

ẢNH HƯỞNG CỦA EPINEPHRINE LÊN ĐỘC LỰC CỦA VI KHUẨN*Vibrio harveyi* **TRÊN TÔM THẺ CHÂN TRẮNG** (*Litopenaeus vannamei*)**Nguyễn Đức Quỳnh Anh*, Nguyễn Thị Huệ Linh, Nguyễn Nam Quang, Huỳnh Văn Vi,
Nguyễn Ngọc Phước**

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

*Tác giả liên hệ: nguyenducquynhanh@huaf.edu.vn

Nhận bài: 07/06/2023 Hoàn thành phản biện: 12/07/2023 Chấp nhận bài: 17/07/2023

TÓM TẮT

Vibrio harveyi là tác nhân chính gây bệnh phát sáng trên tôm và là tác nhân gây bệnh trên nhiều đối tượng động vật thủy sản, ảnh hưởng nghiêm trọng đến nghề nuôi thủy sản trên thế giới. Trong điều kiện vật chủ căng thẳng (stress), vi khuẩn được cho là có phản ứng lại với các stress hormone, kết quả làm tăng tốc độ phát triển và gia tăng độc lực. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định sự ảnh hưởng của các nồng độ stress hormone epinephrine khác nhau (25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M) lên độc lực của vi khuẩn *V. harveyi*. Kết quả nghiên cứu cho thấy, nồng độ epinephrine (nồng độ 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M) làm tăng khả năng di động, tăng hoạt tính thủy phân các enzyme lipase, phospholipase, haemolysin và caseinase nhưng không ảnh hưởng đến hoạt tính của chitinase. Thí nghiệm cảm nhiễm trên tôm thẻ chân trắng với vi khuẩn *V. harveyi* được nuôi trong môi trường có bổ sung epinephrine 50 μ M, làm giảm tỷ lệ sống của tôm thẻ chân trắng thí nghiệm so với nghiệm thức đối chứng.

Từ khóa: *Vibrio harveyi*, Độc lực vi khuẩn, Epinephrine, Hoạt tính enzyme thủy phân

IMPACT OF EPINEPHRINE ON VIRULENCE FACTORS OF*Vibrio harveyi* **IN WHITE-LEG SHRIMP** (*Litopenaeus vannamei*)**Nguyen Duc Quynh Anh, Nguyen Thi Hue Linh, Nguyen Nam Quang, Huynh Van Vi,
Nguyen Ngoc Phuoc**

University of Agriculture and Forestry, Hue University

ABSTRACT

Vibrio harveyi, the major causal agent of luminescent vibriosis, is one of the most important pathogens of marine aquatic animals, causing significant losses in aquaculture industry worldwide. It has been found that bacteria are able to respond to chemicals releasing by the hosts during stress (stress hormones) resulted in increasing bacterial growth and virulence. This research was aimed to determine the effect of different concentrations of stress hormone epinephrine (25 μ M, 50 μ M, 100 μ M and 200 μ M) on virulence factors of *V. harveyi*. The results showed that epinephrine (50 μ M, 100 μ M and 200 μ M) enhanced swimming motility and increased the productions of lipase, phospholipase, haemolysin and caseinase (but not chitinase) in *V. harveyi* compared to those in controls. Results from challenge test indicated that pre-treated *V. harveyi* with epinephrine 50 μ M showed significant lower survival rate of white-leg shrimp in comparison with untreated ones.

Keywords: *Vibrio harveyi*, Bacterial virulence factors, Epinephrine, Lytic enzyme activity

1. MỞ ĐẦU

Vibrio harveyi là tác nhân chính gây bệnh phát sáng trên tôm, và là một trong những tác nhân gây bệnh nguy hiểm trên cả động vật không xương sống và động vật có xương sống nước mặn, gây nhiều tổn thất nghiêm trọng cho nghề nuôi trồng thủy sản trên khắp thế giới (Austin và Zhang, 2006; Defoirdt và cs., 2012). Bệnh do vi khuẩn *V. harveyi* đã được báo cáo gây chết hàng loạt ấu trùng tôm he ở Philippines, Thái Lan, Ấn Độ, Indonesia, Úc, Venezuela và Ecuador (Soto-Rodriguez và cs., 2003) và tỷ lệ chết có thể đạt tới 100% ở giai đoạn giống trong các trại nuôi (Ruwandeeepika và cs., 2012). Ngoài ra, *V. harveyi* đã được xác định là tác nhân cơ hội trên nhiều đối tượng khác, chúng có khả năng sản sinh nhiều yếu tố độc lực liên quan đến khả năng gây bệnh, bao gồm: (i) có khả năng di động và bám dính, (ii) sản sinh các polysaccharides ngoại bào và hình thành màng sinh học biofilm; (iii) sản sinh nhiều enzyme thủy phân; (iv) khả năng thu thập và tích lũy sắt; (v) khả năng cảm nhận và nhận biết vật chủ; và (vi) tạo thành thể thực khuẩn (Natrash và cs., 2011, Ruwandeeepika và cs., 2012).

Các vi sinh vật có khả năng cảm nhận và phát hiện các chất hóa học được tiết ra từ vật chủ như hormone (Hughes và Sperandio, 2008; Sharaff và Freestone, 2011). Khả năng nhận biết này giúp vi sinh vật có thể phát hiện các ký chủ tiềm năng và sau đó gia tăng sự biểu hiện gen của cá thể nhằm tăng độc lực và xâm nhập vào vật chủ (Sharaff và Freestone, 2011). Nhiều nghiên cứu tập trung vào mối liên hệ giữa vi khuẩn và các loại hormone, đặc biệt là các hormone phản ánh tình trạng căng thẳng của vật chủ (stress hormone - được tiết ra khi vật chủ bị stress), bao gồm epinephrine, norepinephrine và dopamine (Lyte và Freestone, 2010; Lyte và cs., 2011; Sharaff và Freestone, 2011). Sự gia tăng hàm lượng

stress hormone đã được chứng minh làm giảm chức năng miễn dịch tế bào của vật chủ (Reiche và cs., 2005), đồng thời làm tăng mật độ phát triển và độc lực của vi khuẩn (Belay và cs., 2003; Kinney và cs., 1999; Sharaff và Freestone, 2011). Lesouhaitier và cs. (2009) đã chỉ ra mối tương quan dương giữa hàm lượng stress hormone là catecholamine với các yếu tố độc lực như sản sinh các enzyme ngoại bào, độc tố, các phần tử kết dính cũng như màng sinh học (biofilm) và quorum sensing ở nhiều vi khuẩn Gram (-) (Lesouhaitier và cs., 2009). Khả năng phản ứng của vi khuẩn với sự tồn tại của các stress hormone được báo cáo ở nhiều vi khuẩn, bao gồm: *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* (Lyte và Ernst, 1992), *Listeria monocytogenes* (Coulanges và cs., 1997), *Aeromonas hydrophila* (Kinney và cs., 1999), *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (Belay và cs., 2003), *Vibrio parahaemolyticus* (Nakano và cs., 2007; Pande và cs., 2014), *Vibrio harveyi* (Pande và cs., 2014; Yang và cs., 2014), và *Yersinia ruckeri* (Torabi Delshad và cs., 2019).

Sự biến động lớn của các yếu tố môi trường như độ mặn, NH₃, NO₂ sẽ làm tăng nồng độ các axit amin sinh học (biogenic amines) như norepinephrine và dopamine trong máu, làm giảm đáp ứng miễn dịch, và tăng khả năng nhiễm bệnh trên động vật thủy sản (Lacoste và cs., 2001; Malham và cs., 2003; Cheng và cs., 2006). Norepinephrine và dopamine được xem là các loại hormone (crustacean hyperglycaemic hormone - CHH) làm tăng hàm lượng glucose trong máu tôm sú (Kuo và cs., 1996). Khi norepinephrine được tạo ra khi tôm thẻ chân trắng bị stress thì các chỉ tiêu miễn dịch như tổng số tế bào máu, khả năng thực bào, hoạt động sản sinh enzyme phenoloxidase, lysozyme đều giảm (Cheng

và cs., 2016). Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu về độc lực của vi khuẩn *V. harveyi*, tuy nhiên việc nâng cao hiểu biết về độc lực của vi khuẩn này trong môi trường có mặt stress hormone vẫn còn nhiều hạn chế. Sự hiện diện của hormone norepinephrine và dopamine có khả năng làm tăng tốc độ phát triển và một số yếu tố độc lực của vi khuẩn *V. harveyi* (Pande và cs., 2014; Yang và cs., 2014). Tuy vậy, đến nay vẫn chưa có nghiên cứu nào về ảnh hưởng của stress hormone epinephrine lên độc lực của vi khuẩn *V. harveyi* trên tôm thẻ chân trắng. Do đó nghiên cứu này thực hiện với mục tiêu nâng cao hiểu biết về độc lực của vi khuẩn *V. harveyi* dưới sự ảnh hưởng của epinephrine.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

2.1.1. *Ảnh hưởng của các nồng độ epinephrine khác nhau lên hoạt tính một số enzyme do V. harveyi sản sinh (lipase, phospholipase, caseinase, haemolysin và chitinase)*

2.1.2. *Ảnh hưởng của hormone epinephrine lên khả năng di động của vi khuẩn V. harveyi*

2.1.3. *Tỷ lệ sống của tôm thẻ chân trắng cảm nhiễm vi khuẩn V. harveyi trong môi trường có hoặc không bổ sung epinephrine*

2.2. Vật liệu nghiên cứu

2.2.1. *Vi khuẩn và điều kiện nuôi cấy*

Vi khuẩn *V. harveyi* phân lập từ mẫu tôm bị bệnh phát sáng tại tỉnh Thừa Thiên Huế được sử dụng trong tất cả các thí nghiệm của nghiên cứu này. Vi khuẩn được giữ giống trong môi trường thạch lỏng Tryptic soy broth (TSB) (Sigma- Aldrich) bổ sung 2% muối NaCl (TSB+2%NaCl) có bổ sung glycerol 20% và bảo quản ở -80°C. Trong mỗi thí nghiệm, vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường TSB+2%NaCl với máy lắc vận tốc 100 rpm trong 24 giờ ở nhiệt độ 28°C. Mật độ vi khuẩn được xác

định bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 600 nm.

2.2.2. *Hormone epinephrine*

Epinephrine (Sigma-Aldrich) được pha trong dung dịch axit hydrochloride (HCl 0,1N) để tạo dung dịch gốc 10 mM. Dung dịch này được lọc qua giấy lọc (0,2 µm) và bảo quản ở -20°C.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. *Ảnh hưởng của các nồng độ epinephrine khác nhau lên hoạt tính một số enzyme do V. harveyi sản sinh (lipase, phospholipase, caseinase, haemolysin và chitinase)*

Ảnh hưởng của hormone epinephrine lên hoạt tính enzyme của *V. harveyi* được thực hiện theo hướng dẫn của Yang và cs. (2014) với một số thay đổi nhỏ. Môi trường Tryptic soy agar (TSA) (Sigma-Aldrich) có bổ sung 2% muối (TSA+2%NaCl) đã được hấp tiệt trùng (121°C, 15 phút tại 15 psi) và để nguội tới 55°C, sau đó được trộn với các cơ chất và epinephrine với các nồng độ khác nhau (0 µM - đối chứng, 25 µM, 50 µM, 100 µM và 200 µM). Hoạt tính thủy phân của enzyme lipase được thực hiện bằng cách nhỏ 5µL huyền phù vi khuẩn (OD₆₀₀ =0,5) trên đĩa thạch có chứa epinephrine và 1% Tween 80 (Sigma – Aldrich). Tất cả đĩa thạch được ủ tại 28°C trong 48h, sau đó tỷ lệ giữa đường kính vòng thủy phân xung quanh khuẩn lạc và đường kính khuẩn lạc được đo và ghi lại. Hoạt tính của enzyme phospholipase, caseinase, haemolysin và chitinase được thực hiện tương tự, bằng cách bổ sung cơ chất vào môi trường là 1% nhũ tương lòng đỏ trứng (Sigma-Aldrich) để xác định hoạt tính phospholipase, hoặc 4% bột sữa tách béo (Woolworths, Úc) cho việc xác định hoạt tính phospholipase, hoặc 5% máu cừu cho hoạt tính haemolysin hoặc 0,1% bột colloidal chitin (Himedia, Ấn Độ) để thử hoạt tính chitinase. Thí nghiệm được bố trí

với 6 lần lặp lại cho mỗi hoạt tính và nồng độ nghiên cứu.

2.3.2. Ảnh hưởng của hormone epinephrine lên khả năng di động của vi khuẩn *V. harveyi*

Khả năng di động của vi khuẩn được thực hiện theo hướng dẫn của Yang và cs. (2014). Thí nghiệm được thực hiện trong môi trường thạch mềm TSB+2% NaCl (chứa 0,3% agar) có bổ sung epinephrine với các nồng độ (0 μ M - đối chứng, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M). 5 μ L dung dịch huyền phù vi khuẩn ($OD_{600} = 0,5$) được nhỏ trên bề mặt thạch mềm và ủ tại nhiệt độ 28°C. Đường kính vòng di động xung quanh khuẩn lạc được đo sau khi ủ 24h. Tất cả các nồng độ được thực hiện lặp lại ít nhất 6 lần.

2.3.3. Tỷ lệ sống của tôm thẻ chân trắng cảm nhiễm vi khuẩn *V. harveyi* trong môi trường có bổ sung hoặc không bổ sung epinephrine

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí trong bể nhựa (80L) đã được khử trùng. Sau đó cấp nước mặn 20 ‰ vào khoảng 2/3 thể tích và sục khí liên tục.

Tôm thí nghiệm: Tôm thẻ chân trắng có trọng lượng 2-2,5 g/con, kích cỡ đồng đều, màu sắc tươi sáng, được kiểm dịch không mang mầm bệnh *Vibrio parahaemolyticus* (hoại tử gan tụy cấp), *Whispovirus* (bệnh đốm trắng), và *Okavirus* (bệnh đầu vàng) tại Trạm xá Thú y, Chi cục Chăn nuôi và Thú y Thừa Thiên Huế. Mật độ nuôi 20 con/bể. Trước khi tiến hành thí nghiệm, 10 con tôm được chọn ngẫu nhiên để kiểm tra vi khuẩn bằng cách lấy mẫu gan tụy cấy trực tiếp trên môi trường TSA+2%NaCl và môi trường TCBS.

Chuẩn bị vi khuẩn: Vi khuẩn được nuôi tăng sinh 24 giờ ở 28°C trong môi trường thạch lỏng TSB+2%NaCl, có hoặc không bổ sung epinephrine. Nồng độ epinephrine sử dụng trong thí nghiệm này

được xác định dựa vào kết quả thử độc lực của vi khuẩn trong thí nghiệm ở nội dung 1 và 2 (50 μ M). Sau 24h nuôi cấy, dung dịch huyền phù vi khuẩn được ly tâm và rửa 2 lần bằng dung dịch NaCl 0,85%. Mật độ vi khuẩn trong thí nghiệm cảm nhiễm được xác định dựa vào liều lượng gây chết 60% - LD_{60} là 10^6 CFU/mL (đã được xác định, số liệu không công bố). Tôm được cảm nhiễm bằng phương pháp ngâm trong môi trường nước có chứa vi khuẩn (vi khuẩn được nuôi trong môi trường có bổ sung hoặc không bổ sung epinephrine) và nghiệm thức đối chứng (không bổ sung vi khuẩn) trong 15 phút. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần cho mỗi nghiệm thức. Tôm sau khi cảm nhiễm được nuôi trong hệ thống nước chảy tốc độ 14 L/phút, nhiệt độ 28-30°C. Tôm được cho ăn 2 lần/ngày (vào lúc 8h và 16h) với khối lượng tương đương 2% trọng lượng thân bằng thức ăn CP. (Việt Nam) và chế độ sục khí liên tục 24 giờ/ngày ($DO \geq 5$ mg/L). Chế độ xi phông và thay nước (25%) được thực hiện hàng ngày. Tỷ lệ chết (TLC) được theo dõi và xác định trong 14 ngày. Tỷ lệ chết được xác định bằng công thức sau: $TLC = (\text{số tôm chết}) \times 100 / \text{tổng số tôm thí nghiệm}$.

2.3.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được thu thập và so sánh bằng phần mềm SPSS phiên bản (IBM SPSS 23.0). Phân bố chuẩn và sự đồng nhất phương sai được xem xét bằng test Shapiro-Wilk và Levene's test trước khi so sánh ANOVA. Tất cả số liệu được so sánh giá trị trung bình bằng ANOVA với phép thử Tukey post hoc test hoặc So sánh nhiều cặp - Multiple comparisons of Dunnett T3 (giả định phương sai không đồng nhất) với mức ý nghĩa $p < 0,05$. Phân tích tỷ lệ sống Kaplan-Meier (Survival analysis) và tất cả đồ thị được xử lý và vẽ bằng phần mềm GraphPad Prism 9.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

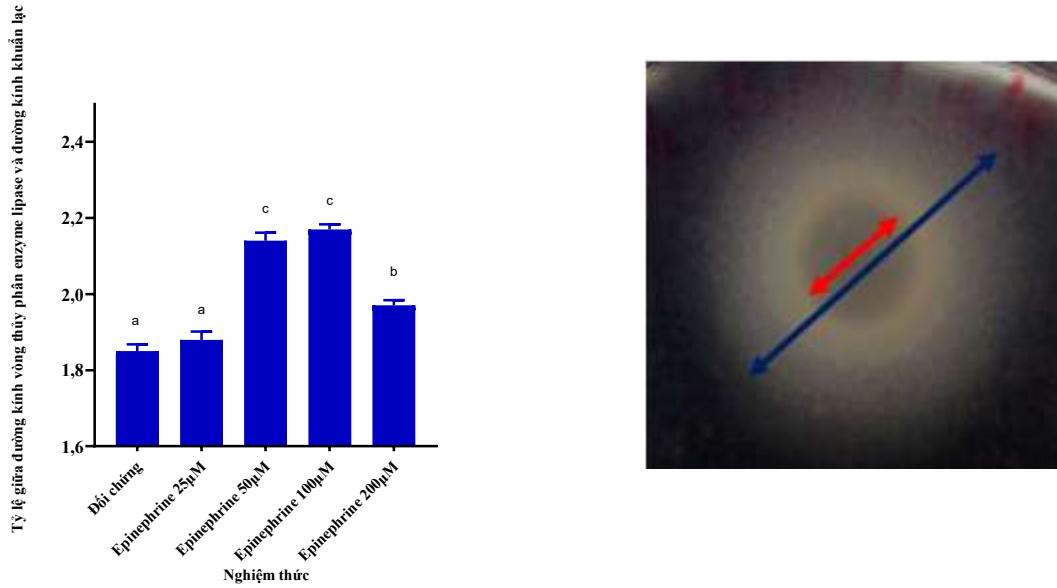
3.1. Ảnh hưởng của các nồng độ epinephrine khác nhau lên hoạt tính một số enzyme do *V. harveyi* sản sinh

Các enzyme ngoại bào của vi khuẩn *V. harveyi* như lipase, phospholipase, haemolysin, chitinase và caseinase góp phần tạo độc lực của vi khuẩn, đóng vai trò quan trọng trong quá trình xâm nhập và gây bệnh ở vật chủ (Darshane Ruwandepika và cs., 2012). Ảnh hưởng của epinephrine lên hoạt động thủy phân của một số enzyme được trình bày ở Hình 1, 2, 3, 4 và 5. Kết quả cho thấy, trong tất cả các enzyme khảo sát, enzyme chitinase không bị ảnh hưởng của epinephrine ở tất cả các nồng độ thử nghiệm ($p > 0,05$), khác với hoạt tính thủy phân của enzyme lipase, phospholipase, haemolysin và caseinase đều cao hơn ở các nghiệm thức có bổ sung epinephrine so với đối chứng.

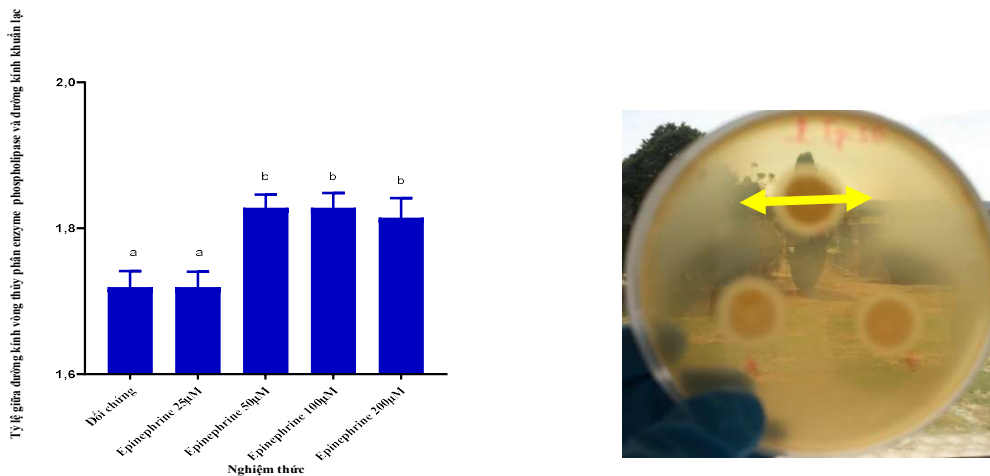
Kết quả thử nghiệm ảnh hưởng của epinephrine lên hoạt tính lipase được thể hiện ở Hình 1. Epinephrine ở các nồng độ 50 μM , 100 μM và 200 μM làm tăng hoạt tính của lipase rõ rệt so với đối chứng ($p < 0,05$). Enzyme lipase phân cắt các triacylglycerols mạch dài thành các acid béo và glycerol, do đó enzyme lipase có thể có vai trò quan trọng trong quá trình phá hủy màng và mô tế bào để vi khuẩn xâm nhập vào vật chủ (Defoirdt, 2013). Ngoài ra, lipid A - là thành phần cấu trúc của LPS ở màng ngoài của vi khuẩn Gram (-), có vai trò quan trọng trong quá trình gây bệnh của vi khuẩn (Karavolos và Khan, 2013), do đó, sự gia tăng hoạt động của enzyme lipase có thể

đóng vai trò trong tổng hợp lipid A và ảnh hưởng đến độc lực của vi khuẩn. Tuy nhiên, cơ chế ảnh hưởng của catecholamine (norepinephrine và dopamine) lên hoạt động của lipase và sự tham gia của nó trong quá trình gây bệnh của vi khuẩn vẫn chưa được làm rõ (Defoirdt, 2013).

Có thể thấy hoạt tính của enzyme phospholipase tăng khi bổ sung epinephrine trong môi trường ở nồng độ 50 μM , 100 μM và 200 μM ($p < 0,05$) (Hình 2). Hoạt tính phospholipase là khả năng thủy phân phospholipid thành các acid béo. Phospholipid và protein là những thành phần hoá học chủ yếu của lớp vỏ tế bào ký chủ. Vì vậy, tương tự như lipase, phospholipase có thể liên quan đến các quá trình phá hủy lớp màng tế bào, đóng vai trò quan trọng trong suốt quá trình tấn công ký chủ của một số vi khuẩn gây bệnh và gây các tổn thương lên mô của vật chủ (Istivan và Coloe, 2006). Tuy nhiên cho đến nay cơ chế hoạt động của enzyme phospholipase và đặc biệt là ảnh hưởng của epinephrine lên hoạt động của enzyme này vẫn chưa được làm rõ. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của các catecholamine khác như norepinephrine và dopamine trên vi khuẩn *V. harveyi* cho thấy hai loại stress hormone này không làm tăng hoạt tính thủy phân của cả enzyme lipase và phospholipase (Yang và cs., 2014). Điều này có thể cho thấy cơ chế ảnh hưởng của các catecholamine rất khác nhau lên hoạt tính của các enzyme thủy phân, do đó để xác định được cơ chế cần nhiều nghiên cứu đồng bộ và sâu hơn.



Hình 1. Ảnh hưởng của các nồng độ epinephrine lên hoạt tính thủy phân của enzyme lipase trên vi khuẩn *V. harveyi* (trái) và hoạt tính thủy phân lipase trên môi trường TSA bổ sung 1% Tween80 (phải)
Số liệu được biểu diễn ở dạng Mean ± SE, các kí tự a,b,c khác nhau chỉ sự khác biệt thống kê ($p < 0,05$) giữa các nghiệm thức



Hình 2. Ảnh hưởng của các nồng độ epinephrine lên hoạt tính thủy phân của enzyme phospholipase trên vi khuẩn *V. harveyi* (trái) và hoạt tính thủy phân phospholipase trên môi trường TSA bổ sung 1% nhũ tương lòng đỏ trứng (phải)

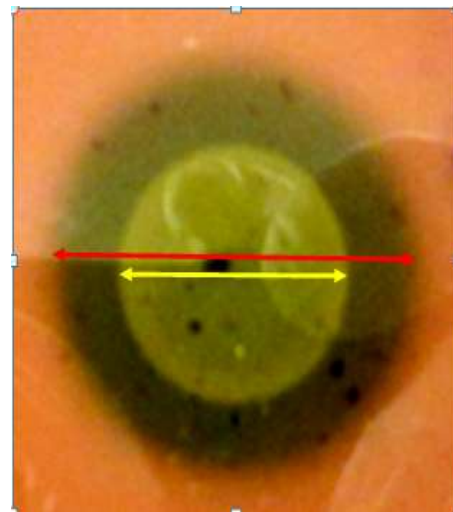
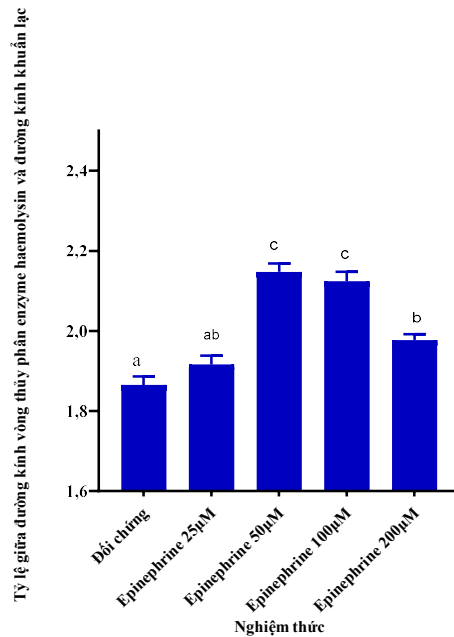
Số liệu được biểu diễn ở dạng Mean ± SE, các kí tự a,b,c khác nhau chỉ sự khác biệt thống kê ($p < 0,05$) giữa các nghiệm thức

Hoạt tính tan huyết là khả năng phá vỡ, thủy phân tế bào hồng cầu bởi enzyme haemolysin của một số vi khuẩn gây bệnh khi tấn công hoặc kí sinh gây bệnh trên kí chủ từ đó giải phóng haemoglobin và các thành phần khác của hồng cầu ra ngoài

huyết tương, làm thay đổi cấu trúc hoặc làm mất chức năng sinh lý của hồng cầu. Ảnh hưởng của epinephrine lên hoạt tính enzyme haemolysin hoàn toàn tương tự như với lipase và phospholipase. Hoạt tính thủy phân của các enzyme này lớn nhất ở nồng

độ epinephrine 50 μM và 100 μM , và giảm dần hoạt tính ở nồng độ 200 μM (Hình 3). Ở nồng độ 25 μM , không cho thấy sự khác biệt thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p>0.05$). Khác với kết quả của Yang và cs. (2014), norepinephrine và dopamine (50 μM) không làm tăng hoạt động của enzyme haemolysin, điều này có thể giải thích do hoạt tính của haemolysin bị ảnh hưởng bởi rất nhiều yếu tố. Theo Romalde và Toranzo (1993), mặc dù các sản phẩm sinh ngoại bào của vi khuẩn *Y. ruckeri* thể hiện khả năng phân giải máu cừu và máu cá hồi, tuy nhiên hoạt động của haemolysin chỉ được phát hiện trong môi trường thạch máu mềm. Huang và DuPont (2005) đã chứng minh mặc dù vi khuẩn *Salmonella typhi* không

thể hiện hoạt tính tan huyết trên môi trường thạch máu, bổ sung norepinephrine/epinephrine làm phân giải thạch máu và tăng hoạt tính lên đến 40% trong môi trường máu lỏng (Karavolos và cs., 2011; Karavolos và Khan, 2013). Theo các tác giả này, norepinephrine/epinephrine tiếp xúc và liên kết với thụ thể *CpxAR*, làm giảm sự biểu hiện của protein A màng ngoài tế bào (OmpA), làm bong tróc màng ngoài tế bào, kết quả dẫn đến gia tăng sự tiết haemolysin ở màng ngoài tế bào. Nghiên cứu khác trên *E. coli* cho thấy norepinephrine làm tăng sự biểu hiện của gen *slyA* và *rhaH* có vai trò quan trọng trong quá trình kích hoạt và làm tăng phản ứng tan huyết (Dowd, 2007).



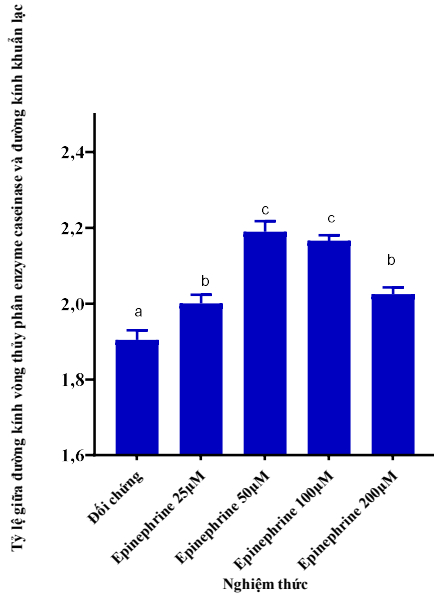
Hình 3. Ảnh hưởng của các nồng độ epinephrine lên hoạt tính thủy phân của enzyme haemolysin trên vi khuẩn *V. harveyi* (trái) và hoạt tính thủy phân haemolysin trên môi trường thạch máu (phải)
Số liệu được biểu diễn ở dạng Mean \pm SE, các kí tự a,b,c khác nhau chỉ sự khác biệt thống kê ($p<0,05$) giữa các nghiệm thức

Tất cả các nồng độ epinephrine thử nghiệm đều làm tăng hoạt tính thủy phân casein của vi khuẩn *V. harveyi* so với nghiệm thức đối chứng ($p<0,05$) (Hình 4). Protease là một trong những sản phẩm

ngoại bào và là enzyme xúc tác quá trình phân giải, phân huỷ protein thành các polypeptide nhỏ hơn hoặc các acid amin. Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện và chứng minh rằng các sản phẩm ngoại bào

nhu caseinase, geletinase...là những yếu tố độc lực quan trọng của nhiều vi khuẩn gây bệnh như *Vibrio*, *Aeromonas*...và nó liên

quan trực tiếp đến đặc điểm bệnh lý của những bệnh do nhóm vi khuẩn này gây ra.



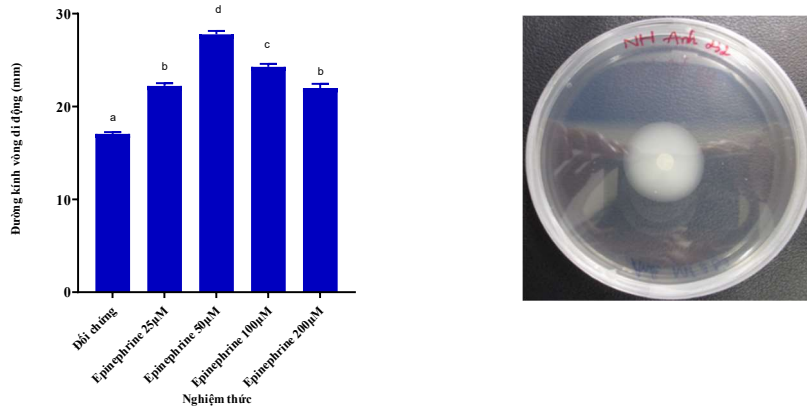
Hình 4. Ảnh hưởng của các nồng độ epinephrine lên hoạt tính thủy phân của enzyme caseinase trên vi khuẩn *V. harveyi* (trái) và hoạt tính thủy phân caseinase trên môi trường TSA bổ sung 4% bột sữa tách béo (phải)

Số liệu được biểu diễn ở dạng Mean ± SE, các kí tự a,b,c khác nhau chỉ sự khác biệt thống kê ($p < 0,05$) giữa các nghiệm thức

3.2. Ảnh hưởng của epinephrine lên khả năng di động của vi khuẩn *V. harveyi*

Khả năng di động là một thuộc tính lâu đời của vi khuẩn, được đánh giá là một trong những yếu tố độc lực quan trọng giúp vi khuẩn trong quá trình định hướng và xâm nhập vào vật chủ. Nuôi cấy vi khuẩn *V. harveyi* trong điều kiện bổ sung epinephrine làm tăng khả năng di động so với lô đối chứng ở tất cả các nồng độ khác nhau của epinephrine ($p < 0,05$) (Hình 5). Trong đó, đường kính vòng di động lớn nhất ở nồng độ epinephrine 50 µM đạt 28 mm. Điều này được lý giải dưới tác dụng của catecholamines, các gen liên quan đến vận động được hoạt hóa và thúc đẩy hoạt động

của tiên mao (Habdas và cs., 2010; Hughes và Sperandio, 2008). Theo Yang và cs., (2014), khảo sát 10 gen liên quan đến hoạt động di chuyển của *V. harveyi*, trong môi trường chứa norepinephrine và dopamine đều làm tăng biểu hiện của tất cả các gen này. Điều này chứng tỏ catecholamine có tác dụng kích thích sự hoạt động của tiên mao vi khuẩn và làm tăng đường kính vòng di động trên thạch mềm trong thí nghiệm *in vitro*. Tương tự, norepinephrine được báo cáo làm tăng khả năng di động của các vi khuẩn khác nhau như: *C. jejuni* (Cogan và cs., 2007), *S. typhimurium* (Bearson và Bearson, 2008) và *P. aeruginosa* (Hegde và cs., 2009).



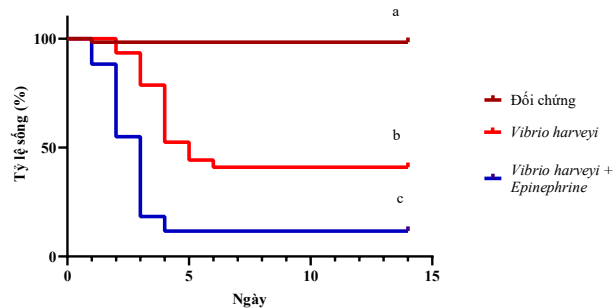
Hình 5. Ảnh hưởng của các nồng độ epinephrine lên khả năng di động (trái) và đường kính vòng di động của vi khuẩn *V. harveyi* trên thạch mềm (phải)

Số liệu được biểu diễn ở dạng Mean \pm SE, các kí tự a, b, c khác nhau chỉ sự khác biệt thống kê ($p < 0,05$) giữa các nghiệm thức

3.3. Tỷ lệ sống của tôm thẻ chân trắng cảm nhiễm vi khuẩn *V. harveyi* trong môi trường có bổ sung hoặc không bổ sung epinephrine

Nồng độ epinephrine 50 μ M là nồng độ thấp nhất làm tăng mạnh hoạt tính của

các enzyme thử nghiệm, do đó trong thí nghiệm xác định ảnh hưởng của độc lực của vi khuẩn *V. harveyi* lên tôm thẻ chân trắng, chúng tôi nuôi cấy *V. harveyi* trong môi trường TSB+2%NaCl bổ sung thêm 50 μ M epinephrine.



Hình 6. Tỷ lệ sống của tôm thẻ chân trắng cảm nhiễm với vi khuẩn *V. harveyi*

Các kí tự a, b, c biểu hiện sự sai khác thống kê giữa các nghiệm thức theo phân tích tỷ lệ sống Kaplan-Meier (Survival analysis – Graphpad Prism)

Kết quả thí nghiệm cho thấy, tỷ lệ sống của tôm cảm nhiễm bằng vi khuẩn nuôi cấy trong môi trường có chứa epinephrine rất thấp (11,7%) sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức thí nghiệm cảm nhiễm sử dụng vi khuẩn nuôi cấy tăng sinh bình thường (40%) (Hình 6). Ở các nghiệm thức thí nghiệm này cũng làm tôm chết nhanh và sớm hơn, chủ yếu trong 2-3 ngày đầu tiên của thí nghiệm. Nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn *V. harveyi* (nuôi cấy trong môi trường TSB

không bổ sung epinephrine) tôm bắt đầu chết sau hai ngày thí nghiệm, kéo dài đến ngày thứ 6, và chết nhiều nhất vào ngày 3-4. Ở nghiệm thức đối chứng tỷ lệ sống của tôm không cảm nhiễm lên đến 98%.

Những thử nghiệm *in vivo* về ảnh hưởng của catecholamine lên độc lực vi khuẩn gây bệnh trên động vật thủy sản cũng được báo cáo trên artemia, tôm càng xanh, cá hồi vân và cá diếc. Cảm nhiễm *Artemia franciscana* và *Macrobrachium rosenbergii*

với vi khuẩn *V. harveyi* trong môi trường có bổ sung norepinephrine và dopamine được ghi nhận làm giảm tỷ lệ sống của artemia và tôm càng xanh so với lô đối chứng (Pande và cs., 2014; Yang và cs., 2014). Kết quả tương tự được báo cáo trên cá hồi vân và cá diếc khi cảm nhiễm vi khuẩn *Y. ruckeri* (Torabi Delshad và cs., 2019) và *A. hydrophila* (Gao và cs., 2019) trong môi trường có bổ sung catecholamine.

Kết quả gây bệnh thực nghiệm kết hợp với kết quả thử nghiệm *in vitro* về các hoạt tính enzyme, trong nghiên cứu này có thể kết luận rằng epinephrine đã làm tăng độc lực của vi khuẩn *V. harveyi*, do đó làm tăng tỷ lệ chết của tôm thẻ chân trắng.

4. KẾT LUẬN

Trong điều kiện môi trường có bổ sung epinephrine với các nồng độ (50 μ M, 100 μ M và 200 μ M) làm tăng khả năng di động, tăng hoạt tính enzyme lipase, phospholipase, haemolysin và caseinase nhưng không ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme chitinase. Tỷ lệ sống của tôm thẻ chân trắng trong thí nghiệm cảm nhiễm với vi khuẩn *V. harveyi* trong điều kiện có mặt của epinephrine 50 μ M thấp hơn so với đối chứng.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của Nhóm Nghiên cứu mạnh NCM.DHH.2022.005 và đề tài NCKH cấp cơ sở trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, năm 2023.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Austin, B., & Zhang, X. H. (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in applied microbiology*, 43(2), 119-124.
- Bearson, B.L., & Bearson, S.M. (2008). The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbial pathogenesis*, 44, 271-278.
- Belay, T., Aviles, H., Vance, M., Fountain, K., & Sonnenfeld, G. (2003). Catecholamines and *in vitro* growth of pathogenic bacteria: enhancement of growth varies greatly among bacterial species. *Life Sciences*, 73(12), 1527-1535.
- Cheng, W., Chieu, H.T., Ho, M.C., & Chen, J.C (2006). Noradrenaline modulates the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 21(1), 11-19.
- Cogan, T.A., Thomas, A.O., Rees, L.E., Taylor, A.H., Jepson, M.A., Williams, P.H., Ketley, J., & Humphrey, T.J. (2007). Norepinephrine increases the pathogenic potential of *Campylobacter jejuni*. *Gut*, 56, 1060-1065.
- Coulanges, V., Andre, P., Ziegler, O., Buchheit, L., & Vidon, D. (1997). Utilization of iron-catecholamine complexes involving ferric reductase activity in *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 65(7), 2778-2785.
- Darshanee Ruwandeeepika, H. A., Sanjeeva Prasad Jayaweera, T., Paban Bhowmick, P., Karunasagar, I., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2012). Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the Harveyi clade. *Reviews in Aquaculture*, 4(2), 59-74.
- Defoirdt, T. (2013). Antivirulence Therapy for Animal Production: Filling an arsenal with novel weapons for sustainable disease control. *PLOS Pathogens*, 9(10), e1003603.
- Defoirdt, T., Benneche, T., Brackman, G., Coenye, T., Sorgeloos, P., & Scheie, A. A. (2012). A quorum sensing-disrupting brominated thiophenone with a promising therapeutic potential to treat luminescent vibriosis. *PLoS one*, 7(7), e41788.
- Dowd, S. E. (2007). *Escherichia coli* O157:H7 gene expression in the presence of catecholamine norepinephrine. *FEMS Microbiology Letter*, 273(2), 214-223.
- Gao, J., Xi, B., Chen, K., Song, R., Qin, T., Xie, J., & Pan, L. (2019). The stress hormone norepinephrine increases the growth and virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Microbiologyopen*, 8(4), e00664
- Hegde, M., Wood, T.K., & Jayaraman, A. (2009). The neuroendocrine hormone norepinephrine increases *Pseudomonas aeruginosa* PA14 virulence through the las quorum-sensing pathway. *Applied*

- microbiology and biotechnology*, 84, 763-776.
- Huang, D. B., & DuPont, H. L. (2005). Problem pathogens: extra-intestinal complications of *Salmonella enterica* serotype Typhi infection. *The Lancet infectious diseases*, 5(6), 341-348.
- Hughes, D. T., & Sperandio, V. (2008). Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nature Reviews Microbiology*, 6(2), 111-120.
- Istivan, T. S., & Coloe, P. J. (2006). Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis. *Microbiology*, 152(Pt 5), 1263-1274.
- Karavolos, M. H., Bulmer, D. M., Spencer, H., Rampioni, G., Schmalen, I., Baker, S., Pickard, D., Gray, J., Fookes, M., Winzer, K., Ivens, A., Dougan, G., Williams, P., & Khan, C. M. (2011). Salmonella Typhi sense host neuroendocrine stress hormones and release the toxin haemolysin E. *EMBO Reports*, 12(3), 252-258.
- Karavolos, M. H., & Khan, C. M. A. (2013). Host Neuroendocrine Stress Hormones Driving Bacterial Behaviour and Virulence. *Moonlighting Cell Stress Proteins in Microbial Infections*, 387-398. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Kinney, K. S., Austin, C. E., Morton, D. S., & Sonnenfeld, G. (1999). Catecholamine enhancement of *Aeromonas hydrophila* growth. *Microbial Pathogenesis*, 26(2), 85-91.
- Kuo, C.M., Hsu, C.R., & Lin, C.Y. (1995) Hyperglycaemic effects of dopamine in tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 135(1-3), 161-172
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S.K., Cuff, A., & Poulet, S.A. (2001). Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oyster (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Applied and Environmental Microbiology* 67(5), 2304-2309.
- Lesouhaitier, O., Veron, W., Chapalain, A., Madi, A., Blier, A. S., Dagorn, A., Connil, N., Chevalier, S., Orange, N., & Feuilloley, M. (2009). Gram-negative bacterial sensors for eukaryotic signal molecules. *Sensors (Basel)*, 9(9), 6967-6990.
- Lyte, M., & Ernst, S. (1992). Catecholamine induced growth of Gram negative bacteria. *Life Sciences*, 50(3), 203-212.
- Lyte, M., & Freestone, P. P. (2010). Microbial Endocrinology: Interkingdom Signaling in Infectious Disease and Health. M. Lyte (Ed.). *New York Springer*.
- Lyte, M., Vulchanova, L., & Brown, D. R. (2011). Stress at the intestinal surface: catecholamines and mucosa-bacteria interactions. *Cell Tissue Research*, 343(1), 23-32.
- Malham, S.K., Lacoste, A., Gelebart, F., Cuffeff, A., Poulet, S.A. (2003). Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusk *Haliotis tuberculata*. *Journal of Experimental Zoology* 295A:136-144.
- Nakano, M., Takahashi, A., Sakai, Y., Kawano, M., Harada, N., Mawatari, K., & Nakaya, Y. (2007). Catecholamine-induced stimulation of growth in *Vibrio*. *Letters in Applied Microbiology*, 44(6), 649-653.
- Natrah, F.M., Ruwandeepika, H.A., Pawar, S., Karunasagar, I., Sorgeloos, P., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2011). Regulation of virulence factors by quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Veterinary microbiology*, 154(1-2), 124-129.
- Pande, G. S. J., Suong, N. T., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2014). The catecholamine stress hormones norepinephrine and dopamine increase the virulence of pathogenic *Vibrio anguillarum* and *Vibrio campbellii*. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(3), 761-769.
- Reiche, E.M., Morimoto, H.K., & Nunes, S.M.(2005). Stress and depression-induced immune dysfunction: implications for the development&progression of cancer. *International Review of Psychiatry*, 17(6), 515-527
- Romalde, J. L., & Toranzo, A. E. (1993). Pathological activities of *Yersinia ruckeri*, the Enteric Redmouth (ERM) bacterium. *FEMS microbiology letters*, 112(3), 291-299.
- Ruwandeepika, H. A. D., Jayaweera, T. S. P., Bhowmick, P. P., Karunasagar, I., Bossier, P., & Defroidt, T. (2012). Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibriosis belonging to the Harveyi clade. *Aquaculture*, 4(2), 59-74.
- Sharaff, F., & Freestone, P. (2011). Microbial Endocrinology. *Central European Journal of Biology*, 6(5), 685-694.
- Soto-Rodriguez, S., Roque, A., Guerra-Flores, A., & Gomez-Gil, B. (2003). Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana*

- nauplii. *Diseases of aquatic organisms*, 53(3), 231-240.
- Torabi Delshad, S., Soltanian, S., Sharifiyazdi, H., & Bossier, P.(2019). Effect of catecholamine stress hormones (dopamine and norepinephrine) on growth, swimming motility, biofilm formation and virulence factors of *Yersinia ruckeri* *in vitro* and an *in vivo* evaluation in rainbow trout. *Journal of Fish Diseases*, 42(4),477-487.
- Yang, Q., Anh, N. D., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2014). Norepinephrine and dopamine increase motility, biofilm formation, and virulence of *Vibrio harveyi*. *Frontiers in microbiology*, 5, 584.