

Effects of water pH on susceptibility of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to acute hepatopancreatic necrosis disease *Vibrio parahaemolyticus*

Tuan V. Vo\*, Khuyen T. T. Phan, Huyen M. Huynh, Kieu T. N. Nguyen, & Dung T. Nguyen  
Faculty of Fisheries, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: July 03, 2018

Revised: December 02, 2018

Accepted: December 14, 2018

Keywords

Immune responses

*Litopenaeus vannamei*

pH

*Vibrio parahaemolyticus*

\*Corresponding author

Vo Van Tuan

Email: vovantuan@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

Effect of water pH on susceptibility of white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* to acute hepatopancreatic necrosis disease caused by *Vibrio parahaemolyticus* was carried out in laboratory condition. White leg shrimp (2 - 3 g) were challenged by immersion for 2 h with tryptic soy broth (TSB)-grown *Vibrio parahaemolyticus* at 10 times lower dose of LD<sub>50</sub>. The results showed that the cumulative mortality of *V. parahaemolyticus*-immersed shrimp after 240 h was increased from low to high pH water levels (23.3 ± 5.8% in pH 6.3; 30.0 ± 20.0% in pH 7.3; 86.7 ± 15.3 in pH 9.3, respectively). The cumulative mortality of shrimp that held in pH = 8.3 was the lowest (20.0 ± 0.0%). In another experiment, immune parameters such as total haemocytes count and respiratory burst of *Litopenaeus vannamei* held at different pH levels were examined at 0, 24, 48, 72 and 96 h. The results indicated that no significant difference of total haemocytes count was observed at different pH water levels (pH 6.3, 7.3, 8.3, 9.3) at 0 - 72 hpc (hour post challenge). At 96 hpc, total haemocytes count at high pH water level (9.3) was increased and significant difference in comparison with the total haemocytes count recorded in low pH water levels (6.3, 7.3, 8.3). Respiratory burst was also not different at different pH water levels at 0 hpc. However, respiratory burst of shrimp that held at low pH water levels (pH 6.3 and 7.3) was rapidly reduced and significant difference in compared with the shrimp that held in high pH water levels (pH 8.3 and 9.3). It was therefore concluded that low and high pH stress decrease the resistance of *Litopenaeus vannamei* against *V. parahaemolyticus* and decrease several parameters of the immune response.

**Cited as:** Vo, T. V., Phan, K. T. T., Huynh, H. M., Nguyen, K. T. N., & Nguyen, D. T. (2019). Effects of water pH on susceptibility of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to acute hepatopancreatic necrosis disease *Vibrio parahaemolyticus*. *The Journal of Agriculture and Development* 18(2), 88-96.

**Ảnh hưởng của pH nước lên khả năng nhạy cảm đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp *Vibrio parahaemolyticus* trên tôm thẻ (*Litopenaeus vannamei*)**

**Võ Văn Tuấn\*, Phan Thị Thanh Khuyên, Huỳnh Mỹ Huyền, Nguyễn Thị Ngọc Kiều & Nguyễn Trí Dũng**

Khoa Thủy Sản, Trường Đại Học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, TP. Hồ Chí Minh

**THÔNG TIN BÀI BÁO**

**Bài báo khoa học**

Ngày nhận: 03/07/2018  
 Ngày chỉnh sửa: 02/12/2018  
 Ngày chấp nhận: 14/12/2018

**Từ khóa**

Đáp ứng miễn dịch  
*Litopenaeus vannamei*  
 pH  
*Vibrio parahaemolyticus*

**\*Tác giả liên hệ**

Võ Văn Tuấn  
 Email: vovantuan@hcmuaf.edu.vn

**TÓM TẮT**

Nghiên cứu ảnh hưởng của pH nước lên khả năng nhạy cảm của tôm thẻ chân trắng *Litopenaeus vannamei* đối với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* được thực hiện trong điều kiện thực nghiệm. Tôm thẻ (2 - 3 g) được gây nhiễm bằng phương pháp ngâm 2 giờ với liều vi khuẩn gây nhiễm nhỏ hơn 10 lần liều LD<sub>50</sub> của chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Kết quả thí nghiệm cho thấy, tỷ lệ chết tích lũy của tôm sau 240 giờ tăng dần theo mức tăng của pH (23,3 ± 5,8%; 30,0 ± 20,0%; 86,7 ± 15,3% tương ứng với mức pH 6,3; 7,3 và 9,3). Tỷ lệ chết tích lũy của tôm được giữ ở mức pH 8,3 là thấp nhất (20,0 ± 0,0%). Trong một thí nghiệm khác, hệ thống miễn dịch tự nhiên của tôm như tổng tế bào máu và hoạt tính của gốc oxy hoá tự do (respiratory burst) được đánh giá khi tôm được nuôi ở các mức pH khác nhau trong thời gian 0, 24, 48, 72 và 96 giờ. Kết quả ghi nhận, không có sự khác biệt về tổng tế bào máu ở các mức pH khác nhau (pH 6,3, pH 7,3, pH 8,3, pH 9,3) ở thời điểm 0 - 72 giờ. Ở thời điểm 96 giờ, tổng tế bào máu ở nghiệm thức pH (9,3) cao hơn đáng kể và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với tổng tế bào máu được ghi nhận ở nghiệm thức pH thấp (6,3; 7,3; 8,3). Hoạt tính của gốc oxy hoá tự do (respiratory burst) không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P > 0,05$ ) ở các mức pH khác nhau ở thời điểm 0 giờ. Tuy nhiên, sau 24 và 48 giờ, hoạt tính của gốc oxy hóa tự do giảm đáng kể ở nghiệm thức pH thấp (pH 6,3 và 7,3) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức pH cao (pH 8,3 và 9,3) ( $P < 0,05$ ). Từ kết quả này có thể kết luận rằng sự biến động của pH nước đã làm suy giảm hệ miễn dịch trên tôm, từ đó ảnh hưởng rất lớn đến khả năng đề kháng bệnh hoại tử gan tụy cấp.

**1. Đặt Vấn Đề**

Tôm thẻ (*Litopenaeus vannamei*) là một trong những loài tôm được nuôi khá phổ biến hiện nay. Tuy nhiên, sự gia tăng diện tích nuôi và việc thâm canh hóa của nghề nuôi tôm dẫn đến sự xuất hiện và lây lan của nhiều bệnh nguy hiểm, đặc biệt là bệnh do vi khuẩn và virus, đã và đang gây ra những thiệt hại đáng kể cho người nuôi. Những năm gần đây, ngành nuôi tôm trên thế giới nói chung và Việt Nam nói riêng đang phải đối mặt với một dịch bệnh mới với tên gọi ban đầu là hội chứng chết sớm (Early Mortality Syndrome –

EMS) hay bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease – APHND). Khả năng bệnh bùng phát và lây lan rất nhanh. Bệnh xuất hiện đầu tiên tại Trung Quốc năm 2009, sau đó lây lan nhanh sang Việt Nam năm 2010, Malaysia năm 2011, Thái Lan năm 2012, Mexico năm 2014 và Philippines năm 2015 (Zorriehzahra & Banaederakhshan, 2015).

Hệ miễn dịch ở giáp xác cũng như các loài động vật không xương sống khác chủ yếu dựa vào cơ chế đáp ứng miễn dịch tự nhiên. Trong đó, tế bào máu giữ vai trò quan trọng trong quá trình đáp ứng miễn dịch nhằm chống lại các tác nhân

gây bệnh như vi khuẩn, nấm, ký sinh trùng... (Bachere & ctv., 2004; Jose & ctv., 2010; Matozzo & Marin, 2010). Tế bào máu ở giáp xác tham gia trực tiếp vào quá trình nhận diện, thực bào, phong toả và sản sinh ra các chất như phenoloxidase, reactive oxygen intermediates, superoxide dismutase (Song & Hsieh, 1994; Herández-López & ctv., 1996; Vo & ctv., 2015).

Quá trình thâm canh hóa có thể là nguyên nhân làm ảnh hưởng đến chất lượng môi trường nước ao nuôi, từ đó làm cho dịch bệnh dễ phát sinh. Các yếu tố môi trường nước trong ao nuôi biến động sẽ gây stress cho động vật thủy sản, từ đó làm cho vật nuôi dễ bị cảm nhiễm bởi các tác nhân gây bệnh cơ hội có sẵn trong ao nuôi. Theo Cheng & ctv. (2002), Liu & Chen (2004), Li & Chen (2008) thì sự biến động các yếu tố thủy lý hoá như nhiệt độ, độ mặn, oxy, NH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, pH nước, sẽ ảnh hưởng trực tiếp đến hệ miễn dịch của tôm thẻ *Litopenaeus vannamei* và tăng tính nhạy cảm bệnh với vi khuẩn *Vibrio alginolyticus*. Mức pH nước thấp (4,6 – 5) hoặc cao (9 – 9,5) đều ảnh hưởng đến hệ miễn dịch của tôm càng xanh *Macrobrachium rosenbergii* như giảm tế bào máu và hoạt tính của phenoloxidase cũng như khả năng kháng bệnh vi khuẩn *Lactococcus garvieae* (Cheng & ctv., 2003). Allan & ctv. (1992) cũng ghi nhận, pH nước ao thấp (4,9 – 6,4) ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của tôm sú *Penaeus monodon*. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá “Ảnh hưởng của pH nước lên khả năng nhạy cảm đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp *Vibrio Parahaemolyticus* trên tôm thẻ (*Litopenaeus Vannamei*)”.

## 2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Tôm thẻ (PL<sub>11</sub>), nhập từ Trại sản xuất tôm giống sạch bệnh của Công ty Việt Úc, được nuôi trong hệ thống tuần hoàn tại Trại thực nghiệm Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM. Tôm được cho ăn 2 lần/ngày với 5% trọng lượng thân. Nhiệt độ nước trong bể được duy trì ở mức 27 ± 1<sup>o</sup>C, pH 7,5 - 8,0, độ mặn 12 ± 1 g/L, độ kiềm > 80 mg/L, ammonia tổng < 0,5 mg/L và nitrite < 0,15 mg/L. Tôm với trọng lượng từ 2 - 3 g sẽ được chọn để tiến hành thí nghiệm.

Vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (EMS/APHND) được phân

lập, định danh và giữ giống ở điều kiện nhiệt độ -80<sup>o</sup>C tại phòng thí nghiệm Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Vi khuẩn và điều kiện nuôi cấy

Vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* được phục hồi trên môi trường TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salt) ở nhiệt độ 28<sup>o</sup>C trong 24 giờ. Chọn một khuẩn lạc cấy thuần sang môi trường TSA (Tryptic Soya Agar), bổ sung 1% NaCl, ở nhiệt độ 28<sup>o</sup>C trong 24 giờ. Sau đó chọn một khuẩn lạc riêng lẻ tăng sinh trong môi trường TSB (Tryptic Soya Broth), bổ sung 1% NaCl, ở nhiệt độ 28<sup>o</sup>C với số vòng lắc 150 vòng/phút trong 7 giờ. Mật độ vi khuẩn sẽ được xác định bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 610 nm.

#### 2.2.2. Thí nghiệm xác định giá trị LD<sub>50</sub> (Lethal Dose 50%) của chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

Thí nghiệm xác định giá trị LD<sub>50</sub> được bố trí theo phương pháp hoàn toàn ngẫu nhiên với bốn nghiệm thức có các liều gây nhiễm chênh lệch nhau 10 lần và một nghiệm thức đối chứng không gây nhiễm. Vi khuẩn sau khi tăng sinh trong môi trường TSB, bổ sung 1% NaCl, ở nhiệt độ 28<sup>o</sup>C trong 7 giờ với số vòng lắc 150 vòng/phút. Tiến hành gây bệnh thực nghiệm bằng cách cho trực tiếp huyền phù vi khuẩn vào bể thí nghiệm 50 L (chứa 18 L nước và 2 L canh vi khuẩn) để đạt được nồng độ pha loãng 10<sup>-1</sup>. Sau đó, lấy 2 L nước từ bể này cho vào bể thứ hai chứa 18 L nước để đạt nồng độ pha loãng 10<sup>-2</sup>. Tiếp tục làm như vậy cho cho bể thứ ba và thứ tư để đạt nồng độ pha loãng là 10<sup>-3</sup> và 10<sup>-4</sup>. Tôm được ngâm 2 giờ, sau đó rửa qua nước biển với độ mặn 12 ± 1 g/L và sẽ được bố trí vào bể thí nghiệm mới chứa 20 L nước. Mỗi bể được bố trí 20 tôm (2 - 3 g/con) tương ứng với một nồng độ pha loãng và được lặp lại 3 lần. Tôm ở bể đối chứng được ngâm trong 20 L nước với lượng TSB bằng với lượng TSB chứa huyền phù vi khuẩn trong bể thí nghiệm. Thí nghiệm được theo dõi trong 10 ngày. Tôm có biểu hiện bệnh lý sẽ được thu mẫu (gan tụy) cấy phân lập trên môi trường TCBS và Chromagar Vibrio. Giá trị LD<sub>50</sub> được tính theo công thức Reed & Muench (1938).

### 2.2.3. Ảnh hưởng của pH nước đến tỷ lệ chết tích lũy của tôm thẻ *Litopenaeus vannamei*

Thí nghiệm được bố trí trong các bể composite 50 L chứa 20 L nước với các mức pH khác nhau (pH 6,3; 7,3; 8,3; 9,3; 10,3), mỗi bể chứa 10 tôm có trọng lượng trung bình từ 2 - 3 g/con, sục khí liên tục và được lặp lại 3 lần.

Sử dụng dung dịch HCl 5N (hoặc NaOH 5N) để giảm (hoặc tăng) pH. Điều chỉnh pH cho đến khi tại mỗi bể đạt các giá trị pH như trên thì tiến hành cho tôm vào.

Thí nghiệm được thực hiện trong 240 giờ. pH trong các bể được giữ ổn định trong suốt thời gian thí nghiệm (đo và hiệu chỉnh pH hàng ngày). Ghi nhận lại số lượng tôm chết tại mỗi giá trị pH để xác định tỷ lệ chết tích lũy.

### 2.2.4. Ảnh hưởng của pH lên sự phát triển của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trong điều kiện in vitro

Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* sau khi được phục hồi trên môi trường TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salt) và cấy thuần trên môi trường TSA (Tryptic Soya Agar) sẽ được tăng sinh trong môi trường TSB (Tryptic Soya Broth, bổ sung 1% NaCl) ở các mức pH khác nhau (pH = 6,3 ± 0,2; 7,3 ± 0,2; 8,3 ± 0,2; 9,3 ± 0,2; 10,3 ± 0,2). Sử dụng dung dịch HCl 0,1N và NaOH 0,1N để điều chỉnh tăng hoặc giảm pH. Huyền phù vi khuẩn sẽ được ủ ở nhiệt độ phòng với số vòng lắc 150 vòng/phút. Sau đó, mẫu sẽ được thu ở các thời điểm như: 3, 6, 9, 12 và 24 hpi (hours post inoculation). Mật độ vi khuẩn sẽ được xác định bằng máy đo quang phổ (Model U-2000 spectrophotometer, Hitachi) ở bước sóng 610 nm và cấy chan trên môi trường TCBS để xác định tỷ lệ sống mật độ tế bào vi khuẩn sống ở các mức pH khác nhau.

### 2.2.5. Ảnh hưởng của pH nước lên hệ thống miễn dịch của tôm thẻ *Litopenaeus vannamei*

Thí nghiệm xác định ảnh hưởng của pH nước lên hệ thống miễn dịch của tôm thẻ được thực hiện trong điều kiện thực nghiệm. Tôm thẻ (2 - 3g) được bố trí ngẫu nhiên trong hệ thống bể composite 50 L. Mỗi bể chứa 20 L nước với các mức pH khác nhau (pH 6,3; 7,3; 8,3 và 9,3). Mức pH thực tế trong bể dao động từ 6,0 - 6,5 (pH 6,3), 7,0 - 7,5 (pH 7,3), 8,0 - 8,5 (pH 8,3), và 9,0 - 9,5 (pH 9,3). Mỗi bể sẽ được bố trí 10 con tương ứng với mỗi thời điểm thu mẫu và được lặp lại

3 lần. Nhiệt độ nước dao động từ 27 ± 1°C, độ mặn 12 ± 1 g/L, độ kiềm > 80 mg/L, ammonia tổng < 0,5 mg/L, và nitrite < 0,15 mg/L. Tôm sẽ được thu vào các thời điểm 0, 24, 48, 72 và 96 h sau khi bố trí vào bể thí nghiệm để lấy máu xác định các chỉ tiêu miễn dịch như tổng tế bào máu và hoạt tính của gốc oxy hoá tự do. Mỗi bể thu ngẫu nhiên 3 con.

Tổng tế bào máu: máu tôm được thu bằng cách dùng ống tiêm vô trùng 1 mL có chứa dung dịch chống đông (marine anticoagulant: 450 mM NaCl, 100 mM glucose, 30 mM trisodium citrate, 26 mM citric acid, 10 mM EDTA, pH 5,4) với tỷ lệ 1:1 (200 µL dung dịch chống đông; 200 µL máu tôm). Mật độ tế bào máu được xác định bằng buồng đếm hồng cầu và quan sát dưới kính hiển vi (Hansen, 2000).

Tổng tế bào máu (tb/mL) = tổng tế bào đếm được trong 4 ô lớn × 2500 × hệ số pha loãng.

Phương pháp xác định hoạt tính gốc oxy hoá tự do (respiratory burst): hoạt tính gốc oxy hoá tự do được xác định theo phương pháp của Song & Hsieh (1994) với một vài hiệu chỉnh. Mẫu máu sau khi thu được ly tâm với lực ly tâm 500 xg trong 10 phút ở 4°C, loại bỏ phần dịch phía trên, sau đó phần viên được hòa tan trong 1 mL môi trường nuôi cấy tế bào (L-15 medium). 100 µL mẫu máu được cho vào đĩa 96 giếng và được ủ ở nhiệt độ 27 - 28°C trong 30 phút. Loại bỏ phần dịch, sau đó cho vào 100 µL zymosan (0,1% zymosan trong Hanks' solution minus phenol red, Sigma). Ủ 30 phút ở nhiệt độ 27 - 28°C, loại bỏ zymosan, tế bào máu được rửa 3 lần với 100 µL dung dịch sPBS (shrimp phosphate buffered saline: 137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,75 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4). Mẫu được nhuộm với 100 µL dung dịch nitroblue tetrazolium chloride (NBT) (0,3%) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, rồi loại bỏ dung dịch NBT. Tế bào máu sau đó được rửa 3 lần với 100 µL methanol 70%, để khô, rồi hòa tan bằng cách thêm vào 120 µL KOH 2M và 140 µL dimethyl sulphoxide. Mẫu được đo bằng máy so màu dung cho microplate ở bước sóng 630 nm.

### 2.2.6. Ảnh hưởng của pH nước lên sự nhạy cảm của tôm thẻ *Litopenaeus vannamei* đối với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

pH nước sẽ được điều chỉnh bằng cách cho dung dịch HCl 5N (hoặc NaOH 5N) để giảm (hoặc tăng) pH. Trước khi tiến hành thí nghiệm, pH nước tại mỗi bể sẽ được điều chỉnh để đạt các giá

trị pH = 6,3; 7,3; 8,3 và 9,3.

Tôm sẽ được gây bệnh thực nghiệm thông qua phương pháp ngâm trong 2 giờ (dựa vào kết quả LD<sub>50</sub> của chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, pha loãng 10 lần). Tôm ở nghiệm thức đối chứng được ngâm trong 20 L nước với lượng TSB (Tryptic Soya Broth) bằng với lượng TSB chứa huyền phù vi khuẩn trong bể thí nghiệm ở các mức pH khác nhau. Mỗi bể được bố trí 20 tôm (2 - 3 g/con) tương ứng với một nồng độ pha loãng và được lặp lại 3 lần. Tôm sau khi gây bệnh sẽ được bố trí trở lại bể composite 50 L (chứa 20 L nước) với các mức pH khác nhau (6,3; 7,3; 8,3 và 9,3). Mức pH thực tế trong bể dao động từ 6,0 - 6,5 (pH 6,3), 7,0 - 7,5 (pH 7,3), 8,0 - 8,5 (pH 8,3), và 9,0 - 9,5 (pH 9,3). Giá trị pH trong bể sẽ được đo và hiệu chỉnh hàng ngày bằng dung dịch HCl 5N hoặc NaOH 5N. Thí nghiệm được theo dõi trong 240 giờ. Quan sát, ghi nhận triệu chứng bệnh tích và thu mẫu tôm chết để xác định tỷ lệ chết tích lũy. Mẫu tôm chết sẽ được tái phân lập trên môi trường TCBS và môi trường Chromagar Vibrio. Sau đó, vi khuẩn sẽ được định danh bằng IDS 14 GRNS (14 phản ứng sinh hoá dùng để định danh trực khuẩn gram âm) của Công ty Nam Khoa.

### 2.2.7. Phương pháp phân tích thống kê

Tất cả các số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel thông qua trắc nghiệm T-test với mức ý nghĩa 0,05%.

## 3. Kết Quả và Thảo Luận

### 3.1. Liều LD<sub>50</sub> của chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

Kết quả thí nghiệm cho thấy, tôm được gây nhiễm bởi chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* xuất hiện các triệu chứng bệnh như lơ đờ, phản xạ chậm và một vài con có dấu hiệu bỏ ăn sau 1 ngày gây nhiễm. Tôm bắt đầu chết sau 2 ngày gây nhiễm và số lượng tôm chết tăng dần đến ngày thứ 10. Kết quả phân lập những con tôm có biểu hiện bệnh cho thấy, vi khuẩn cho khuẩn lạc màu xanh trên môi trường TCBS và màu tím hoa cà trên môi trường Chromagar Vibrio. Kết quả định danh vi khuẩn bằng IDS 14 GRNS (14 phản ứng sinh hoá dùng để định danh trực khuẩn gram âm) của công ty Nam Khoa đã chứng minh được, vi khuẩn có các đặc điểm sinh hoá phù hợp với chủng *V. parahaemolyticus*.

Số lượng và tỷ lệ tôm chết ở các nghiệm thức

trong thí nghiệm xác định liều gây chết 50% động vật thí nghiệm (LD<sub>50</sub>) được trình bày qua Bảng 1. Kết quả kiểm tra cho thấy, mật độ vi khuẩn *V. parahaemolyticus* trong bình tăng sinh gốc đạt  $7,5 \times 10^8$  CFU/mL. Như vậy, liều gây nhiễm ở các nghiệm thức NT 10<sup>-1</sup>, NT 10<sup>-2</sup>, NT 10<sup>-3</sup>, NT 10<sup>-4</sup>, tương ứng với liều vi khuẩn gây nhiễm lần lượt là  $7,5 \times 10^7$  CFU/mL,  $7,5 \times 10^6$  CFU/mL,  $7,5 \times 10^5$  CFU/mL,  $7,5 \times 10^4$  CFU/mL. Từ kết quả này, chúng tôi tính toán được liều LD<sub>50</sub> (theo phương pháp của Reed & Muench, 1938) của chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* là  $4,7 \times 10^6$  CFU/mL.

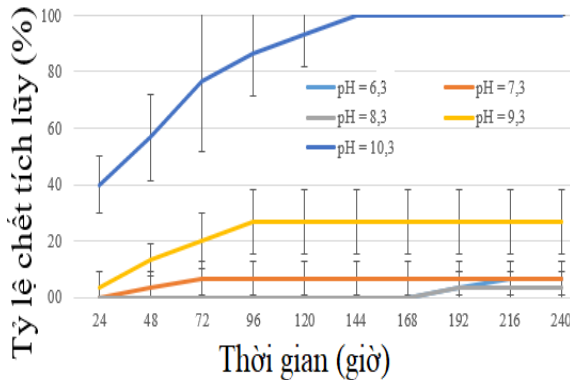
Các kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy rằng, liều LD<sub>50</sub> của chủng *Vibrio* cao hay thấp còn tùy thuộc vào chủng vi khuẩn, phương pháp gây nhiễm và kích cỡ tôm. Theo Robertson & ctv. (1998), liều LD<sub>50</sub> của vi khuẩn *V. harveyi* trên tôm thẻ post-larvae khi gây nhiễm bằng phương pháp ngâm trong 2 giờ là  $5,0 \times 10^6$  CFU/mL. Nghiên cứu gần đây của Lopez-Leon & ctv. (2016) cho thấy, liều LD<sub>50</sub> của chủng vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm thẻ *Penaeus vannamei* (0,1 - 0,5 g) bằng phương pháp ngâm (trong 72 giờ) là  $6,0 \times 10^4$  CFU/mL đến  $3,0 \times 10^5$  CFU/mL. Trong thí nghiệm này, tôm với kích cỡ 2 - 3 g được gây nhiễm bằng phương pháp ngâm trong 2 giờ với giá trị LD<sub>50</sub> đạt  $4,7 \times 10^6$  CFU/mL. Kết quả chúng tôi thu được không có sự khác biệt đáng kể so với các nghiên cứu của Robertson & ctv. (1998), tuy nhiên cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Lopez-Leon & ctv. (2016). Sự khác biệt này có thể là do sự khác biệt về kích cỡ tôm, thời gian gây nhiễm và độc tính của chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Kết quả cho thấy khả năng đề kháng của tôm nhỏ đối với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* kém hơn so với tôm lớn.

### 3.2. Ảnh hưởng của pH nước đến tỷ lệ chết tích lũy của tôm thẻ *Litopenaeus vannamei*

Kết quả nghiên cứu cho thấy tôm ở nghiệm thức pH cao (pH 9,3 và 10,3) xuất hiện các triệu chứng bệnh như lơ đờ, phản xạ chậm và bắt đầu chết sau 24 h thí nghiệm. Tỷ lệ chết tích lũy của tôm tăng dần theo mức tăng của pH nước. Sau 144 giờ, tỷ lệ chết tích lũy là 100% ở nghiệm thức pH 10,3; 27% ở nghiệm thức pH 9,3. Tỷ lệ chết tích lũy của tôm ở nghiệm thức pH cao (pH 9,3 và 10,3) cao hơn đáng kể và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với tỷ lệ chết tích lũy của tôm ở

**Bảng 1.** Số lượng và tỷ lệ tôm chết cộng dồn ở thí nghiệm xác định LD<sub>50</sub>

Nghiệm thức (NT)	Lần lặp lại	Tổng số tôm bố trí	Số tôm chết	Số tôm sống	Số tôm chết cộng dồn	Số tôm sống cộng dồn	Tỷ lệ chết cộng dồn (%)
NT 10 <sup>-1</sup>	3	60	60	0	105	0	100,00
NT 10 <sup>-2</sup>	3	60	32	28	45	28	61,64
NT 10 <sup>-3</sup>	3	60	9	51	13	79	14,13
NT 10 <sup>-4</sup>	3	60	4	56	4	135	2,87



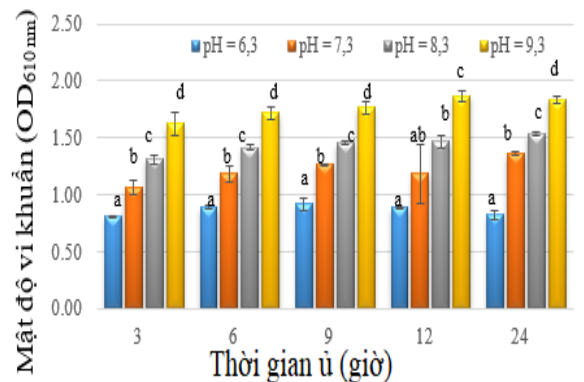
**Hình 1.** Ảnh hưởng của pH lên tỷ lệ chết tích lũy của tôm thẻ.

nghiệm thức pH thấp (pH 6,3; 7,3 và 8,3) (Hình 1).

Giáp xác nói chung rất nhạy cảm với sự thay đổi của các yếu tố môi trường, đặc biệt là chỉ tiêu pH. Theo Cheng & Chen (1998), sự biến động của chỉ tiêu pH nước ảnh hưởng rất lớn đến tỷ lệ sống cũng như khả năng đề kháng bệnh của tôm càng xanh *Macrobrachium rosenbergii*. Tôm càng xanh sẽ trở nên nhạy cảm hơn với tác nhân gây bệnh khi pH môi trường tăng cao (pH 8,8 - 9,5). Ngoài ra, pH nước thấp cũng làm chậm sự tăng trưởng của tôm sú *Penaeus monodon* (Allan & Maguire, 1992).

**3.3. Ảnh hưởng của pH lên sự phát triển của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus***

Sự phát triển của tác nhân vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp *Vibrio parahaemolyticus* trong môi trường TSB (Tryptic soya broth, bổ sung 1% NaCl) ở các mức pH khác nhau được kiểm tra trong thí nghiệm này. Kết quả cho thấy, vi khuẩn có thể phát triển ở các mức pH khác nhau, từ 6,3 - 9,3. Trong đó, khoảng pH thích hợp cho sự phát triển của vi khuẩn là 8,3 và 9,3. Mật độ vi khuẩn đạt cao nhất sau 24 giờ ở mức



**Hình 2.** Ảnh hưởng của pH lên sự phát triển của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 610 nm (OD<sub>610 nm</sub>) vào các thời điểm 3, 6, 9, 12, và 24 giờ. Các cột là trung bình của 3 lần lặp lại. Các cột trong cùng thời điểm với các ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ).

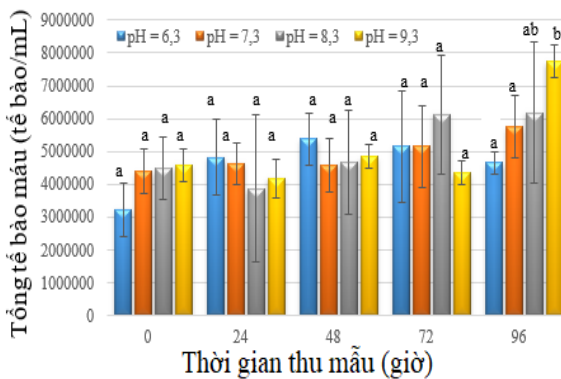
pH 7,3; 8,3; 9,3 và 9 giờ ở mức pH 6,3 (Hình 2).

Theo Arp (1988), các yếu tố môi trường nuôi cấy có thể ảnh hưởng đến sự phát triển và việc sản sinh ra độc tố của tác nhân vi khuẩn gây bệnh. Cheng & Chen (1999) ghi nhận điều kiện môi trường tối ưu cho sự phát triển của vi khuẩn *Lactococcus garvieae* trong môi trường brain heart infusion broth (BHIB) là pH từ 7 - 8, nhiệt độ 25 - 30°C. Độc tính của vi khuẩn *Lactococcus garvieae* đối với *Macrobrachium rosenbergii* tăng lên đáng kể khi được nuôi cấy trong môi trường BHIB bổ sung 0,5 - 1,0% NaCl. Bên cạnh đó, Kautsky & ctv. (2000) cũng chỉ ra rằng, sự biến động của các yếu tố môi trường như oxy, nhiệt độ và độ mặn ảnh hưởng rất lớn đến độc tố của vi khuẩn phát sáng *Vibrio harveyi*. Prayitno & Latchford (1995) chứng minh rằng việc phơi nhiễm vi khuẩn *V. harveyi* ở độ mặn thấp (10 - 15 ppt) trong khoảng thời gian 12 giờ trước khi gây nhiễm trên ấu trùng tôm sú *Penaeus monodon* cho kết quả tỷ lệ chết rất cao, trong khi phơi nhiễm vi khuẩn

ở mức pH 5,5 đã làm suy giảm độc tính của vi khuẩn. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trên tôm càng xanh *M. rosenbergii*. Tỷ lệ chết của tôm càng xanh giảm đáng kể khi được gây nhiễm bởi vi khuẩn *L. garvieae*, tăng sinh trong môi trường pH thấp (pH 6,0) và cao (pH 9,0) (Cheng & Chen, 1999).

### 3.4. Ảnh hưởng của pH lên hệ thống miễn dịch của tôm thẻ *Litopenaeus vannamei*

Kết quả định lượng cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P > 0,05$ ) về tổng tế bào máu khi tôm được nuôi ở các mức pH khác nhau ở thời điểm 0-72 giờ. Ở thời điểm 96 giờ, tổng tế bào máu ở nghiệm thức pH cao (9,3) cao hơn đáng kể và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với tổng tế bào máu được ghi nhận ở nghiệm thức pH thấp (6,3; 7,3; 8,3) (Hình 3).

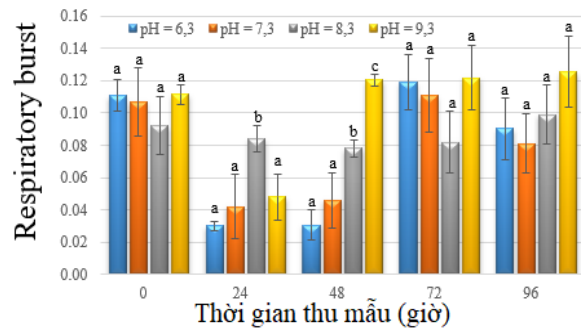


**Hình 3.** Sự thay đổi tổng tế bào máu của tôm thẻ *Litopenaeus vannamei* ở các mức pH khác nhau. Các cột là trung bình của 3 lần lặp lại. Các cột trong cùng thời điểm với các ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ).

Tế bào máu ở giáp xác giữ vai trò quan trọng trong hệ thống miễn dịch, thực hiện các chức năng như thực bào, đóng gói, lưu trữ và phóng thích pro-phenoloxidase (Johansson & ctv., 2000). Sau khi bị sốc bởi các yếu tố môi trường như nhiệt độ, độ mặn,  $\text{NH}_3$ , pH,... hệ miễn dịch của tôm bị suy yếu, từ đó ảnh hưởng đến sự biến động của tổng tế bào máu và đây cũng được xem là triệu chứng bình thường trong quá trình đáp ứng miễn dịch tự nhiên của giáp xác. Kết quả thí nghiệm cho thấy tổng tế bào máu ở tôm được giữ ở các mức pH nước khác nhau dường như có sự biến động ở các thời điểm thu mẫu từ 0 - 72 giờ. Tuy nhiên, kết quả phân tích thống kê cho

thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa. Kết quả nghiên cứu của Li & Chen (2008) đã chứng minh rằng khi tôm thẻ được nuôi ở mức pH thấp và cao thì ảnh hưởng rất lớn đến sự biến động của tổng tế bào máu.

Hoạt tính của gốc oxy hoá tự do (respiratory burst) không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P > 0,05$ ) ở các mức pH khác nhau ở thời điểm 0 giờ. Tuy nhiên, sau 24 và 48 giờ, hoạt tính của gốc oxy hoá tự do giảm đáng kể ở nghiệm thức pH thấp (pH 6,3 và 7,3) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức pH cao (pH 8,3 và 9,3) ( $P < 0,05$ ). Ở những thời điểm thu mẫu tiếp theo, không có sự khác biệt về hoạt tính gốc oxy hóa tự do giữa các mức pH khác nhau (Hình 4). Nguyên nhân của sự khác biệt về hoạt tính gốc oxy hóa tự do ở thời điểm 24 và 48 giờ có thể là do chức năng miễn dịch tự nhiên của tôm bị suy yếu sau khi tôm được chuyển từ mức pH thích hợp (pH 7,8 - 8,3) sang các mức pH thấp và pH cao. Ở các thời điểm thu mẫu tiếp theo (72 và 96 giờ), hoạt tính của gốc oxy hoá tự do ở các mức pH đều tăng có thể là do hệ miễn dịch của tôm đã dần phục hồi trở lại.



**Hình 4.** Sự thay đổi hoạt tính gốc oxy hoá tự do (respiratory burst) của tôm thẻ *Litopenaeus vannamei* ở các mức pH khác nhau. Các cột là trung bình của 3 lần lặp lại. Các cột trong cùng thời điểm với các ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ).

### 3.5. Ảnh hưởng của pH lên sự nhạy cảm của tôm thẻ đối với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

*Vibrio* được xem là tác nhân vi khuẩn gây bệnh cơ hội cho tôm nuôi. Các yếu tố gây stress như thiếu ăn (bỏ đói), sốc độ mặn,  $\text{NH}_3$ , pH,  $\text{NO}_2$ , thương tổn được xem như là yếu tố nguy hiểm đầu tiên tạo điều kiện cho sự phát triển và bùng

phát bệnh. Brock & Lightner (1990) chỉ ra rằng, tôm bị nhiễm bệnh *Vibrio* thường kết hợp với các yếu tố khác như thương tổn, stress, hoặc kết hợp với các tác nhân gây bệnh khác. Kết quả nghiên cứu cho thấy tôm ở nghiệm thức gây nhiễm có các dấu hiệu như bỏ ăn, lơ đãng và chết rải rác. Tôm chết bắt đầu xuất hiện ở nghiệm thức pH 7,3 và 9,3 sau 24 giờ thí nghiệm (Bảng 2). Tỷ lệ chết tích lũy ở nhóm gây nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* sau 240 h tăng dần theo mức tăng của pH ( $23,3 \pm 5,8\%$ ;  $30,0 \pm 20,0\%$ ;  $86,7 \pm 15,3\%$  tương ứng với mức pH 6,3; 7,3 và 9,3). Tỷ lệ chết tích lũy của tôm ở mức pH 6,3; 7,3 và 8,3 thấp hơn đáng kể so với mức pH 9,3. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được ghi nhận khi mức pH nước đạt 8,3 và 9,3 ( $P < 0,05$ ).

Li & Chen (2008) ghi nhận, tôm thẻ *Litopenaeus vannamei* sẽ trở nên nhạy cảm hơn với tác nhân gây bệnh *Vibrio alginolyticus* khi được nuôi ở điều kiện pH thấp (6,5) và cao (10,1). Khả năng thực bào và loại thải vi khuẩn ở tôm được nuôi trong điều kiện pH thấp và cao thấp hơn nhiều so với tôm được nuôi ở pH 8,2. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy, tôm thẻ *L. vannamei* sẽ trở nên nhạy cảm hơn với tác nhân vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp *V. parahaemolyticus* khi pH nước dao động trong khoảng 8,5 - 9,5. Từ những vấn đề này có thể thấy, khi các yếu tố môi trường thay đổi, đặc biệt là sự biến động của chỉ tiêu pH nước (pH nước xuống thấp hoặc tăng cao) sẽ làm suy giảm quá trình đáp ứng miễn dịch, từ đó sẽ tạo điều kiện cho mầm bệnh phát triển và gây bệnh cho vật nuôi.

**4. Kết Luận**

Nghiên cứu đã chứng minh rằng, pH ảnh hưởng đến sự phát triển của tác nhân vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm thẻ. Bên cạnh đó, sự biến động của pH nước, đặc biệt là khi pH nước xuống thấp (pH 6,3 và 7,3) đã làm suy giảm hệ miễn dịch trên tôm (tổng tế bào máu và hoạt tính gốc oxy hóa tự do), từ đó ảnh hưởng rất lớn đến khả năng nhạy cảm với bệnh hoại tử gan tụy cấp.

**Tài Liệu Tham Khảo (References)**

Allan, G. L., & Maguire, G. B. (1992). Effects of pH and salinity on survival, growth and osmoregulation in *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture* 107(1), 33-47.

Arp, L. H. (1988). Bacterial infection of mucosal surface: an overview of cellular and molecular mechanisms. In Roth, J. A. (Ed). *Virulence mechanisms of bacterial*

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của pH lên tỷ lệ chết tích lũy của tôm thẻ *Litopenaeus vannamei* cảm nhiễm vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* ở các mức pH khác nhau<sup>1</sup>

pH	Liều vi khuẩn (CFU/mL)	Số lượng tôm	Tỷ lệ chết tích lũy (%)					
			24 giờ	48 giờ	96 giờ	144 giờ	240 giờ	
6,3	0	30	0	0	6,7 ± 11,5	6,7 ± 11,5	10,0 ± 10,0	10,0 ± 10,0
	$4,7 \times 10^5$	30	0	3,3 ± 5,8	6,7 ± 5,8	13,3 ± 5,8	23,3 ± 5,8	23,3 ± 5,8
7,3	0	30	6,7 ± 5,8	6,7 ± 5,8	6,7 ± 5,8	6,7 ± 5,8	10,0 ± 10,0	10,0 ± 10,0
	$4,7 \times 10^5$	30	10,0 ± 10,0	10,0 ± 10,0	20,0 ± 10,0	23,3 ± 11,5	30,0 ± 20,0	30,0 ± 20,0
8,3	0	30	0	0	5,0 ± 7,1*	5,0 ± 7,1*	5,0 ± 7,1*	5,0 ± 7,1*
	$4,7 \times 10^5$	30	0	5,0 ± 7,1	20,0 ± 0,0*	20,0 ± 0,0*	20,0 ± 0,0*	20,0 ± 0,0*
9,3	0	30	3,3 ± 5,8*	6,7 ± 5,8*	13,3 ± 5,8*	20,0 ± 17,3*	20,0 ± 17,3*	20,0 ± 17,3*
	$4,7 \times 10^5$	30	26,7 ± 5,8*	40,0 ± 10,0*	66,7 ± 5,8*	83,3 ± 15,3*	86,7 ± 15,3*	86,7 ± 15,3*

<sup>1</sup>Các giá trị thể hiện trên bảng là số trung bình ± độ lệch chuẩn. Ký hiệu (\*) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nghiệm thức trong cùng một cột ( $P < 0,05$ ).



- pathogens* (3-27). Washington DC, USA: American Society for Microbiology.
- Bachere, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., De Lorgeril, J., Garnier, J., & Romestand, B. (2004). Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological Reviews* 198, 149-168.
- Brock, J. A., & Lightner, D. V. (1990). Diseases of Crustacea. In Kinne, O. (Ed.). *Disease of marine animals vol 3* (245-249). Helgoland, Germany: Biologische Anstalt Helgoland.
- Cheng, W., & Chen J.C. (1999). Effect of cultivation broth pH, temperature and NaCl concentration on virulence of an Enterococcus-like bacterium to the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Diseases of aquatic organisms* 36, 233-237.
- Cheng, W., & Chen, J. C. (1998). Enterococcus-like infections in *Macrobrachium rosenbergii* are exacerbated by high pH and temperature but reduced by low salinity. *Diseases of aquatic organisms* 34(2), 103-108.
- Cheng, W., Chen, S. M., Wang, F. I., Hsu, P. I., Liu, C. H., & Chen, J. C. (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, 111-21.
- Cheng, W., Liu, C. H., & Chen, J. C. (2002). Effect of nitrite on interaction between the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its pathogen *Lactococcus garvieae*. *Diseases of aquatic organisms* 50, 189-197.
- Hansen, P. J. (2000). *Use of a hemacytometer*. Laboratory procedures, Department of Animal Sciences, University of Florida, Florida, USA.
- Herández-López, J., Gollas-Galván, T. S., & Vargas-Albores, F. (1996). Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). *Comparative Biochemical Physiology* 113C, 61-66.
- Johansson, M. W., Keyser P., Sritunyalucksana, & Söderhäll K. (2000). Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191, 45-62.
- Jose, S., Mohandas, A., Philip, R., & Bright Singh, I. (2010). Primary hemocyte culture of *Penaeus monodon* as an *in vitro* model for white spot syndrome virus titration, viral and immune related gene expression and cytotoxicity assays. *Journal of Invertebrate Pathology* 105, 312-321.
- Kautsky, N., Ronnback, P., Tedengren, M., & Troell, M. (2000). Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* 191, 145-161.
- Lee, C. T., Chen, I. T., Yang, Y. T., Ko, T. P., Huang, Y. T., & Huang, J. Y. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A* 112, 10798-10803.
- Li, C. C., & Chen, J. C. (2008). The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under low and high pH stress. *Fish & shellfish immunology* 25, 701-709.
- Liu, C.H., & Chen, J.C. (2004). Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish and shellfish immunology* 16, 321-334.
- Lopez-Leon, P., Luna-Gonzalez, A., Escamilla-Montes, R., Flores-Miranda, M. C., Fierro-Coronado, J. A., Alvarez-Ruiz, P., & Diarte-Plata, G. (2016). Isolation and characterization of infectious *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND, from the white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Latin American Journal of Aquatic Research* 44(3), 470-479.
- Matozzo, V., & Marin, M. G. (2010). The role of haemocytes from the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda) in immune responses: A first survey. *Fish & Shellfish Immunology* 28, 534-541.
- Prayitno, S. B., & Latchford, J. W. (1995). Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. *Aquaculture* 132, 105-112.
- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Hygiene* 27, 493-497.
- Robertson, P.A.W., Calderon, J., Carrera, L., Stark, J.R., Zherdmant, M., & Austin, B. (1998). Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Diseases of Aquatic Organism* 32, 151-155.
- Song, Y. L., & Hsieh, Y. T. (1994). Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of micribicidal substances: Analysis of reactive oxygen species. *Developmental and Comparative Immunology* 18, 201-209.
- Tran, L. H., Nunan, L., Redman, R. M., Mohney, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons K., & Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organism* 105(1), 45-55.
- Vo, T. V., Dantas-Lima, J. J., Khuong, T. V., Li, W., Grauwet, K., Bossier, P., & Nauwynck, H. J. (2015). Differences in uptake and killing of pathogenic and non-pathogenic bacteria by haemocyte subpopulations of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei*, (Boone). *Journal of Fish Diseases* 39(2), 163-174.
- Zorriehzahra, M., & Banaederakhshan, R. (2015). Early mortality syndrome (EMS) as new emerging threat in shrimp industry. *Advances in Animal Veterinary Sciences* 3, 64-72.