

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐỘ MẶN LÊN ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH KHÔNG ĐẶC HIỆU CỦA TÔM SÚ

Võ Thị Tuyết Minh^{1*}

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm kiểm tra các thông số miễn dịch không đặc hiệu của tôm sú (*Penaeus monodon*) ($0,84 \pm 0,04$ g) sau 20 tuần nuôi ở bốn độ mặn khác nhau (5‰, 15‰, 25‰ và 35‰). Kết quả cho thấy, các thông số miễn dịch không đặc hiệu của tôm nuôi ở độ mặn 25‰ và 35‰ cao hơn độ mặn 5‰ ($p < 0,05$). Bạch cầu đơn nhân, bạch cầu hạt, hoạt tính PO và hoạt tính lysozyme của tôm nuôi ở 25‰ và 35‰ cao hơn độ mặn 5‰ ($p < 0,05$). Hoạt tính SOD của tôm nuôi ở độ mặn 35‰ cao hơn các độ mặn 5‰, 15‰ và 25‰ ($p < 0,05$). Tuy nhiên, khác biệt không có ý nghĩa thống kê về hoạt tính RB của tôm nuôi ở bốn độ mặn khác nhau. Tỷ lệ thực bào, chỉ số thực bào của tôm nuôi ở 25‰ và 35‰ cao hơn các độ mặn 5‰ và 15‰ ($p < 0,05$) khi tôm được cảm nhiễm với vi khuẩn *Vibrio alginolyticus*. Kết luận rằng tôm sú *P. monodon* được nuôi ở 25‰ đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu và khả năng thực bào đối với vi khuẩn *V. alginolyticus* cao hơn tôm nuôi ở độ mặn 5‰ và 15‰.

Từ khóa: Tôm sú (*Penaeus monodon*), độ mặn, miễn dịch không đặc hiệu, *Vibrio alginolyticus*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tôm sú *Penaeus monodon* là một trong những loài tôm he quan trọng nhất đang được nuôi ở nhiều nước vì giá trị thương phẩm cao. Bên cạnh đó, tôm sú cũng là một trong những loài quan trọng về mặt thương mại trong nuôi trồng thủy sản và được xếp hạng thứ mười bảy trong các loài chủ yếu năm 2019, với sản lượng 774.484 tấn (FAO, 2021). Các nước sản xuất tôm sú *P. monodon* chính là Việt Nam, Indonesia, Trung Quốc, Bangladesh và Myanmar (FAO, 2021).

Các cơ chế bảo vệ của động vật giáp xác ít được nghiên cứu hơn so với cơ chế bảo vệ của cá có vây và các động vật có xương sống khác. Bên cạnh đó, động vật giáp xác không có đáp ứng miễn dịch đặc hiệu. Nói cách khác, chúng không có khả năng sản xuất kháng thể, và phụ thuộc vào hệ thống miễn dịch không đặc hiệu (Roch, 1999). Ba loại tế bào máu trong hệ tuần hoàn tôm được nhận biết, cụ thể: Bạch cầu đơn nhân, bạch cầu hạt, và bạch cầu bán hạt (Söderhäll *et al.*, 1996). Các loại bạch cầu này tham gia vào hệ thống nhận dạng kháng nguyên, thực bào, hoạt hóa hệ thống prophenoloxidase (proPO) thành phenoloxidase (PO), bao bọc, hình thành nốt sần, và giải phóng các peptit kháng khuẩn và lysozyme (Söderhäll and Cerenius, 1998). Do đó, việc đề kháng với các mầm bệnh ở tôm chủ yếu nhờ vào các đáp ứng miễn dịch tự nhiên như: Hoạt tính của PO, khả năng tạo ra hợp chất kháng khuẩn superoxide anion (hay hoạt tính respiratory burst) và superoxide dismutase (SOD) (Munoz *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2012).

Trang trại nuôi tôm thường đối mặt những thay đổi về các thông số vật lý - hóa học của môi trường nước như: Nhiệt độ, độ pH và độ mặn gây stress và có thể ảnh hưởng nghiêm trọng đến khả năng miễn dịch của tôm (Leonard, 2006). Nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng tôm thẻ chân trắng *L. vannamei* được nuôi ở 25‰ có các thông số miễn dịch cao, và tỷ lệ chết tích lũy của tôm thẻ chân trắng *L. vannamei* được nuôi ở 2,5‰ và 5‰ cao hơn đáng kể so với tôm được nuôi ở 15‰, 25‰, và 35‰ khi cảm nhiễm với *V. alginolyticus* và WSSV (Lin *et al.*, 2012). Một số protein liên quan đến miễn dịch của tôm thẻ chân trắng nuôi ở độ mặn 28‰ cao hơn tôm nuôi ở độ mặn 3‰ (Xu *et al.*, 2017). Ngược lại, việc nuôi tôm ở độ mặn cao (36‰ và 44‰) kết hợp gây sốc amonia nitrogen (15 mg/L) làm giảm đáp ứng miễn dịch của tôm thẻ chân trắng so với tôm nuôi ở độ mặn 28‰ (Long *et al.*, 2021). Vì thế, mục tiêu của nghiên cứu này nhằm xác định sự ảnh hưởng của độ mặn lên đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu và xác định khả năng thực bào của tôm sú sau 20 tuần nuôi ở các độ mặn khác nhau.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Ấu trùng tôm sú nuôi ở bốn độ mặn khác nhau

Tôm sú có kích thước $0,84 \pm 0,04$ g/con ương nuôi ở độ mặn 35‰ được chia đều ra 4 bể để thuần hóa đạt độ mặn 5‰, 15‰, 25‰ và 35‰. Độ mặn

¹ Khoa Nông nghiệp - Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh

* Tác giả liên hệ: E-mail: tuyetminhcntc@tvu.edu.vn

mỗi bể được điều chỉnh giảm 2 - 3%/ngày (Lin *et al.*, 2013). Thời gian thuần hóa kéo dài 4,7 và 12 ngày để độ mặn bể nuôi tôm đạt độ mặn 25‰, 15‰ và 5‰ tương ứng. Ở mỗi độ mặn, tôm được nuôi trong bể 1m³ có chứa 3 lồng nuôi tôm, mỗi lồng có kích thước (60 cm × 40 cm × 35 cm), số lượng tôm cho mỗi lần lập là 30 con/lồng.

2.1.2. Chăm sóc và quản lý

Tôm được cho ăn bằng thức ăn công nghiệp có hàm lượng protein 40% của Công ty Chuen Shin Feeds (Grobest) với khẩu phần 5% khối lượng tôm, cho ăn 3 lần/ngày vào lúc 9 h, 15 h và 21 h. Phân tôm được loại bỏ bằng cách xiphong mỗi ngày vào buổi chiều. Các bể nuôi được sục khí và cấp nước để đảm bảo mực nước giống nhau giữa các bể.

Về kiểm soát độ mặn, bể chứa nước 5 m³ cho mỗi độ mặn (35‰, 25‰, 15‰ và 5‰) được bố trí tương ứng cho từng độ mặn của bể nuôi 1 m³ (35‰, 25‰, 15‰ và 5‰). Nước được chuyển liên tục từ bể chứa 5m³ (35‰, 25‰, 15‰ và 5‰) sang bể nuôi 1 m³ (35‰, 25‰, 15‰ và 5‰) bằng ống nhựa nhỏ có đường kính 0,8 cm.

2.1.3. Chuẩn bị vi khuẩn *V. alginolyticus*

Chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* dự trữ được nuôi cấy trên đĩa thạch tryptic soy agar (TSA bổ sung 2,0% NaCl, Difco) trong 24 giờ ở 28°C và sau đó khuẩn lạc được nuôi tăng sinh trong 10 mL tryptic soy broth (TSB bổ sung 2,0% NaCl, Difco) trong 24 giờ ở 28°C. Sau đó, dung dịch được ly tâm ở 7.155xg trong 20 phút ở 4°C, loại bỏ phần nổi và rửa 2 lần bằng dung dịch 2,0% NaCl. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 601 nm. Sau đó pha loãng vi khuẩn trong dung dịch 2,0% NaCl để đạt được nồng độ 6,7x10⁸ cfu/mL được sử dụng để kiểm tra hoạt tính thực bào.

2.2. Phương pháp xác định một số chỉ tiêu miễn dịch của tôm sú nuôi ở các độ mặn khác nhau

Vào tuần 20, tôm nuôi ở các độ mặn 5‰, 15‰, 15‰ và 35‰ được lấy máu để phân tích các thông số miễn dịch không đặc hiệu. Mỗi độ mặn, bảy mẫu máu tôm được lấy từ xoang trung tâm, nằm giữa chân bò và chân bơi, bằng ống tiêm vô trùng 1 mL.

2.2.1. Phương pháp xác định từng loại bạch cầu và tổng số bạch cầu

50 µL máu tôm được pha loãng trong 450 µL chất chống đông máu (30 mM Trisodium citrate, 340 mM Sodium chloride, 10 mM EDTA và 115 mM

Glucose). Mật độ tế bào máu được xác định bằng buồng đếm hồng cầu và quan sát mẫu dưới kính hiển vi (20X) (Leica DMIL, Leica Mycosystem, Wetzlar, Đức) để xác định số lượng bạch cầu đơn nhân, bạch cầu hạt (bao gồm bạch cầu bán hạt) và tổng số bạch cầu theo công thức phương pháp của Hou và Chen (2005). Số lượng bạch cầu (bạch cầu đơn nhân hoặc bạch cầu hạt) = số lượng bạch cầu đơn nhân hoặc bạch cầu hạt đếm được trong buồng đếm × 10 × 10⁴; Tổng bạch cầu = (số lượng bạch cầu đơn nhân + số lượng bạch cầu hạt) × 10 × 10⁴. Trong đó: 10⁴: 0,1 µL mẫu máu và dung dịch chống đông máu được tính trong buồng đếm đổi sang đơn vị mL (1.000 µL); 10: máu được pha loãng 10 lần.

2.2.2. Phương pháp xác định hoạt tính phenoloxidase (PO)

Hoạt tính của PO được đo theo phương pháp của Hernández-López và cộng tác viên (1996). 100 µL máu tôm được pha loãng trong 900 µL chất chống đông máu. Hỗn hợp máu pha loãng chứa trong eppendorf 1,5 mL được ly tâm ở 800 xg ở 4°C khoảng 20 phút. Phần dịch nổi phía trên được loại bỏ và phần kết tủa được hòa tan trong 1 mL dung dịch cacodylate citrate (Natri cacodylate 0,01 M, Natri clorua 0,45 M, Trinatri citrat 0,01 M, pH 7,0) và được ly tâm lại ở 800 xg ở 4°C trong 20 phút. Sau khi ly tâm lần thứ hai, phần nổi phía trên được loại bỏ và viên kết tủa hòa tan bằng dung dịch caccodylate 200 µL (Natri cacodylate 0,01 M, Natri clorua 0,45 M, Canxi clorua 0,01 M, Magie clorua 0,26 M, pH 7,0). 100 µL mẫu được ủ với 50 µL trypsin (1 mg/mL) trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, 50 µL L-DOPA (3 mg/mL) được thêm vào, và thêm 800 µL cacodylate trong 5 phút. Sau đó, mẫu được đo bằng Microplate Reader Hitachi U-2000 (Tokyo, Nhật Bản) ở bước sóng 490 nm. Mẫu đối chứng gồm 100 µL mẫu được ủ với 50 µL cacodylate (thay thế trypsin), và 50 µL L-DOPA.

2.2.3. Phương pháp xác định hoạt tính Respiratory Burst (RB)

Hoạt tính của RB được thực hiện theo mô tả của Song và Hsieh (1994). 100 µL hỗn hợp máu và chất chống đông máu được làm lắng xuống trong đĩa Microplate đã phủ 100 µL dung dịch poly-L-lysine (0,2%) để tăng sự kết dính của tế bào. Microplate được ly tâm ở 800 xg, 4°C khoảng 20 phút, loại bỏ huyết tương. 100 µL zymosan (0,1% in Hanks' balanced salt solution) được thêm vào và để phản ứng trong

30 phút ở nhiệt độ phòng. Mẫu được nhuộm bằng 100 μ L dung dịch NTB (0,3%) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, 100 μ L metanol 100% được thêm vào để dừng phản ứng, rửa ba lần với 100 μ L metanol 70% và để khô ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau đó, mẫu được hòa tan trong 120 μ L KOH 2 M và 140 μ L dimethyl sulphoxide (DMSO) và đo ở bước sóng 630 nm bằng Microplate reader (Model VERSAmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

2.2.4. Phương pháp xác định hoạt tính Superoxide dismutase (SOD)

Hoạt tính của SOD được đo bằng khả năng ức chế các phản ứng phụ thuộc vào gốc superoxide bằng cách sử dụng bộ kit Ransod (Randox, Crumlin, Anh). Hỗn hợp máu tôm pha loãng với dung dịch chống đông máu được ly tâm ở 800xg trong 20 phút ở 4°C, loại bỏ huyết tương. Phần kết tủa được hòa tan trong 1 mL NaCl 0,85% và ly tâm một lần nữa. Phần nổi phía trên được loại bỏ và phần kết tủa được hòa tan bằng 100 μ L nước cất ở 4°C. Sau 15 phút, 10 μ L dung dịch được đặt vào đĩa microplate chứa 170 μ L hỗn hợp phản ứng từ bộ kit. Sau đó, 50 μ L dung dịch xanthine oxidase được thêm vào. Các kết quả đo độ hấp thụ được thực hiện ở 0,5 và 3 phút sau khi thêm xanthine oxidase ở bước sóng 505 nm. Một đơn vị SOD được định nghĩa là lượng cần thiết để ức chế tốc độ giảm xanthine xuống 50% (Biagini *et al.*, 1995).

2.2.5. Phương pháp xác định hoạt tính lysozyme

Hoạt tính của lysozyme được định lượng theo phương pháp đã mô tả của Mingawa và cộng tác viên (2001). 100 μ L máu tôm được pha loãng trong 450 μ L chất chống đông máu. Hỗn hợp máu tôm pha loãng được trộn với 1 mL (0,02%) *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, Mỹ). Phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ phòng, và độ hấp thụ được đo ở bước sóng 530 nm sau 0,5 và 4,5 phút. Một đơn vị (U) hoạt tính lysozyme được định nghĩa là lượng mẫu gây giảm độ hấp thụ 0,01 mỗi phút.

2.2.6. Phương pháp xác định hoạt tính thực bào của *P. monodon* đối với *V. alginolyticus*

Tôm được tiêm vào xoang trung tâm 20 μ L vi khuẩn *V. alginolyticus* ($6,7 \times 10^8$ cfu/mL) tương đương $1,34 \times 10^7$ cfu/ tôm [(20 μ L \times $6,7 \times 10^8$)/1.000 μ L]. Sau khi tiêm, tôm được giữ trong bể chứa độ mặn riêng biệt chứa 40 L nước trong 3 giờ.

Hoạt tính thực bào được đo theo phương pháp

(Lin *et al.*, 2013). Cụ thể, 50 μ L máu tôm được pha loãng với 50 μ L dung dịch chống đông máu, và thêm 100 μ L dung dịch cố định (1% papaformaldehyde) ủ ở 4°C trong 30 phút. Sau đó, 50 μ L mẫu được cố định trên bộ khung có chứa miếng lam. Mẫu được đặt trong máy cytospin và ly tâm với tốc độ 1.000 vòng/phút trong 3 phút (Thermo, Shandon, UK). Sau ly tâm, mẫu được ngâm 5 phút trong metanol 5 phút và làm khô tự nhiên trong không khí. Sau đó, mẫu được nhuộm bằng dung dịch Giemsa trong 30 phút và quan sát bằng kính hiển vi. Hoạt tính thực bào, được định nghĩa là tỷ lệ thực bào, và chỉ số thực bào được thể hiện qua công thức sau: Tỷ lệ thực bào (%) = (Tế bào máu thực bào/Tổng số tế bào máu) \times 100; Chỉ số thực bào = Số lượng vi khuẩn được thực bào của 1 tế bào thực bào.

2.2.7. Phân tích dữ liệu

Số liệu được phân tích thống kê Oneway Anova, so sánh giá trị trung bình bằng phương pháp kiểm định Turkey để xác định sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức bằng phần mềm SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của các nghiệm thức được xác định với mức nghĩa $p < 0,05$.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Trong quá trình thí nghiệm, nhiệt độ được theo dõi 2 lần/ngày, kết quả cho thấy các yếu tố môi trường như nhiệt độ biến động từ 26,5 đến 32°C; pH và oxy hòa tan đều nằm trong khoảng thích hợp nuôi tôm.

3.1. Loại bạch cầu và tổng số bạch cầu

Số lượng bạch cầu đơn nhân của tôm nuôi ở độ mặn 15‰, 25‰ và 35‰ cao hơn tôm nuôi ở độ mặn 5‰. Tuy nhiên, khác biệt không có ý nghĩa thống kê về số lượng bạch cầu đơn nhân tôm nuôi ở các độ mặn 15‰, 25‰ và 35‰. Số lượng bạch cầu đơn nhân của tôm nuôi ở độ mặn 25‰ cao hơn độ mặn 5‰ ($p < 0,05$) (Bảng 1). Số lượng bạch cầu hạt của tôm nuôi ở độ mặn 25 ‰ và 35‰ cao hơn các độ mặn 5‰ và 15‰, khác biệt không có ý nghĩa thống kê về số lượng bạch cầu hạt của tôm ở các độ mặn 25‰ và 35‰; 5‰ và 15‰ ($p < 0,05$) (Bảng 1). Tổng số bạch cầu của tôm nuôi ở độ mặn 15‰, 25‰ và 35‰ cao hơn ở tôm nuôi ở độ mặn 5‰. Tuy nhiên, khác biệt không có ý nghĩa thống kê về tổng số bạch cầu của tôm nuôi ở các độ mặn 15‰, 25‰ và 35‰ ($p < 0,05$) (Bảng 1).

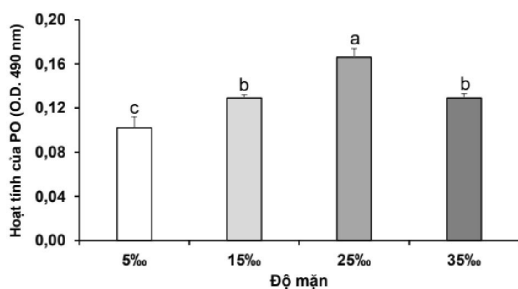
Bảng 1. Bạch cầu đơn nhân, bạch cầu hạt (bao gồm bạch cầu bán hạt) và tổng số bạch cầu của tôm sú *P. monodon* được nuôi ở 5‰, 15‰, 25‰ và 35‰ sau 20 tuần

Thông số tế bào ($\times 10^5$ tế bào/mL)	Độ mặn			
	5‰	15‰	25‰	35‰
Bạch cầu đơn nhân	215,7 ^b ± 18,3	235,8 ^{ab} ± 7,5	280,0 ^a ± 17,0	246,9 ^{ab} ± 12,3
Bạch cầu hạt	37,1 ^b ± 1,65	39,0 ^b ± 2,34	58,7 ^a ± 4,80	49,3 ^{ab} ± 4,65
Tổng số bạch cầu	252,9 ^b ± 19,58	274,8 ^{ab} ± 9,16	338,7 ^a ± 20,29	296,1 ^{ab} ± 16,5

Ghi chú: Các giá trị có chữ cái khác nhau trong cùng một hàng thì sai khác có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%.

3.2. Hoạt tính PO

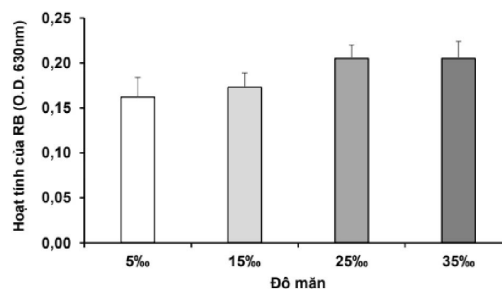
Hoạt tính PO của tôm sú nuôi ở độ mặn 15‰, 25‰ và 35‰ cao hơn 5‰ ($p < 0,05$). Hoạt tính PO cao nhất của tôm được ghi nhận ở độ mặn 25‰, tiếp theo là các độ mặn 15‰ và 35‰ có giá trị PO bằng nhau và giá trị PO thấp nhất của tôm được ghi nhận ở độ mặn 5‰ (Hình 1).



Hình 1. Hoạt tính PO của tôm sú *P.monodon* được nuôi ở 5‰, 15‰, 25‰ và 35‰ sau 20 tuần. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

3.3. Hoạt tính RB

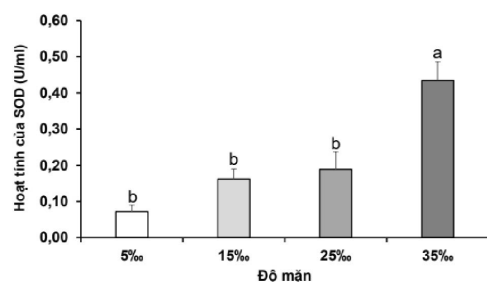
Tôm nuôi ở độ mặn 25‰ có hoạt tính RB cao nhất, tiếp đến 35‰ và 15‰. Hoạt tính RB thấp nhất của tôm được ghi nhận ở độ 5‰. Tuy nhiên, không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê về hoạt tính RB của tôm nuôi ở các độ mặn khác nhau 5‰, 15‰, 25‰ và 35‰ ($p < 0,05$) (Hình 2).



Hình 2. Hoạt tính RB của tôm sú *P.monodon* được nuôi ở 5‰, 15‰, 25‰ và 35‰ sau 20 tuần. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

3.4. Hoạt tính SOD

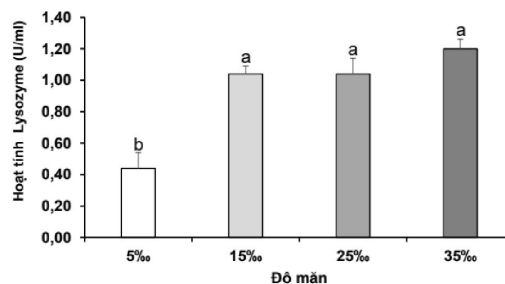
Tôm nuôi ở độ mặn 35 ‰ có hoạt tính SOD cao hơn các độ mặn 5‰, 15‰, 25‰, và cao gấp 6 lần so với tôm nuôi ở độ mặn 5‰ ($p < 0,05$). Khác biệt không có ý nghĩa thống kê về hoạt tính SOD của tôm nuôi ở các độ 5‰, 15‰ và 25‰ ($p < 0,05$) (Hình 3).



Hình 3. Hoạt tính SOD của tôm sú *P.monodon* nuôi ở 5‰, 15‰, 25‰ và 35‰ sau 20 tuần. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

3.5. Hoạt tính Lysozyme

Hoạt tính lysozyme của tôm nuôi ở độ mặn 15‰, 25‰ và 35‰ cao độ mặn 5‰ ($p < 0,05$). Khác biệt không có ý nghĩa thống kê về hoạt tính Lysozyme của tôm nuôi ở các độ mặn 15‰, 25‰ và 35‰ ($p < 0,05$) (Hình 4).



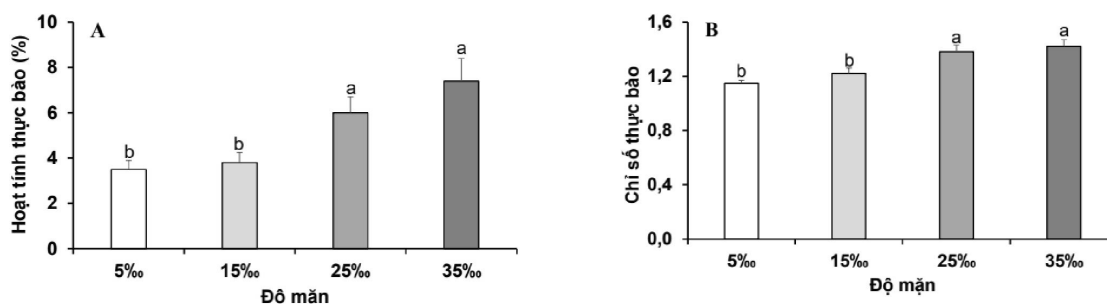
Hình 4. Hoạt tính Lysozyme của tôm sú *P.monodon* nuôi ở 5‰, 15‰, 25‰ và 35‰ sau 20 tuần. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Ở động vật giáp xác, những thay đổi của các thông số hóa lý, như nhiệt độ, pH, oxy hòa tan, amoniac và độ mặn có thể ảnh hưởng đến phản ứng miễn dịch. Theo kết quả nghiên cứu của Lin và cộng tác viên (2012) chỉ ra rằng khác biệt không có ý nghĩa thống kê về số lượng bạch cầu đơn nhân, bạch cầu hạt, tổng số bạch cầu, hoạt tính PO, RB, SOD hoạt động và lysozyme được tìm thấy trong tôm thẻ chân trắng *L. vannamei* được nuôi ở 15‰, 25‰ và 35‰. Một số protein liên quan đến miễn dịch, trypsin, catalase, actin 1, của tôm thẻ chân trắng nuôi ở độ mặn 28‰ cao hơn tôm nuôi ở độ mặn 3‰ (Xu *et al.*, 2017). Tôm nuôi ở độ mặn 44‰ có biểu hiện gen PO và hoạt T-SOD cao hơn tôm nuôi ở độ mặn 28‰ và 36‰. Tuy nhiên, hoạt tính enzyme catalase (CAT) tôm nuôi ở độ mặn 36‰ cao hơn 28‰ và 44‰ khi quan sát trên cơ sau 48 giờ sốc amonia nitrogen ($p < 0,05$) (Long *et al.*, 2021). Tôm sú *P. monodon* được nuôi ở nhiệt độ 15‰, 25‰ và 35‰ có số lượng bạch cầu đơn nhân, bạch cầu hạt, tổng số bạch cầu,

hoạt tính RB, PO, hoạt động SOD, hoạt tính lysozyme cao hơn so với tôm ở 5‰ (Bảng 1; Hình 1, 2, 3). Tuy nhiên, khác biệt không có ý nghĩa thống kê về hoạt tính RB của tôm nuôi ở bốn độ mặn khác nhau (Hình 3). Ngoài ra, khác biệt không có ý nghĩa thống kê về hoạt tính SOD của tôm nuôi ở các độ mặn 5‰, 15‰ và 25‰ (Hình 3). Tôm sú *P. monodon* được nuôi ở các độ mặn 15‰, 25‰ và 35‰ có các chỉ số miễn dịch không đặc hiệu cao hơn độ mặn 5‰. Điều này cho thấy tôm sú giống nuôi ở độ mặn thấp có ảnh hưởng tiêu cực đến hệ miễn dịch.

3.6. Hoạt tính thực bào và chỉ số thực bào

Hoạt tính thực bào và chỉ số thực bào của tôm nuôi ở độ mặn 25‰ và 35‰ cao hơn các độ mặn 5‰ và 15‰ ($p < 0,05$). Khác biệt không có ý nghĩa thống kê về hoạt tính thực bào và chỉ số thực bào được quan sát thấy giữa tôm nuôi ở các độ mặn 25‰ và 35‰, và giữa tôm nuôi ở các độ mặn 5‰ và 15‰ (Hình 5 A, B).



Hình 5. Hoạt tính thực bào (A), chỉ số thực bào (B) của tôm sú *P. monodon* nuôi các độ mặn 5‰, 15‰, 25‰ và 35‰ sau 20 tuần. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Hoạt tính thực bào có thể bị ảnh hưởng bởi các thông số môi trường ở động vật không xương sống (Bayne, 1990). Hoạt tính thực bào tôm càng xanh *Microbranchium rosenbergii* đối với *Lactococcus garvieae* trong nước ngọt thấp hơn đáng kể so với tôm nuôi ở độ mặn 5‰ và 15‰ (Cheng *et al.*, 2003). Hoạt tính thực bào đối với tác nhân gây bệnh *V. alginolyticus* giảm đối với tôm thẻ chân trắng *L. vannamei* được chuyển từ độ mặn 25‰ xuống độ mặn 5‰ và 15‰ sau 12 giờ (Wang and Chen, 2005). Tương tự, hoạt tính thực bào của vi khuẩn *P. damsela* subsp. *damsela* đối với tôm sú *P. monodon* giảm đáng kể đối với tôm chuyển từ độ mặn 25‰ đến các độ mặn 5‰, 15‰ và 35‰ sau 12 giờ (Wang and Chen, 2006). Trong nghiên cứu

này, hoạt tính thực bào, chỉ số thực bào đối với tác nhân *V. alginolyticus* của tôm nuôi ở các độ mặn 25‰ và 35‰ cao hơn đáng kể so với tôm nuôi ở 5‰ và 15‰. Do đó, tôm nuôi ở độ mặn cao ít nhạy cảm hơn với tác nhân gây bệnh *V. alginolyticus* so với tôm nuôi ở độ mặn thấp.

IV. KẾT LUẬN

Các thông số miễn dịch bao gồm số lượng bạch cầu đơn nhân, bạch cầu hạt, tổng số bạch cầu, hoạt tính PO, SOD, lysozyme của tôm được nuôi ở các độ mặn 25‰ và 35‰ cao hơn đáng kể so với tôm được nuôi ở độ mặn 5‰. Hoạt tính thực bào và chỉ số thực bào của tôm nuôi ở độ mặn 25‰ và 35‰ cao hơn đáng kể so với tôm nuôi ở 5‰ và 15‰ khi

cảm nhiễm với vi khuẩn *V. alginolyticus*. Kết luận tôm sú *P. monodon* nuôi thể hiện tốt hơn các thông số miễn dịch ở độ mặn cao hơn khi được nuôi ở độ mặn 25‰ hoặc 35‰. Do đó, tôm nên được duy trì độ mặn ở 25‰ hoặc cao hơn có các thông số miễn dịch không đặc hiệu tốt hơn và khả năng thực bào đối với *V. alginolyticus* cao hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bayne C.J., 1990. Phagocytosis and non-self-recognition in invertebrates Phagocytosis appears to be an ancient line of defense. *Bioscience*, 40: 723-31.
- Biagini G., Sala D., Zini L., 1995. Diethylthiocarbamate, a superoxide dismutase inhibitor, counteracts the maturation of ischemic-like lesions caused by endothelin-1 intrastriatal injection. *Neuroscience Letters*, 90: 212-216.
- Cheng W., Chen M.S., Wang I.F., Hsu I.P., Liu H.H., Chen C.J., 2003. Effects of temperature, pH, salinity and ammonia on the phagocytic activity and clearance efficiency of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* to *Lactococcus garvieae*. *Aquaculture*, 219: 111-121.
- FAO, 2021. Cultured Aquatic Species Information Programme: *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798). Department. Accessed on 15/11/2021, available from: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_monodon/en.
- Hernández-López J., Gollas-Galván T., Vargas-Albores E., 1996. Activation of prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C, 113: 61-66.
- Hou W.Y., Chen C.J., 2005. The immunostimulatory effect of hot-water extract of *Glacilaria tenuitipitata* on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 19: 127-138.
- Le Moullac G., Haffner P., 2000. Environmental factors affecting responses in crustacean *Aquaculture*, 191: 121-131.
- Leonard B.E., 2006. HPA and immune axes in stress: involvement of the serotonergic system. *Neuroimmunomodulation*, 13: 268-276.
- Li T.C., Yeh T.S., Chen J.C., 2010. Innate immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* weakened by combination of a *Vibrio alginolyticus* injection and low-salinity stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 28: 121-127.
- Lin Y.C., Chen J.C., Li C.C., Morni W.Z.W., A.Suhaili A.S.N., Kou Y.H., Chang Y.H., Chen L.L., Tsui W.C., Chen Y.Y., Huang C.L., 2012. Modulation of the innate immune system in white shrimp *Litopenaeus vannamei* following long-term low salinity exposure. *Fish & Shellfish Immunology*, 33: 324-331.
- Lin Y.C., Chen J.C., Morni W.Z.W., Putra D.F., Huang C.L., Li C.C., Hsieh J.F., 2013. Vaccination enhances early immune responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei* after secondary exposure to *Vibrio alginolyticus*. *PLoSone*, 8 (7): e69722.
- Long J., Cui Y., Wang R., Cheng Y., Zhao N., Wang C., Wang Z., Li Y., 2021. Combined effects of high salinity and ammonia-N exposure on the energy metabolism, immune response, oxidative resistance and ammonia metabolism of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Report* 20, 100648
- Mingawa S., Hikima J., Hirono I., Aoki T., 2001. Expression of Japanese flounder cDNA in insect cells. *Developmental and Comparative Immunology*, 25: 439-445.
- Munoz M., Cedeno R., Rodriguez J., Van der Knaap W.P.W., Mialhe E., Bachere E., 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocyte of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 191: 89107.
- Roch P., 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*, 172: 125-145.
- Söderhäll K., Cerenius L., Johansson MW., 1996. The prophenoloxidase activating system in invertebrates. In: Söderhäll KS, Iwanaga G.R., Vasta G.R., editors. *New directions in invertebrate immunology*. Fair Haven, NJ, USA: SOS Publications: 229-53.
- Söderhäll K., Cerenius L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 10: 23-28.
- Song Y.L., Hsieh Y.T., 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) haemocytes for generation of microbial substances: analysis of reactive oxygen species. *Developmental and Comparative Immunology*, 18: 201-209.
- Xu C., Li E., Liu Y., Wang X., Qin J., Chen L., 2017. Comparative proteome analysis of the hepatopancreas from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* under long-term low salinity stress. *Journal of Proteomics*, 162: 1-10.
- Wang L.U., Chen C.J., 2005. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. *Fish & Shellfish Immunology*, 18: 269-278.

Effect of salinity on innate immune response of black tiger shrimp

Vo Thi Tuyet Minh

Abstract

The purpose of this study was to examine the non-specific immune response of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) (0.84 ± 0.04 g) cultured at four different salinities of 5 ‰, 15 ‰, 25 ‰ and 35 ‰ for 20 weeks. The results showed that the immune parameters of black tiger shrimp cultured at salinity of 25 ‰ and 35 ‰ were higher than those of shrimp cultured at 5 ‰ ($p < 0.05$). The hyaline cell, granular cell, PO activity and lysozyme activity of shrimp reared at 25‰ and 35‰ were significantly higher than those of shrimp reared at 5‰. SOD activity of shrimp reared at 35‰ was significantly higher than those of shrimp reared at 5‰, 15‰, and 25‰ ($p < 0.05$). However, no significant difference in RB was found among four salinity levels. Phagocytic rate, phagocytic index of shrimp reared at 25‰ and 35‰ was significantly higher than those of shrimp that reared at 5‰ and 15‰ when challenged with *Vibrio alginolyticus* ($p < 0.05$). It was concluded that tiger shrimp *P. monodon* reared at 25‰ was higher immune parameters as well as resistance against *V. alginolyticus*.

Keywords: Tiger shrimp (*Penaeus monodon*), salinity, non-specific immune response, *Vibrio alginolyticus*

Ngày nhận bài: 23/02/2022

Người phản biện: TS. Bùi Thị Bích Hằng

Ngày phản biện: 23/3/2022

Ngày duyệt đăng: 28/4/2022