khẩu phần ăn bổ sung 2 loại EPS được sản xuất bởi vi khuẩn *L. plantarum* là LPn và LPc giúp kích thích mạnh khả năng miễn dịch ở tôm Sú. Các thông số miễn dịch như: tổng số bạch cầu, hoạt tính PO_2 , RES và SOD của LPn và LPc cho kết quả tương tự các sản phẩm đã được sản xuất thương mại như Glucan và LP20. Khả năng kích thích miễn dịch của tôm Sú bởi EPS làm giảm đáng kể tỷ lệ chết của tôm sau khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*.

Những kết quả này cho thấy, EPS sản xuất từ vi khuẩn lactic khi được bổ sung vào thức ăn có vai trò là chất kích thích miễn dịch giúp tôm kháng lại bệnh do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây ra.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] G. Bardera, N. Usman, M. Owen, et al. (2018), "The importance of behaviour in improving the production of shrimp in aquaculture", *Reviews in Aquaculture*, **11**(4), pp.1104-1132, DOI: 10.1111/raq.12282.

[2] D. Hou, Z. Huang, S. Zeng, et al. (2018), "Intestinal bacterial signatures of white feces syndrome in shrimp", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102**(8), pp.3701-3709, DOI: 10.1007/s00253-018-8855-2.

[3] P. Paul, S.K. Ramraj, Y. Neelakandan, et al. (2011), "Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro", *Bioresource Technology*, **102**(7), pp.4827-4833, DOI: 10.1016/j.biortech.2010.12.118.

[4] S. Sestito, E. D'Auria, M.E. Baldassarre, et al. (2020), "The role of prebiotics and probiotics in prevention of allergic diseases in infants", *Frontiers in Pediatrics*, **8**, DOI: 10.3389/fped.2020.583946.

[5] A. Nawaz, A. Javaid, S. Irshad, et al. (2018), "The functionality of prebiotics as immunostimulant: Evidences from trials on terrestrial and aquatic animals", *Fish & Shellfish Immunology*, **76**, pp.272-278, DOI: 10.1016/j.fsi.2018.03.004.

[6] S. Grosu-Tudor, M. Zamfir, R. Meulen, et al. (2013), "Prebiotic potential of some exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria", *Romanian Biotechnological Letters*, **18**(5), pp.8666-8676.

[7] D. Amund, L. Ouoba, J. Sutherland, et al. (2014), "Assessing the effects of exposure to environmental stress on some functional properties of *Bifidobacterium animalis* ssp. lactis", *Beneficial Microbes*, **5**(4), pp.461-469, DOI: 10.3920/BM2013.0099.

[8] K. Madhuri, K.V. Prabhakar (2014), "Microbial exopolysaccharides: Biosynthesis and potential applications", *Oriental Journal of Chemistry*, **30**(3), pp.1401-1410, DOI: 10.13005/ojc/300362.

[9] N. Salazar, P. Ruas-Madiedo, S. Kolida, et al. (2009), "Exopolysaccharides produced by *Bifidobacterium longum* IPLA E44 and *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis IPLA R1 modify the composition and metabolic activity of human faecal microbiota in pH-controlled batch cultures", *International Journal of Food Microbiology*, **135**(3), pp.260-267, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.017.

[10] H.T. Nguyen, H. Razafindralambo, C. Blecker, et al. (2014), "Stochastic exposure to sub-lethal high temperature enhances exopolysaccharides (EPS) excretion and improves *Bifidobacterium bifidum* cell survival to freeze-drying", *Biochemical Engineering Journal*, **88**, pp.85-94, DOI: 10.1016/j.bej.2014.04.005.

[11] C.H. Chiu, Y.K. Guu, C.H. Liu, et al. (2007), "Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*", *Fish Shellfish Immunol.*, **23**(2), pp.364-377, DOI: 10.1016/j.fsi.2006.11.010.

[12] J. Hernández-López, T. Gollas-Galván, F. Vargas-Albore (1996), "Activation of the phenoloxidase system of the brown shrimp *Penaeus californiensis* Holmes", *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **113**(1), pp.61-66, DOI: 10.1016/0742-8413(95)02033-0.

[13] K.L. Bell, V.J. Smith (1993), "In vitro superoxide production by hyaline cells of the shore crab *Carcinus maenas* (L.)", *Developmental & Comparative Immunology*, **17**(3), pp.211-219, DOI: 10.1016/0145-305X(93)90040-W.

[14] C. Beauchamp, I. Fridovich (1971), "Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels", *Analytical Biochemistry*, **44**(1), pp.276-287, DOI: 10.1016/0003-2697(71)90370-8.

[15] E. Bachère, Y. Gueguen, M. Gonzalez, et al. (2004), "Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: The penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*", *Immunological Reviews*, **198**(1), pp.149-168, DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.00115.x.

[16] C.H. Liu, S.P. Yeh, C.M. Kuo, et al. (2006), "The effect of sodium alginate on the immune response of tiger shrimp via dietary administration: Activity and gene transcription", *Fish & Shellfish Immunology*, **21**(4), pp.442-452, DOI: 10.1016/j.fsi.2006.02.003.

[17] U. Khimmakthong, P. Sukkarun (2017), "The spread of *Vibrio parahaemolyticus* in tissues of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* analyzed by PCR and histopathology", *Microbial Pathogenesis*, **113**, pp.107-112, DOI: 10.1016/j.micpath.2017.10.028.