

ẢNH HƯỞNG CỦA XẠ KHUẨN (*Streptomyces sampsonii*) LÊN KHẢ NĂNG KHÁNG VI KHUẨN VIBRIO VÀ MỘT SỐ CHỈ TIÊU MIỄN DỊCH CỦA TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*)

Nguyễn Thị Huệ Linh¹*, Nguyễn Thị Xuân Hồng¹, Nguyễn Đức Quỳnh Anh¹,

Nguyễn Nam Quang¹, Nguyễn Ngọc Phước¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu này bước đầu đánh giá ảnh hưởng của xạ khuẩn (*Streptomyces sampsonii*) lên khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio* và một số chỉ tiêu miễn dịch của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Tôm thí nghiệm (trọng lượng $2 \pm 0,3$ g/con) được cho ăn thức ăn công nghiệp có hoặc không bổ sung xạ khuẩn với hàm lượng lần lượt là 10^6 , 10^7 và 10^8 CFU/g thức ăn. Sau 14 ngày thử nghiệm cho ăn, máu tôm được thu để phân tích các chỉ tiêu miễn dịch và tôm thí nghiệm được cảm nhiễm với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* và *V. harveyi*. Kết quả sau khi cảm nhiễm với 2 chủng *Vibrio* gây bệnh, tỷ lệ chết cộng dồn của tôm sau 14 ngày cảm nhiễm ở các nghiệm thức thí nghiệm (20 - 24,4%) thấp hơn so với tôm ở nghiệm thức đối chứng (55,6 - 57,8%). Tổng số tế bào máu và hoạt tính của enzyme phenoloxidase của tôm cho ăn thức ăn chứa xạ khuẩn cao hơn ($p < 0,05$) so với tôm ở nghiệm thức đối chứng, trong đó tôm thí nghiệm với chế độ ăn có chứa hàm lượng xạ khuẩn 10^8 CFU/g thức ăn được ghi nhận có hiệu quả tốt hơn so với tôm ở các nghiệm thức khác. Tuy nhiên, hoạt tính enzyme lysozyme của tôm không khác nhau ở các nghiệm thức thí nghiệm và đối chứng ($p > 0,05$). Những kết quả đạt được trong nghiên cứu này bước đầu cho thấy chế phẩm sinh học chứa xạ khuẩn *S. sampsonii* có thể giúp tôm nuôi kháng lại vi khuẩn gây bệnh và đã làm tăng hoạt động miễn dịch của tôm thẻ chân trắng.

Từ khóa: *Streptomyces sampsonii*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. harveyi*, miễn dịch, tôm thẻ chân trắng.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Xạ khuẩn là giống vi khuẩn có khả năng sản xuất kháng sinh lớn nhất trong thế giới vi sinh vật được phát hiện cho đến nay. Mitra và cs (2008) chỉ ra rằng: cứ 1000 chủng xạ khuẩn được phân lập một cách ngẫu nhiên, thì khoảng 10 chủng sẽ sinh streptomycin và 4 chủng sẽ sinh tetracycline [1]. Xạ khuẩn là vi khuẩn sợi Gram dương, có mặt ở khắp nơi trong đất và đặc biệt có ý nghĩa với vai trò của chúng trong việc tái chế chất hữu cơ và sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học [2]. Việc phân lập xạ khuẩn từ trầm tích biển có thể tìm thấy được các xạ khuẩn mới với tiềm năng tạo ra các sản phẩm mới hữu ích. Theo Mohanraj & Sekar (2013), các chủng xạ khuẩn biển phân lập từ 28 điểm ở vịnh Bengal đều thuộc chi *Streptomyces*, trong đó 43 chủng có hoạt tính kháng khuẩn và 20 chủng có hoạt tính kháng nấm gây bệnh ở người [3]. Mặt khác, xạ khuẩn được biết đến như là nhà sản xuất của nhiều enzyme ngoại bào có đặc tính phân hủy polyme, bao gồm chitinase,

lipase và cellulase. Từ những đặc tính hữu ích trên, xạ khuẩn hiện đang được quan tâm và nghiên cứu như những chế phẩm sinh học tiềm năng sử dụng trong nuôi trồng thủy sản. Tan và cs (2016) đã tổng hợp các minh chứng cho thấy rằng xạ khuẩn có thể bảo vệ động vật thủy sản khỏi mầm bệnh thông qua việc sản xuất các hợp chất đối kháng khác nhau chống lại vi khuẩn Vibrio [4]. Một hợp chất chống virus chiết xuất từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces fradiae* đã được chứng minh có hiệu quả nâng cao tỷ lệ sống của tôm thẻ chân trắng khi tôm cảm nhiễm với hội chứng virus đốm trắng [5]. Chế phẩm sinh học xạ khuẩn có thể cải thiện chất lượng nước, giúp cân bằng hệ vi sinh vật, đẩy nhanh quá trình phân hủy các hợp chất hữu cơ trong đáy ao. Bên cạnh đó, xạ khuẩn phù hợp trở thành chế phẩm sinh học bởi vì xạ khuẩn có khả năng tồn tại trong điều kiện pH thấp của đường tiêu hóa và kháng với các enzyme đường ruột. Bản thân xạ khuẩn cũng là nguồn cung cấp protein tốt cho động vật thủy sản. Xạ khuẩn cũng có khả năng phân hủy tinh bột và casein và tạo ra các chất kháng khuẩn chống lại cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương [6], đặc biệt xạ khuẩn đã được chứng

¹ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

*Email: nguyenthihuylinh@huanf.edu.vn

minh khả năng đối kháng với *Vibrio* spp. gây bệnh cho tôm nuôi. Cụ thể, kết quả nghiên cứu của Babu và cs (2018) đã chứng minh hiệu quả cải thiện chất lượng môi trường nước cũng như bảo vệ tôm sú ấu trùng (*Penaeus monodon*) kháng lại virus đốm trắng của 5 dòng xạ khuẩn phân lập được [7]. Mazón-Suástegui và cs (2020) khi bổ sung *Streptomyces* spp. RL8 kết hợp với *Bacillus* spp. vào thức ăn đã cho hiệu quả kích thích hệ vi sinh vật có lợi trong đường ruột và bảo vệ tôm nuôi kháng lại với sự cảm nhiễm của *Vibrio parahaemolyticus* [8]. Do vậy, mục tiêu nghiên cứu này bước đầu đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm sinh học chứa xạ khuẩn *Streptomyces sampsonii* lên khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh *Vibrio* và các chỉ tiêu miễn dịch của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*), cung cấp cơ sở khoa học cho những nghiên cứu tiếp theo về ứng dụng chế phẩm này trong phòng và trị bệnh cho tôm nuôi.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Nguồn xạ khuẩn Streptomyces sampsonii

Xạ khuẩn *S. sampsonii* được phân lập từ lớp bùn đáy ở các ao nuôi tôm thẻ chân trắng, được lưu trữ và cung cấp từ Phòng thí nghiệm, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế. Chúng xạ khuẩn *S. sampsonii* được nuôi cấy trên môi trường thạch MT2 (tinh bột 10 g/L, nấm men 4 g/L, peptone 20 g/L, Agar 6 g/l) ở nhiệt độ 33°C trong 4 - 5 ngày. Sau đó, lấy khuẩn lạc rời trên đĩa thạch nuôi cấy tăng sinh trong 50 mL, 250 mL môi trường MT2 lỏng trong máy ủ lắc (Shaking incubator) (LM - 4200, Yinder, Trung Quốc) ở nhiệt độ 33°C, tốc độ 100 vòng/phút trong 4 - 5 ngày. Mật độ của *S. sampsonii* được xác định thông qua giá trị OD (optical density) bằng máy đo quang phổ (Spectrophotometer model 4111 RS, Zuzi, Tây Ban Nha) ở bước sóng 620 nm, giá trị OD₆₂₀ = 1 tương đương 10⁸ CFU/mL (số liệu từ khảo nghiệm thực tế, không công bố).

2.1.2. Phương pháp phối trộn dung dịch chứa xạ khuẩn vào thức ăn

Từ dung dịch chứa xạ khuẩn *S. sampsonii* (10⁸ CFU/mL) tiếp tục pha loãng để đạt được các dung dịch chứa mật độ *S. sampsonii* lần lượt là 10⁶, 10⁷ CFU/mL. Phối trộn các dung dịch này với thức ăn công nghiệp (Goal Plus 8604, Công ty Cổ phần Chăn nuôi CP Việt Nam, tổng hàm lượng protein 46%, kích cỡ <1,2 mm) để đạt được các mật độ cuối cùng lần

lượt là 10⁶, 10⁷, 10⁸ CFU/g thức ăn, để khô ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ. Thức ăn sau phối trộn được lưu giữ ở nhiệt độ 4°C và dùng để sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.

2.2. Tôm thí nghiệm

Tôm thẻ chân trắng (*L. vannamei*) được cung cấp từ trại nuôi tôm tại xã Phú Thuận, Thừa Thiên - Huế với số lượng 1.200 con, khối lượng cơ thể trung bình 2 ± 0,3 g/con, tôm đã qua kiểm dịch không mang các mầm bệnh đốm trắng, bệnh đầu vàng, bệnh hoại tử cơ quan tạo máu và cơ quan biểu mô và bệnh hoại tử gan tụy cấp tính bởi Trạm xá thú y (Chi cục Chăn nuôi, Thú y Thừa Thiên - Huế). Tôm được nuôi thuần 14 ngày trong bể composite (kích thước 1 x 1 x 1 m) trước khi tiến hành thí nghiệm. Nhiệt độ nước, độ mặn và oxy hòa tan của nước nuôi được duy trì trong khoảng tương ứng là 22 - 23°C, 30‰ và 5 - 6 mg/L. Tôm được cho ăn 3 lần/ngày với khẩu phần ăn 5% khối lượng cơ thể.

2.3. Bố trí thí nghiệm

Tôm thí nghiệm được bố trí với 4 nghiệm thức: 3 nghiệm thức thí nghiệm (nghiệm thức 1, 2 và 3) và nghiệm thức đối chứng. Tôm thí nghiệm được cho ăn (3 lần/ngày, 5% khối lượng cơ thể) thức ăn chứa xạ khuẩn *S. sampsonii* với 3 mật độ phối trộn lần lượt là 10⁶, 10⁷, 10⁸ CFU/g thức ăn. Mỗi nghiệm thức được lặp lại ba lần. Tôm thí nghiệm được bố trí trong các bể nhựa có dung tích 120 L, mỗi bể chứa 100 con tôm/bể. Thí nghiệm cho ăn được tiến hành trong 14 ngày.

2.4. Thí nghiệm cảm nhiễm

Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi* phân lập được từ tôm nuôi bị bệnh AHPND và phát sáng tại tỉnh Thừa Thiên - Huế, được lưu trữ và cung cấp từ Phòng thí nghiệm, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế. Vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường thạch TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts, Himedia, Ấn Độ). Lấy 1 khuẩn lạc của mỗi loại vi khuẩn và nuôi cấy tăng sinh trong 10 mL môi trường TSB (Tryptone Soya Broth, Himedia, Ấn Độ) chứa 2% NaCl ở 28°C trong 24 giờ. Sau đó, dung dịch vi khuẩn được li tâm với tốc độ 3.000 vòng trong 30 phút bằng máy ly tâm (Digisystem Laboratory Instruments Inc., Đài Loan (Trung Quốc)), loại bỏ phần dịch nổi và thu phần vi khuẩn. Cho 50 mL dung dịch nước muối sinh lý 0,85% NaCl vào để tạo huyền phù. Lấy 1 mL huyền phù vi khuẩn đo OD bằng máy

đo quang phổ (Spectrophotometer model 4111 RS, Zuzi, Tây Ban Nha) ở bước sóng 620 nm, giá trị $OD_{620} = 1$ tương đương 10^8 CFU/mL (số liệu từ khảo nghiệm thực tế, không công bố).

Sau 14 ngày cho ăn thức ăn có hoặc không bổ sung xạ khuẩn *S. sampsonii*, tôm ở mỗi bể thí nghiệm được cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi* ở liều Lethal dose 50 (LD_{50}) (15 con/bể $\times$ 12 bể/chúng vi khuẩn). Tôm ngâm trong 10 L nước biển có độ mặn 30‰ với mật độ của mỗi loại vi khuẩn *Vibrio* là $1,1 \times 10^6$ CFU/mL (Liều LD_{50} được xác định từ Phòng thí nghiệm Bệnh học thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm - Đại học Huế) ở $28 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 1 giờ. Sau đó, tôm tiếp tục được nuôi trong các bể nhựa 20 L để quan sát hàng ngày, theo dõi tỷ lệ sống và các hoạt động sống của tôm sau cảm nhiễm.

2.5. Phương pháp xác định các chỉ tiêu miễn dịch

Lấy 5 con tôm vào trước ngày thử nghiệm cho ăn (ngày 0) và 5 con/bể vào ngày 14 sau khi cho tôm ăn thức ăn có hoặc không có *S. sampsonii* để xác định các chỉ tiêu miễn dịch (tổng số tế bào máu, hoạt tính enzyme lysozyme, hoạt tính enzyme phenoloxidase, hoạt động thực bào). Dùng xilanh 1 ml đã chứa 400 μL dung dịch chống đông máu (29,22 mg NaCl; 3,8 mg ethylene glycol tetra-acetic acid; 2,38 mg Hepes ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$); 5 mg L-cystein, 1 L nước cất, pH 7,6) để lấy 200 μL máu từ gốc chân bò thứ 3 của tôm, cho vào ống eppendorf đã có 400 μL dung dịch chống đông máu và trộn đều, tổng tỷ lệ pha loãng của dung dịch máu tôm và dung dịch chống đông máu là 1 : 4. Máu tôm được chia thành nhiều phần và sử dụng để phân tích các chỉ tiêu miễn dịch khác nhau như sau:

2.5.1. Tổng số tế bào máu

Nhỏ 10 μL máu tôm ở trên cho vào buồng đếm hồng cầu Neubauer-improved, đếm số lượng tế bào máu bằng kính hiển vi quang học (Leica DMIL, Leica Microsystems, Wetzlar, Đức) với độ phóng đại 400x để xác định tổng số tế bào máu tôm theo công thức:

$$\text{Tổng số tế bào máu (tế bào / mL)} = \frac{\text{Tổng số tế bào máu đếm được} \times 10\,000}{\text{Số ô vuông đếm} \times \text{hệ số pha loãng}}$$

2.5.2. Hoạt tính enzyme lysozyme

Hoạt tính enzyme lysozyme của tôm được xác định theo phương pháp của Ellis (1990) [9]: lấy 500 μL dung dịch máu tôm ly tâm ở tốc độ 6.500 vòng/phút trong 2 phút. Loại bỏ phần dịch nổi, phần lắng ở dưới được trộn với 1 mL (0,02%) dung dịch

Micrococcus lysodeikticus (Sigma, St. Louis, MO, USA) ở nhiệt độ phòng. Đo mật độ quang học dung dịch ở bước sóng 530 nm sau 0,5 và 4,5 phút trên máy đo quang phổ (Spectrophotometer model 4111 RS, Zuzi, Tây Ban Nha). Một đơn vị hoạt động của enzyme lysozyme tạo ra tương đương với sự giảm độ hấp thụ $0,01 \text{ phút}^{-1}$ và được biểu thị là U (g/mL)^{-1} .

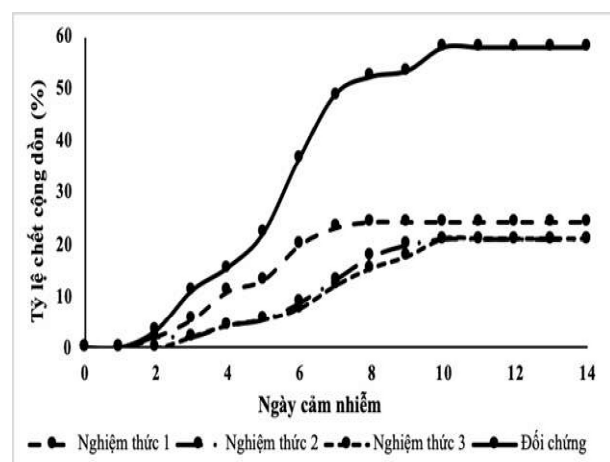
2.5.3. Hoạt tính enzyme phenoloxidase

Hoạt tính enzyme phenoloxidase được xác định bằng sự hình thành dopachrome từ L-DOPA (L-3, -4-dihydroxyphenylalanine, Sigma). Lấy 400 μL của dung dịch máu tôm ly tâm ở tốc độ 6.500 vòng/phút trong 2 phút ở nhiệt độ 4°C , loại bỏ phần dịch nổi, phần lắng dưới được rửa sạch và trộn nhẹ nhàng trong 400 μL dung dịch đệm cacodylate 0,1 M (natri cacodylate 10 mM, natri clorua 450 mM và trisodium citrat 100 mM; pH 7,0), sau đó tiếp tục ly tâm (10.000 vòng/phút, 10 phút, 4°C). Lấy 100 μL phần dịch nổi trộn với 100 μL trypsin 0,1% (hòa tan trong dung dịch đệm cacodylate 0,1 M) và ủ 10 phút ở 25°C . Sau đó, cho 100 μL L - DOPA (3 mg/mL cacodylate 0,1 M) vào và ủ 20 phút ở 25°C , tiếp theo bổ sung vào hỗn hợp 300 μL dung dịch đệm cacodylate 0,1 M. Hoạt tính enzyme phenoloxidase được xác định bằng máy đo quang phổ (Spectrophotometer model 4111 RS, Zuzi, Tây Ban Nha) tại bước sóng 490 nm.

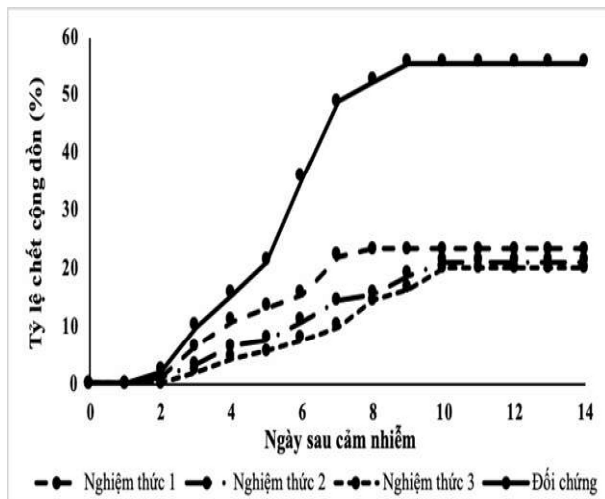
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thí nghiệm cảm nhiễm tôm thẻ chân trắng với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi*

Tỷ lệ chết cộng dồn của tôm ở các nghiệm thức thí nghiệm sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi* được thể hiện ở hình 1 và 2.



Hình 1. Tỷ lệ chết cộng dồn của tôm thẻ chân trắng ở các nghiệm thức thí nghiệm sau 14 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*



Hình 2. Tỷ lệ chết cộng dồn của tôm thẻ chân trắng ở các nghiệm thức thí nghiệm sau 14 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn *V. harveyi*

Kết quả tỷ lệ chết cộng dồn của tôm ở các nghiệm thức thí nghiệm 1, 2, 3 sau 14 ngày cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus* lần lượt là 24,4; 21,1 và 21,1% thấp hơn tôm ở nghiệm thức đối chứng là 57,8%. Tỷ lệ chết cộng dồn của tôm ở các nghiệm thức thí nghiệm 1, 2, 3 sau 14 ngày cảm nhiễm với *V. harveyi* lần lượt là 23,3; 21,1 và 20% thấp hơn tôm ở nghiệm thức đối chứng là 55,6%. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của García-Bernal và cs (2018) đã xác định rằng khi bổ sung chế phẩm sinh học chứa *Streptomyces* spp. vào thức ăn đã giúp tôm thẻ chân trắng (*L. vannamei*) có khả năng kháng lại *V. parahaemolyticus* [10]. Trước đó, Sugathan và cs (2015) cũng đã chứng minh khi cho tôm sú (*Penaeus monodon*) ăn thức ăn có bổ sung *Streptomyces* sp. MAPS15 trong 22 ngày đã hiệu quả nâng cao tỷ lệ sống của tôm ở nghiệm thức thí nghiệm cao hơn tôm ở nghiệm thức đối chứng sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi* [11].

3.2. Ảnh hưởng của xạ khuẩn *S. sampsonii* lên tổng số tế bào máu

Tổng số tế bào máu của tôm ở các nghiệm thức thí nghiệm sau 14 ngày cho ăn hoặc không cho ăn thức ăn có chứa xạ khuẩn *S. sampsonii* thể hiện ở bảng 1.

Sau 14 ngày thí nghiệm tổng số tế bào máu của tôm thẻ chân trắng ở nghiệm thức đối chứng ($2,1 \pm 0,4 \times 10^5$ tế bào/mL) thấp hơn tất cả các nghiệm thức có bổ sung xạ khuẩn *S. sampsonii* trong thức ăn ($p < 0,05$). Cụ thể tổng số tế bào máu của tôm thẻ

chân trắng ở nghiệm thức 1 là $2,7 \pm 0,2 \times 10^5$ tế bào/mL, nghiệm thức 2: $2,9 \pm 0,3 \times 10^5$ tế bào/mL, nghiệm thức 3: $3,8 \pm 0,1 \times 10^5$ tế bào/mL. Trong đó, tổng số tế bào máu của tôm thẻ chân trắng đạt cao nhất ở nghiệm thức 3 và cao hơn so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$). Các tế bào máu có vai trò trong việc nhận biết vật thể lạ xâm nhập vào cơ thể, khả năng thực bào, quá trình melanin hoá, quá trình gây độc và giao tiếp tế bào. Khi giáp xác đáp ứng với sự cảm nhiễm của tác nhân gây bệnh có thể làm mất số lượng lớn các tế bào máu trong hệ thống tuần hoàn, các tế bào máu sau đó được phục hồi thông qua quá trình tổng hợp nhanh chóng và giải phóng các tế bào máu mới bởi mô tạo máu của giáp xác [12].

Bảng 1. Tổng số tế bào máu tôm ở các nghiệm thức thí nghiệm sau 14 ngày cho ăn hoặc không cho ăn thức ăn có chứa xạ khuẩn *S. sampsonii*

Nghiệm thức	Tổng số tế bào máu (10^5 tế bào/mL)	
	Ngày 0	Ngày thí nghiệm thứ 14
Nghiệm thức 1	$1,4 \pm 0,3$	$2,7 \pm 0,2^b$
Nghiệm thức 2		$2,9 \pm 0,3^b$
Nghiệm thức 3		$3,8 \pm 0,1^c$
Đối chứng		$2,1 \pm 0,4^a$

Ghi chú: Số liệu đại diện cho giá trị trung bình $\pm$ SD. Các số liệu trong cùng một cột với các chữ cái khác nhau biểu hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa các nghiệm thức thí nghiệm

Có nhiều nghiên cứu đã chứng minh khi bổ sung chế phẩm sinh học vào thức ăn đã hiệu quả làm tăng tổng số tế bào máu của tôm ở nghiệm thức thí nghiệm như kết quả nghiên cứu của Oktaviana và cs (2014) khi bổ sung chế phẩm synbiotic (chứa *V. alginolyticus* SKT-bR và oligosaccharide từ khoai lang (*Ipomoea batatas* L.) vào thức ăn của tôm nuôi [13]. Trong một nghiên cứu khác của García Bernal và cs (2017) cho thấy khi tôm thí nghiệm được bổ sung các chế phẩm sinh học chứa hoặc *Streptomyces* N7, hoặc *Streptomyces* RL8, hoặc kết hợp giữa *Streptomyces* N7 và RL8 đã có tác dụng tăng cường khả năng miễn dịch của tôm thẻ chân trắng biểu hiện thông qua chỉ số tổng số tế bào máu của tôm ở nhóm cho ăn chế phẩm sinh học cao hơn nhiều so với tôm ở nhóm đối chứng [14]. Kết quả của nghiên cứu này cũng đã chứng minh thức ăn chứa xạ khuẩn *S. sampsonii* có hiệu quả tăng cường hàng rào miễn

dịch tế bào của tôm thẻ chân trắng thí nghiệm. Sự hình thành các tế bào máu bền vững rất quan trọng đối với sự tồn tại của tôm nói riêng và giáp xác nói chung.

3.3. Ảnh hưởng của xạ khuẩn *S. sampsonii* lên hoạt tính enzyme phenoloxydase

Hoạt tính của enzyme phenoloxydase của tôm tăng cao ở các nghiệm thức thí nghiệm cho ăn *S. sampsonii* đạt giá trị $0,24 \pm 0,02$ (nghiệm thức 1); $0,25 \pm 0,02$ (nghiệm thức 2); $0,37 \pm 0,01$ (nghiệm thức 3) và cao hơn nghiệm thức đối chứng ($0,21 \pm 0,03$) ($p < 0,05$). Hoạt tính enzyme phenoloxydase của tôm thẻ chân trắng ở nghiệm thức 3 đạt giá trị cao nhất và khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$) (bảng 2).

Bảng 2. Hoạt tính enzyme phenoloxydase của tôm ở các nghiệm thức thí nghiệm sau 14 ngày cho ăn hoặc không cho ăn thức ăn có chứa xạ khuẩn *S. sampsonii*

Nghiệm thức	Hoạt tính enzyme phenoloxydase (OD ₄₉₀)	
	Ngày 0	Ngày thí nghiệm thứ 14
Nghiệm thức 1	$0,17 \pm 0,02$	$0,24 \pm 0,02^b$
Nghiệm thức 2		$0,25 \pm 0,02^b$
Nghiệm thức 3		$0,37 \pm 0,01^c$
Đối chứng		$0,21 \pm 0,03^a$

Ghi chú: Số liệu đại diện cho giá trị trung bình $\pm$ SD. Các số liệu trong cùng một cột với các chữ cái khác nhau biểu hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa các nghiệm thức thí nghiệm.

Phản ứng phòng vệ ở tôm thường đi kèm với quá trình melanin hoá. Enzyme phenoloxydase thường tồn tại ở dạng chưa hoạt động là prophenoloxydase, sau khi được kích hoạt bởi các tế bào máu, sẽ trở thành dạng hoạt động là enzyme phenoloxydase thực hiện chức năng xúc tác phản o-hydroxyl hóa monophenol và oxy hóa phenol thành quinon dẫn đến tổng hợp melanin [15]. Sự tương quan giữa enzyme phenoloxydase và khả năng miễn dịch ở động vật không xương sống cho biết khi động vật không xương sống có hoạt tính của enzyme phenoloxydase cao thì khả năng cảm nhiễm với tác nhân gây bệnh sẽ thấp hơn. Đến nay có rất ít các kết quả nghiên cứu liên quan báo cáo về hiệu quả tác động đến enzyme phenoloxydase của chế phẩm sinh học chứa *Streptomyces*. Năm 2015, Sugathan và cs đã thực hiện thí nghiệm cho tôm sú (*P. monodon*) ăn

thức ăn có bổ sung *Streptomyces* sp. MAPS15 trong 22 ngày và sau đó cảm nhiễm tôm thí nghiệm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi*, kết quả tôm được cho ăn *Streptomyces* sp. MAPS15 trong chế độ ăn cho thấy khả năng kháng tác nhân gây bệnh và chỉ số đáp ứng miễn dịch enzyme phenoloxydase tăng cao hơn so với tôm ở nghiệm thức đối chứng [11]. Kết quả nghiên cứu này bước đầu cho thấy khi bổ sung xạ khuẩn *S. sampsonii* vào thức ăn đã có tác dụng làm tăng hoạt động của enzyme phenoloxydase ở tôm thẻ chân trắng thí nghiệm, đồng nghĩa với sự tăng cường hàng rào miễn dịch dịch thể của tôm nuôi.

3.4. Ảnh hưởng của xạ khuẩn *S. sampsonii* lên hoạt tính enzyme lysozyme

Ảnh hưởng của xạ khuẩn *S. sampsonii* lên hoạt tính enzyme lysozyme của tôm ở các nghiệm thức thí nghiệm sau 14 ngày cho ăn các chế độ ăn khác nhau được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Hoạt tính enzyme lysozyme của tôm ở các nghiệm thức thí nghiệm sau 14 ngày cho ăn hoặc không cho ăn thức ăn có chứa xạ khuẩn *S. sampsonii*

Nghiệm thức	Hoạt tính enzyme lysozyme (units/mL)	
	Ngày 0	Ngày thí nghiệm thứ 14
Nghiệm thức 1	$0,51 \pm 0,01$	$0,67 \pm 0,03^a$
Nghiệm thức 2		$0,69 \pm 0,04^a$
Nghiệm thức 3		$0,71 \pm 0,05^a$
Đối chứng		$0,64 \pm 0,04^a$

Ghi chú: Số liệu đại diện cho giá trị trung bình $\pm$ SD. Các số liệu trong cùng một cột với các chữ cái khác nhau biểu hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa các nghiệm thức thí nghiệm

Sau 14 ngày thử nghiệm cho ăn, hoạt tính của enzyme lysozyme của tôm thẻ chân trắng ở các nghiệm thức có bổ sung *S. sampsonii* cao hơn so với tôm ở nghiệm thức đối chứng, nhưng sự sai khác giữa các nghiệm thức này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Enzyme lysozyme của họ tôm he có hoạt tính ly giải một số vi khuẩn Gram dương và Gram âm, bao gồm cả một số loài *Vibrio* gây bệnh. Tuy nhiên, theo nghiên cứu của Huỳnh và cs (2018) sau khi cho tôm thẻ chân trắng ăn chế phẩm sinh học gồm prebiotic (inulin hoặc galactooligo-saccharide) và các lợi khuẩn (vi khuẩn sinh axit lactic, *Bacilli*, *L. plantarum*) trong 60 ngày đã không thấy sự thay đổi

đáng kể đối với hoạt tính của enzyme lysozyme [16]. Những nhận định trên hoàn toàn phù hợp với kết quả của nghiên cứu này.

4. KẾT LUẬN

Kết quả của nghiên cứu cho thấy xạ khuẩn *S. sampsonii* có hiệu quả nâng cao tỷ lệ sống cho tôm thí nghiệm sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn gây bệnh và tăng cường một số yếu tố đáp ứng miễn dịch của tôm thẻ chân trắng (*L. Vannamei*) ở các nghiệm thức thí nghiệm như: tổng số tế bào máu và hoạt tính của enzyme phenoloxidase, nhưng không có ảnh hưởng đối với hoạt tính enzyme lysozyme. Trong đó nhóm tôm thí nghiệm được cho ăn chế độ ăn có *S. sampsonii* với mật độ 10^8 CFU/g thức ăn được ghi nhận có hiệu quả tốt hơn so với tôm ở các chế độ ăn còn lại. Xạ khuẩn *S. sampsonii* đã hiệu quả kích thích hoạt động các yếu tố đáp ứng miễn dịch của tôm thẻ chân trắng. Mặc dù vậy, cơ chế tương tác giữa vật chủ và *S. sampsonii* vẫn chưa được biết rõ, cơ chế hoạt động vẫn chưa được xác định, do đó vẫn cần có những nghiên cứu sâu hơn để làm rõ thêm những điểm này.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ tỉnh Thừa Thiên - Huế đã tài trợ kinh phí thực hiện đề tài khoa học và công nghệ cấp cơ sở này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Mitra, A., Santra, S.C., Mukharjee, J. (2008). Distribution of actinomycetes, the antagonistic behavior and the Physio - chemical characteristic of the worlds largest tidal mangrove forest. *Applied Microbial Biotechnology*, 80, 685 - 695.
2. Srinivasan, M. C., Laxman, R. S., Deshpande, M. V. (1991). Physiology and nutrition aspects of actinomycetes - An overview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7, 171-184.
3. Mohanraj, G. and Sekar, T. (2013). Isolation and screening of actinomycetes from marine sediments for their potential to produce antimicrobials. *International Journal LifeScience Biotechnology & Pharma Research*, 2(3), 115-126.
4. Tan, L. T-H, Chan, K-G., Lee, L-H., and Goh, B-H. (2016). Minireview: *Streptomyces* bacteria as potential probiotics in aquaculture. *Frontiers in Microbiology*, Open Access, 7, 79.

5. Manimaran, M., Rajkumar, T., Vimal, S., Taju, G., Abdul Majeed, S., Sahul Hameed, A.S., Kannabiran, K. (2018) Antiviral activity of 9(10H)-Acridanone extracted from marine *Streptomyces fradiae* strain VITMK2 in *Litopenaeus vannamei* infected with white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 488, 66-73.
6. Pisano, M. A, Sommer M. J., Taras, L. (1992) Bioactivity of chitinolytic actinomycetes of marine origin. *Applied microbiology and biotechnology*, 36, 553-555.
7. Babu, D. T., Archana, K., Kachiprath, B., Solomon, S., Jayanath, G., Singh, I. S.B., Philip, R. (2018). Marine actinomycetes as bioremediators in *Penaeus monodon* rearing system. *Fish and Shellfish Immunology*, 75, 231-242.
8. Mazón-Suástegui, J. L., Salas-Leiva, J. S., Medina-Marrero, R., Medina-García, R., García-Bernal, M. (2020). Effect of *Streptomyces* probiotic on the gut microbiota of *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology Open*, 9:e976. <https://doi.org/10.1002/mbo3.967>
9. Ellis, A. E. (1990). Lysozyme Assays. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S. and Van Muiswinkel, W.B., Eds., *Techniques in Fish Immunology*, SOS Publications, Fair Haven, 101-103.
10. García Bernal, M., Medina Marrero, R., Rodríguez-Jaramillo, C., Marrero-Chang, O., Campa-Córdova, A. I., Medina García, R. (2018). Probiotic effect of *Streptomyces* spp. on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Nutrition*, 24, 865-871. <https://doi.org/10.1111/anu.12622>
11. Sugathan, S., Tsalla, T., Gezmu, T., Merdekios, B., Kadaikunnan, S., Idhayadhulla, A., Manilal, A., Selvin, J. (2015). An in vivo efficacy validation and immune-modulatory potential of *Streptomyces* sp. *Journal of Coastal Life Medicine*, 3 (11), 841-847.
12. Lin, X. and Söderhäll, I. (2011). Crustacean hematopoiesis and the astakine cytokines. *Blood Journal*, 117, 6417-6424.
13. Oktaviana, A., Widanarni, Yuhana, M. (2014). The use of synbiotics to prevent IMNV and *Vibrio harveyi* co-infection in *Litopenaeus vannamei*. *HAYATI Journal of Biosciences*, 21 (3), 127-134.

14. García Bernal, M., Medina Marrero, R., Campa-Córdova, A.I, Mazón-Suástegui, J. M (2017). Probiotic effect of *Streptomyces* strains alone or in combination with *Bacillus* and *Lactobacillus* in juveniles of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*, 25, 927–939.
15. Sritunyalucksana, K., and Söderhall, K. (2000). The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, 191, 53– 69.
16. Huynh, T.-H., Cheng, A.-C., Chi, C.-C., Chiu, K.-H., Liu, C.-H. (2018). A synbiotic improves the immunity of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Metabolomic analysis reveal compelling evidence. *Fish and Shellfish Immunology*, 79, 284–293.

PRELIMINARY STUDY ON EFFECT OF *Streptomyces sampsonii* ON VIBRIO RESISTANCE AND IMMUNE RESPONSE PARAMETERS OF WHITE LEG SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*)

Nguyen Thi Hue Linh, Nguyen Thi Xuan Hong,

Nguyen Duc Quynh Anh, Nguyen Nam Quang, Nguyen Ngoc Phuoc

Summary

This study initially evaluated the effect of *Streptomyces sampsonii* on *Vibrio* resistance and immune response factors of white leg shrimp (*L. vannamei*). The experimental shrimp (weighted 2 ± 0.3 g/individual) were fed with commercial feed without or supplement of *S. sampsonii* (10^6 , 10^7 , 10^8 CFU/g diet). After 14 days of feeding trial, shrimp hemolymph were collected for analyzing the related parameters to shrimp immune response, and experimental shrimp were challenged by *Vibrio parahaemolyticus* and *V. harveyi*, the survival rates were monitored for 14 days. The results showed that the cumulative mortality rates of experimental shrimp in the treated groups (from 20 to 24.4%) were lower than those of in the control groups (from 55.6 to 57.8%). The immunological parameters such as total hemocytes count and phenoloxidase enzyme activity of shrimp in the treated groups were significantly higher ($p < 0.05$) than those of shrimp in the control group. In which, the supplement of *S. sampsonii* 10^8 CFU/g in the diet resulted in better immune response in shrimp than others. Besides, no significant difference was observed in the lysozyme enzyme activity of shrimp in the treatment groups and in the control group ($p > 0.05$). The results of this study provide the scientific data on the effectiveness of *S. sampsonii* in stimulating immune response parameters of cultured white leg shrimp and prevention of *Vibrio* infection in shrimp.

Keywords: *Streptomyces sampsonii*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, Immune response parameters, white leg shrimp.

Người phản biện: PGS.TS. Kim Văn Vạn

Ngày nhận bài: 19/8/2022

Ngày thông qua phản biện: 19/9/2022

Ngày duyệt đăng: 25/10/2022