

ẢNH HƯỞNG CỦA CHẾ PHẨM SYMBIOTIC CHỨA VI KHUẨN SINH AXIT LACTIC *Lactococcus lactis* VÀ FRUCTOOLIGOSACCHARIDE LÊN MỘT SỐ CHỈ TIÊU MIỄN DỊCH CỦA TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*)

Nguyễn Thị Huệ Linh*, Nguyễn Thị Xuân Hồng, Trần Thị Thúy Hằng,
Nguyễn Ngọc Phước

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

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

Nhận bài: 23/11/2020 Hoàn thành phản biện: 02/03/2021 Chấp nhận bài: 24/03/2021

TÓM TẮT

Nghiên cứu này bước đầu đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm synbiotic gồm vi khuẩn sinh axit lactic *Lactococcus lactis* và fructooligosaccharide lên các chỉ tiêu miễn dịch của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Tôm thí nghiệm (khối lượng ban đầu $5 \pm 0,6$ g/con) được cho ăn thức ăn công nghiệp không có hoặc có chế phẩm synbiotic với hàm lượng phối trộn vi khuẩn *L. lactis* 10^8 CFU/mL và lần lượt 4 hàm lượng của fructooligosaccharide là 0,1; 0,2; 0,5 và 1%. Sau 30 ngày cho tôm ăn thức ăn thử nghiệm, tiến hành thu mẫu máu tôm để phân tích các chỉ tiêu miễn dịch. Kết quả cho thấy tổng số tế bào máu, hoạt tính của enzyme phenoloxidase và hoạt động thực bào của tôm cho ăn theo chế độ ăn có bổ sung chế phẩm synbiotic cao hơn ($p < 0,05$) so với tôm ở nghiệm thức đối chứng, trong đó chế độ ăn có chế phẩm synbiotic chứa hàm lượng fructooligosaccharide 0,5% và 1% được ghi nhận có hiệu quả tốt hơn ở tôm thí nghiệm so với tôm ở các chế độ ăn còn lại. Tuy nhiên, hoạt tính enzyme lysozyme của tôm không khác nhau ở nghiệm thức đối chứng và tôm ở các nghiệm thức cho ăn chế phẩm synbiotic ($p > 0,05$). Những kết quả đạt được trong nghiên cứu này bước đầu cho thấy chế phẩm synbiotic thử nghiệm đã làm tăng hoạt động miễn dịch của tôm thẻ chân trắng.

Từ khoá: Chỉ tiêu miễn dịch, Fructooligosaccharide, *Lactococcus lactis*, Synbiotic, Tôm thẻ chân trắng

PRELIMINARY STUDY ON EFFECT OF A MIXTURE OF LACTIC ACID BACTERIA *Lactococcus lactis* AND FRUCTOOLIGOSACCHARIDE ON IMMUNE RESPONSE PARAMETERS OF WHITE LEG SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*)

Nguyen Thi Hue Linh*, Nguyen Thi Xuan Hong, Tran Thi Thuy Hang,
Nguyen Ngoc Phuc

University of Agriculture and Forestry, Hue University.

ABSTRACT

This study initially evaluated the effect of a synbiotic containing a mixture of lactic acid-producing bacteria *L. lactis* and fructooligosaccharide on immune response factors of white leg shrimp (*L. vannamei*). The experimental shrimp ($5 \pm 0,6$ g/con) were fed commercial feed without or containing the synbiotic with *L. lactis* (10^8 CFU/mL) and/or 4 concentrations of fructooligosaccharide 0,1; 0,2; 0,5 and 1%, respectively. After 30 days of feeding trial, shrimp hemolymph was collected to analyze the related parameters to shrimp immune response. The results showed that the immunological parameters such as total hemocytes count, phenoloxidase enzyme activity, and phagocytic activity of shrimp in the treated groups were significantly higher ($p < 0,05$) than those of shrimp in the control group. In which, the diet containing synbiotic with 0,5% and 1% of fructooligosaccharide gave the better immune response in shrimp than others. In addition, there was no significant difference was observed in the lysozyme enzyme activity of shrimp in the treatment groups and the control group ($p > 0,05$). The results of this study provided scientific data on the effectiveness of synbiotic in stimulating immune response parameters of cultured white leg shrimp.

Keywords: Fructooligosaccharide, Immune Response Parameters, *Lactococcus lactis*, Synbiotic, White leg shrimp

1. MỞ ĐẦU

Trong 20 năm trở lại đây, việc ứng dụng vi khuẩn sinh axit lactic và các sản phẩm trao đổi chất của chúng làm chế phẩm sinh học tiềm năng sử dụng trong ngành công nghiệp nuôi tôm (Chiu và cs., 2007; Castex và cs., 2008; Vieira và cs., 2008) đang rất được các nhà nghiên cứu quan tâm. Vi khuẩn sinh axit lactic có khả năng sản xuất chất kháng khuẩn ức chế sự phát triển của vi khuẩn cạnh tranh và các thành phần kháng khuẩn như axit lactic, axit axetic, hydro peroxide và (Ouwehand và Vesterlund, 2004). Chế phẩm sinh học bao gồm *Lactobacillus* sp., *Bacillus* sp., nấm men và nhiều vi khuẩn gram âm đã được báo cáo có khả năng ức chế hiệu quả vi khuẩn *Vibrio* trong ngành công nghiệp nuôi tôm (Chiu và cs., 2007; Vaseeharan và Ramasamy, 2003; Suphantharika và cs., 2003; Scholz và cs., 1999; Ruiz-Ponte và cs., 1999). Bright và cs. (2004) đã thông báo rằng sau khi tôm he được cho ăn *L. acidophilus*, *Streptococcus cremoris*, *L. bulgaricus* 56 và *L. bulgaricus* 57 và cảm nhiễm với *V. alginolyticus* thì tỷ lệ sống sót của tôm thí nghiệm là 60% - 80%, so với tỷ lệ sống 20% của nhóm đối chứng không sử dụng chế phẩm trên. Tương tự, kết quả nghiên cứu của Vieira và cs. (2007) đã chứng minh ấu trùng tôm thẻ chân trắng sau khi cho ăn vi khuẩn sinh axit lactic có thể cải thiện được tỷ lệ sống lên 44% - 50% so với tôm ở lô đối chứng (21%) trong thí nghiệm cảm nhiễm với *V. harveyi* (Vieira và cs., 2008). Trong một nghiên cứu khác, khi tiến hành điều trị cho tôm *Litopenaeus stylirostris* bị nhiễm *V. nigripulchritudo* bằng chế phẩm sinh học *Pediococcus acidilactici* đã làm tăng tỷ lệ sống lên 7% và 15% đối với tôm được nuôi ở 2 ao thử nghiệm, tương quan với việc giảm tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *V. nigripulchritudo* trong tuần đầu tiên (Castex và cs., 2008).

Lactococcus lactis là một trong những vi khuẩn sinh axit lactic có thể sử

dụng làm chế phẩm sinh học trong nuôi trồng thủy sản (Haziyaamin và cs., 2012). Đối với cá biển, đã có báo cáo về tác dụng có lợi của *L. lactis* WFLU12 giúp cá bon chống lại liên cầu khuẩn *S. parauberis* thông qua việc cạnh tranh loại bỏ và tăng đáp ứng miễn dịch, đây là chủng vi khuẩn có triển vọng hứa hẹn thúc đẩy sự tăng trưởng cho cá và chuyển hóa thức ăn tốt hơn (Nguyen và cs., 2017). Linh và cs. (2018) cũng đã có báo cáo về ảnh hưởng tích cực của *L. lactis* K-C2 lên tốc độ tăng trưởng, hàm lượng amino acid và hệ vi sinh vật ruột của cá cam (*Seriola dumerili*). Trong khi đó, *L. lactis* subsp. *lactis* đã chứng minh tác động tích cực lên sự tăng trưởng, hệ vi sinh vật đường ruột, hoạt động của enzyme tiêu hóa và khả năng kháng bệnh của tôm thẻ chân trắng) trong nghiên cứu của Adel và cs. (2017).

Gần đây, một số nghiên cứu cho rằng khi sử dụng synbiotic là sản phẩm của sự kết hợp một hỗn hợp men vi sinh (probiotic, gồm các vi khuẩn có lợi) và prebiotic (một dạng thực phẩm tự bản thân không tiêu hóa được nhưng có ảnh hưởng tốt cho cơ thể sống bằng cách kích thích sự tăng trưởng của các vi khuẩn có lợi) đã có thể kích thích sự phát triển, hoạt hoá khả năng trao đổi chất và cải thiện được khả năng sống sót của lợi khuẩn trong quá trình di chuyển qua đường ruột, góp phần duy trì cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột và nâng cao sức khỏe cho vật chủ (DeVrese và Schrezenmeir, 2008; Pandey và cs., 2015; Ringø và Song, 2016). Prebiotic là những carbohydrate có nguồn gốc chủ yếu từ thực vật, prebiotic sẽ không bị ảnh hưởng bởi axit tiêu hoá trong dạ dày, muối mật và các enzyme thủy phân trong dịch ruột, không bị hấp thu trong đường tiêu hoá và dễ dàng lên men nhờ hệ vi sinh vật có lợi trong đường ruột (Kuo, 2013). Fructooligosaccharide (FOS) là một trong những prebiotic thực vật cho thấy có nhiều tiềm năng ứng dụng trong các loài thủy hải sản nuôi (Zhou và cs., 2010; Dong và Wang, 2013). Việc bổ sung

fructooligosaccharide vào chế độ ăn đã được chứng minh làm tăng tốc độ tăng trưởng của động vật thủy sản như rùa mai mềm (*Trionyx sinensis*) (Ji và cs., 2004) và ấu trùng bọ hung (*Psetta maxima*) (Mahious và cs., 2006). Tuy nhiên, thông tin về phương thức hoạt động của synbiotic đến hệ thống miễn dịch của *L. vannamei* vẫn chưa được nghiên cứu nhiều. Mục tiêu nghiên cứu này bước đầu đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm synbiotic và tỷ lệ phối trộn thích hợp nhất của vi khuẩn sinh axit lactic *L. lactis* và fructooligosaccharide trong chế phẩm này lên hoạt động của các chỉ tiêu miễn dịch của tôm thẻ chân trắng, cung cấp cơ sở khoa học cho những nghiên cứu tiếp theo về ứng dụng chế phẩm synbiotic này trong phòng và trị bệnh cho tôm nuôi.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Nguồn vi khuẩn *lactis*

Vi khuẩn có lợi *L. lactis* được phân lập từ ruột tôm thẻ chân trắng tự nhiên, được lưu trữ và cung cấp từ phòng thí nghiệm Khoa Thủy sản, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế. Chúng vi khuẩn *L. lactis* được nuôi cấy trên môi trường thạch MRS (de Man, Rogosa & Sharpe) ở nhiệt độ 28°C trong 24 giờ. Sau đó, lấy 1 khuẩn lạc rời trên đĩa thạch nuôi cấy tăng sinh trong 50 mL môi trường MRS lỏng trong máy ủ lắc (Shaking incubator) (LM-4200, Yinder, Trung Quốc) ở nhiệt độ 28°C, tốc độ 100 vòng/phút trong 24 - 48 giờ. Dung dịch vi khuẩn được ly tâm với tốc độ 3.000 vòng trong 20 phút bằng máy ly tâm (Digisystem Laboratory Instruments Inc., Đà Loan), loại bỏ phần dịch nổi và thu phần vi khuẩn. Cho 50 mL dung dịch nước muối sinh lý 0.85% NaCl vào để tạo huyền phù. Lấy 1 mL huyền phù vi khuẩn đo OD bằng máy so màu quang phổ (Spectrophotometer model 4111 RS, Zuzi, Tây Ban Nha) ở bước sóng 620 nm, dùng nước muối sinh lý pha loãng đến giá trị OD của huyền phù $OD_{600} = 1$

(tương đương 10^8 CFU/mL, số liệu không công bố).

2.1.2. Phương pháp điều chế chế phẩm synbiotic

Vi khuẩn *L. lactis* (10^8 CFU/mL) được phối trộn với fructooligosaccharide ở 4 hàm lượng 0,1; 0,2; 0,5 và 1%. Cụ thể, 100 mL dung dịch huyền phù vi khuẩn *L. lactis* với nồng độ 10^8 CFU/mL ly tâm với tốc độ 3.000 vòng trong 20 phút để loại bỏ phần dịch nổi, vi khuẩn lắng lại được trộn với 10 ml nước cất đã được hoà tan fructooligosaccharide với liều lượng lần lượt là 0,1; 0,2; 0,5 và 1 g. Cuối cùng, 10 mL ở mỗi nồng độ phối trộn của chế phẩm được trộn đều với 100 g thức ăn công nghiệp (Goal Plus 8604, Công ty Cổ phần Chăn nuôi CP Việt Nam, tổng hàm lượng protein 46%, kích cỡ < 1,2 mm), để khô ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ. Hỗn hợp tạo thành được lưu giữ ở nhiệt độ 4°C và được sử dụng trong thí nghiệm tiếp theo. Fructooligosaccharide sử dụng là sản phẩm thương mại được cung cấp bởi công ty Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Nhật Bản).

2.2. Tôm thí nghiệm

Tôm thẻ chân trắng (*L. vannamei*) với số lượng 250 con, có khối lượng cơ thể trung bình $5 \pm 0,6$ g/con, tôm đã qua kiểm dịch không mang các mầm bệnh đốm trắng (WSSV), bệnh còi (MBV), bệnh đầu vàng (YHD), bệnh hoại tử cơ quan tạo máu và cơ quan biểu mô (IHHNV) và bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND) bởi trạm xá Thú y (Chi cục Chăn nuôi, Thú y Thừa Thiên Huế), được cung cấp từ trang trại nuôi tôm tại xã Phú Thuận, Thừa Thiên Huế. Tôm được nuôi thuần trong bể composite (kích thước 1 x 1 x 1m) 14 ngày trước khi tiến hành thí nghiệm. Nhiệt độ nước, độ mặn và oxy hòa tan trong quá trình nuôi thuần và quá trình thí nghiệm duy trì trong khoảng tương ứng là 22 - 23°C, 30‰ và 5 - 6 mg/L. Tôm được cho ăn mỗi ngày một lần với khẩu phần ăn bằng 3% trọng lượng cơ thể.

2.3. Bố trí thí nghiệm

Tôm thí nghiệm được bố trí trên 5 nghiệm thức, nghiệm thức đối chứng gồm tôm thẻ chân trắng cho ăn thức ăn công nghiệp không chứa chế phẩm synbiotic. Bốn nghiệm thức thí nghiệm (nghiệm thức 1, 2, 3, và 4) gồm tôm thẻ chân trắng cho ăn thức ăn có phối trộn chế phẩm synbiotic chứa vi khuẩn *L. lactis* và fructooligosaccharide với 4 tỷ lệ phối trộn lần lượt là 0,1; 0,2; 0,5 và 1%. Mỗi nghiệm thức được lặp lại ba lần. Tôm thí nghiệm được bố trí trong các bể nhựa (kích thước 30 x 60 x 40cm) chứa 15 con tôm/bể. Tôm được cho ăn 3 lần/ngày với khối lượng thức ăn bằng 3% khối lượng cơ thể tôm. Thí nghiệm cho ăn được tiến hành trong 30 ngày.

2.4. Phương pháp xác định các chỉ tiêu miễn dịch

Các chỉ tiêu miễn dịch (tổng số tế bào máu, hoạt tính enzyme lysozyme, hoạt tính enzyme phenoloxidase, hoạt động thực bào) của tôm thí nghiệm được xác định vào trước ngày cho ăn (đầu thí nghiệm) và sau 30 ngày cho ăn thức ăn có hoặc không có chế phẩm synbiotic. Tiến hành lấy máu tôm (3 con tôm) ở mỗi nghiệm thức trong mỗi lần thu mẫu. Dùng xilanh -1 ml đã chứa sẵn 400 μL dung dịch chống đông máu (29,22 mg NaCl; 3,8 mg ethylene glycol tetra-acetic acid; 2,38 mg Hepes ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$); 5 mg L-cystein, 1 L nước cất, pH 7,6) (Itami và cs., 1998) lấy 300 μL máu từ gốc chân bò thứ 3 của tôm, sau đó cho vào ống eppendorf đã chứa sẵn 800 μL dung dịch chống đông máu và trộn đều, tổng tỷ lệ pha loãng của dung dịch máu tôm và dung dịch chống đông máu là 1:4. Máu tôm được chia thành nhiều phần và sử dụng để phân tích các chỉ tiêu miễn dịch khác nhau như sau:

2.4.1. Tổng số tế bào máu

Nhỏ 10 μL máu tôm ở trên cho vào buồng đếm hồng cầu Neubauer-improved, đếm số lượng tế bào máu bằng kính hiển vi quang học (Leica DMIL, Leica Microsystems, Wetzlar, Đức) với độ phóng

đại 400x để xác định tổng số tế bào máu tôm theo công thức:

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

2.4.2. Hoạt tính enzyme lysozyme

Hoạt tính enzyme lysozyme được xác định theo phương pháp của Ellis (1990): lấy 700 μL dung dịch máu tôm ly tâm ở tốc độ 6.500 vòng/phút trong 2 phút. Loại bỏ phần dịch nổi, phần lắng ở dưới được trộn với 1 mL (0,02%) dung dịch *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, St. Louis, MO, USA) ở nhiệt độ phòng. Đo mật độ quang học dung dịch ở bước sóng 530 nm sau 0,5 và 4,5 phút trên máy quang phổ (Spectrophotometer model 4111 RS, Zuzi, Tây Ban Nha). Một đơn vị hoạt động của enzyme lysozyme tạo ra tương đương với sự giảm độ hấp thụ 0,01 phút⁻¹, và được biểu thị là U (g/mL)⁻¹.

2.4.3. Hoạt tính enzyme phenoloxidase

Hoạt tính enzyme phenoloxidase được phân tích bằng cách xác định sự hình thành dopachrome từ L-DOPA (L-3, -4-dihydroxyphenylalanine, Sigma) (Pan và cs., 2008; Sung và cs., 1994). Lấy 700 μL của dung dịch máu tôm ly tâm ở tốc độ 6.500 vòng/phút trong 2 phút ở nhiệt độ 4°C), loại bỏ phần dịch nổi, phần lắng ở dưới được rửa sạch và trộn nhẹ nhàng trong 700 μL dung dịch đệm cacodylate 0,1 M (natri cacodylate 10 mM, natri clorua 450 mM và trisodium citrat 100 mM; pH 7,0), sau đó tiếp tục ly tâm (10.000 vòng/phút, 10 phút, 4°C). Lấy 100 μL phần dịch nổi trộn với 100 μL trypsin 0,1% (hòa tan trong dung dịch đệm cacodylate 0,1 M) và ủ trong 10 phút ở 25°C. Sau đó, cho 100 μL L-DOPA (3 mg/mL cacodylate 0,1 M) vào và ủ trong 20 phút ở 25°C, tiếp theo bổ sung vào hỗn hợp 300 μL dung dịch đệm cacodylate 0,1 M. Hoạt động phenoloxidase được xác định bằng máy đo máy quang phổ (Spectrophotometer model 4111 RS, Zuzi, Tây Ban Nha) tại bước sóng 490 nm.

2.4.4. Hoạt động thực bào

Hoạt động thực bào của tế bào máu tôm được xác định theo phương pháp của Liu và Chen (2004). Đầu tiên, lấy 20 μL vi khuẩn của *V. parahaemolyticus* ($2 \times 10^7 \text{CFU/mL}$) tiêm vào xoang bụng của 5 con tôm ở mỗi nghiệm thức thí nghiệm. Sau khi tiêm 2 giờ, tiến hành lấy máu tôm như đã trình bày ở trên. Lấy 100 μL mẫu máu trộn với 100 μL paraformaldehyde 0,1% để cố định các tế bào máu trong 30 phút ở 4°C. Tiếp theo, lấy 50 μL dung dịch tế bào máu đã cố định nhỏ lên phiến kính và ly tâm với tốc độ 1000 rpm trong 3 phút ở máy Cytospin TD-4K (Hunan Xingke Scientific Instruments Co., Ltd, Trung quốc). Sau đó,

các lam kính được để khô ở nhiệt độ phòng và nhuộm bằng thuốc nhuộm Wright-Giemsa. Hoạt động thực bào của các tế bào máu tôm được quan sát bằng kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 400x. Hoạt động thực bào (PA) được xác định như sau:

$$\text{PA (\%)} = \left[\frac{\text{(Tế bào máu tôm có hoạt động thực bào)}}{\text{(Tổng số tế bào máu)}} \right] \times 100$$

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của chế phẩm synbiotic lên tổng số tế bào máu

Tổng số tế bào máu của tôm ở các nghiệm thức thí nghiệm đều tăng lên sau 30 ngày cho ăn hoặc không cho ăn chế phẩm synbiotic thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Tổng số tế bào máu tôm ở các nghiệm thức thí nghiệm sau 30 ngày cho ăn hoặc không cho ăn chế phẩm synbiotic

Nghiệm thức	Tổng số tế bào máu (10^7 tế bào/mL)	
	Đầu thí nghiệm	Ngày thí nghiệm thứ 30
Nghiệm thức 1	$1,3 \pm 0,2^a$	$2,6 \pm 0,2^b$
Nghiệm thức 2	$1,2 \pm 0,3^a$	$2,9 \pm 0,4^b$
Nghiệm thức 3	$1,1 \pm 0,3^a$	$3,5 \pm 0,3^c$
Nghiệm thức 4	$1,3 \pm 0,4^a$	$3,5 \pm 0,4^c$
Đối chứng	$1,2 \pm 0,3^a$	$2,0 \pm 0,5^a$

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

Sau 30 ngày thí nghiệm tổng số tế bào máu của tôm thẻ chân trắng ở nghiệm thức đối chứng ($2,0 \pm 0,5 \times 10^7$ tế bào/mL) thấp hơn tất cả các nghiệm thức có bổ sung synbiotic trong thức ăn ($p < 0,05$). Cụ thể tổng số tế bào máu của tôm thẻ chân trắng ở nghiệm thức 1 là $2,6 \pm 0,2 \times 10^7$ tế bào/mL, nghiệm thức 2: $2,9 \pm 0,4 \times 10^7$ tế bào/mL, nghiệm thức 3: $3,5 \pm 0,3 \times 10^7$ tế bào/mL và nghiệm thức 4: $3,5 \pm 0,4 \times 10^7$ tế bào/mL. Trong đó, tổng số tế bào máu của tôm thẻ chân trắng đạt cao nhất ở nghiệm thức 3 và 4 và cao hơn so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$), tuy nhiên tổng số tế bào máu của tôm thẻ chân trắng ở hai nghiệm thức này không khác nhau về mặt thống kê ($p > 0,05$).

Các thành phần tế bào máu của tôm nói riêng và của giáp xác nói chung đóng một vai trò rất quan trọng trong hệ miễn

dịch của vật chủ. Các tế bào máu có vai trò trong việc nhận biết vật thể lạ xâm nhập vào cơ thể, khả năng thực bào, quá trình melanin hoá, quá trình gây độc và giao tiếp tế bào (Johansson và cs., 2000). Khi giáp xác đáp ứng với sự cảm nhiễm của tác nhân gây bệnh có thể làm mất số lượng lớn các tế bào máu trong hệ thống tuần hoàn, các tế bào máu sau đó được phục hồi thông qua quá trình tổng hợp nhanh chóng và giải phóng các tế bào máu mới bởi mô tạo máu của giáp xác (Lin & Soderhall, 2011). Sang và cs. (2009) cho biết rằng tế bào máu của tôm có khả năng tăng sinh, tỷ lệ tăng sinh có thể được cải thiện khi bổ sung các chất kích thích miễn dịch, lipopolysaccharide hoặc prebiotics vào thức ăn. Kết quả từ Bảng 1 cho thấy hiệu quả của synbiotics khi bổ sung vào thức ăn sau 30 ngày đã nâng cao khả năng sản sinh tế bào

máu của tôm ở các nghiệm thức thí nghiệm hơn so với tôm ở nghiệm thức đối chứng, mặc dù ở nghiệm thức đối chứng tổng số tế bào máu của tôm cũng có tăng gần gấp đôi so với thời điểm trước khi tiến hành thí nghiệm. Nghiên cứu của Oktaviana và cs. (2014) đã báo cáo về hiệu quả của chế phẩm synbiotic (chứa *V. alginolyticus* SKT-bR và oligosaccharide từ khoai lang (*Ipomoea batatas* L.) lên tỷ lệ sống của tôm thẻ chân trắng *L. vannamei* khi cảm nhiễm với Myonecrosis Virus (IMNV) và *V. harveyi*, đồng thời hiệu quả làm tăng tổng số tế bào máu của tôm ở nghiệm thức thí nghiệm. Trong một nghiên cứu khác của Huynh và cs. (2018) cho thấy chế phẩm synbiotic chứa galactooligosaccharide (GOS) and *L. plantarum* có tác dụng tăng cường khả năng miễn dịch của tôm thẻ chân trắng biểu hiện thông qua chỉ số tổng số tế bào máu của tôm ở nhóm cho ăn synbiotic cao hơn nhiều so với tôm ở các nhóm thí nghiệm khác. Kết quả của nghiên cứu này cũng đã chứng minh chế phẩm synbiotic chứa hỗn hợp vi khuẩn *L.*

lactis và fructooligosaccharide có hiệu quả tăng cường hàng rào miễn dịch tế bào của tôm thẻ chân trắng thí nghiệm. Như vậy, sự hình thành các tế bào máu bền vững rất quan trọng đối với sự tồn tại của tôm nói riêng và giáp xác nói chung.

3.2. Ảnh hưởng của chế phẩm synbiotic lên hoạt tính enzyme phenoloxydase

Khi khảo sát hoạt tính enzyme phenoloxydase ở bước sóng 490 nm (OD_{490}) cho thấy hoạt động của enzyme phenoloxydase của tôm tăng cao ở các nghiệm thức thí nghiệm cho ăn chế phẩm synbiotic (đạt giá trị $0,24 \pm 0,02$ (Nghiệm thức 1); $0,26 \pm 0,01$ (Nghiệm thức 2); $0,34 \pm 0,02$ (Nghiệm thức 3) và $0,33 \pm 0,01$ (Nghiệm thức 4) và cao hơn nghiệm thức đối chứng ($0,2 \pm 0,02$) ($p < 0,05$). Hoạt tính enzyme phenoloxydase của tôm thẻ chân trắng ở các nghiệm thức 3 đạt cao nhất nhưng không khác biệt với tôm ở nghiệm thức 4 ($p > 0,05$) (Bảng 2).

Bảng 2. Hoạt tính enzyme phenoloxydase của tôm ở các nghiệm thức thí nghiệm sau 30 ngày cho ăn hoặc không cho ăn chế phẩm synbiotic

Nghiệm thức	Hoạt tính enzyme phenoloxydase (OD_{490})	
	Đầu thí nghiệm	Ngày thí nghiệm thứ 30
Nghiệm thức 1	$0,17 \pm 0,02^a$	$0,24 \pm 0,02^b$
Nghiệm thức 2	$0,17 \pm 0,02^a$	$0,26 \pm 0,01^b$
Nghiệm thức 3	$0,18 \pm 0,01^a$	$0,34 \pm 0,02^c$
Nghiệm thức 4	$0,18 \pm 0,02^a$	$0,33 \pm 0,01^c$
Đối chứng	$0,17 \pm 0,01^a$	$0,20 \pm 0,02^a$

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

Phản ứng phòng vệ ở tôm thường đi kèm với quá trình melanin hoá. Enzyme phenoloxydase thường tồn tại ở dạng chưa hoạt động là prophenoloxydase, sau khi được kích hoạt bởi các tế bào máu, sẽ trở thành dạng hoạt động là enzyme phenoloxydase thực hiện chức năng xúc tác phản *o*-hydroxyl hóa monophenol và oxy hóa phenol thành quinon dẫn đến tổng hợp melanin (Sritunyalucksana và Söderhall, 2000). Sự tương quan giữa enzyme phenoloxydase và khả năng miễn dịch ở động vật không xương sống đã được nghiên

cứu, cụ thể khi động vật không xương sống có hoạt tính của enzyme phenoloxydase cao thì khả năng cảm nhiễm với tác nhân gây bệnh sẽ thấp hơn (Zhang và cs., 2012). Zubaidah và cs. (2015) đã thực hiện thí nghiệm cho tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn có bổ sung synbiotic (*Bacillus* sp. NP5 và oligosaccharide) trong 30 ngày và sau đó cảm nhiễm tôm thí nghiệm với vi khuẩn *V. harveyi*; Kết quả tôm được cho ăn synbiotic (2%) trong chế độ ăn cho thấy hiệu suất tốc độ tăng trưởng, hệ số chuyển đổi thức ăn tốt nhất và chỉ số đáp ứng miễn dịch enzyme

phenoloxydase tăng cao hơn so với tôm ở các nghiệm thức khác. Tương tự, Luna-Gozález và cs. (2012) cho rằng việc bổ sung inulin (dẫn xuất gồm oligofructose và fructooligosaccharides) vào thức ăn có thể nâng cao hoạt động enzyme phenoloxidase của tôm thẻ chân trắng nuôi trong điều kiện phòng thí nghiệm. Huynh và cs. (2018) cũng đã có báo cáo về hiệu quả kích thích nâng cao hoạt động của enzyme phenoloxidase khi cho tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn có bổ sung synbiotic (galactooligosaccharide and probiotic *L. plantarum*). Như vậy, những kết quả của các nghiên cứu trước hoàn toàn phù hợp với

kết quả của nghiên cứu này, khi bổ sung chế phẩm synbiotic chứa hỗn hợp vi khuẩn *L. lactis* và fructooligosaccharide vào thức ăn đã có tác dụng làm tăng hoạt động enzyme phenoloxidase, đồng nghĩa với sự tăng cường hàng rào miễn dịch dịch thể của tôm thẻ chân trắng thí nghiệm.

3.3. Ảnh hưởng của chế phẩm synbiotic lên hoạt tính enzyme lysozyme

Ảnh hưởng của chế phẩm synbiotic lên hoạt tính enzyme lysozyme của tôm ở các nghiệm thức thí nghiệm sau 30 ngày cho ăn các chế độ ăn khác nhau được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Hoạt tính enzyme lysozyme của tôm ở các nghiệm thức thí nghiệm sau 30 ngày cho ăn hoặc không cho ăn chế phẩm synbiotic

Nghiệm thức	Hoạt tính enzyme lysozyme (units/mL)	
	Đầu thí nghiệm	Ngày thí nghiệm thứ 30
Nghiệm thức 1	0,55 ± 0,02 ^a	0,70 ± 0,04 ^a
Nghiệm thức 2	0,56 ± 0,02 ^a	0,69 ± 0,04 ^a
Nghiệm thức 3	0,55 ± 0,01 ^a	0,68 ± 0,05 ^a
Nghiệm thức 4	0,56 ± 0,02 ^a	0,68 ± 0,05 ^a
Đôi chứng	0,55 ± 0,01 ^a	0,61 ± 0,05 ^a

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

Hoạt tính enzyme lysozyme của tôm thẻ chân trắng có tăng lên ở tất cả các nghiệm thức thí nghiệm sau 30 ngày sử dụng thức ăn có hoặc không bổ sung chế phẩm synbiotic. Mặc dù, hoạt tính của enzyme lysozyme của tôm thẻ chân trắng ở các nghiệm thức có bổ sung chế phẩm synbiotic cao hơn so với tôm ở nghiệm thức đối chứng, nhưng sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) giữa các nghiệm thức (Bảng 3).

Enzyme lysozyme của các loài thuộc họ tôm he có hoạt tính ly giải một số vi khuẩn Gram dương và Gram âm, bao gồm cả một số loài *Vibrio* gây bệnh (Hikima và cs., 2003). Tuy nhiên, theo Partida-Arangué

và cs. (2012), Huynh và cs. (2018) sau khi cho tôm thẻ chân trắng ăn hỗn hợp gồm prebiotic (inulin hoặc galactooligosaccharide) và các lợi khuẩn (vi khuẩn sinh axit lactic, Bacilli, *L. plantarum*) trong 60 ngày đã không thấy sự thay đổi đáng kể đối với hoạt tính của enzyme lysozyme. Những nhận định trên hoàn toàn phù hợp với kết quả của nghiên cứu này.

3.4. Ảnh hưởng của chế phẩm synbiotic lên hoạt động thực bào

Sự bổ sung chế phẩm synbiotic vào chế độ ăn trong 30 ngày đã có ảnh hưởng đến hoạt động thực bào của tôm ở các nghiệm thức thí nghiệm (Bảng 4).

Bảng 4. Hoạt động thực bào của tôm ở các nghiệm thức thí nghiệm sau 30 ngày cho ăn hoặc không cho ăn chế phẩm synbiotic

Nghiệm thức	Hoạt động thực bào (%)	
	Đầu thí nghiệm	Ngày thí nghiệm thứ 30
Nghiệm thức 1	87 ± 1 ^a	99 ± 2 ^b
Nghiệm thức 2	86 ± 1 ^a	100 ± 3 ^b
Nghiệm thức 3	87 ± 1 ^a	100 ± 2 ^b
Nghiệm thức 4	89 ± 2 ^a	99 ± 1 ^b
Đối chứng	88 ± 2 ^a	90 ± 2 ^a

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

Khi sử dụng chế phẩm synbiotic bổ sung vào chế độ ăn đã làm tăng hiệu quả hoạt động thực bào của tôm thẻ chân trắng ở nghiệm thức 1 (99 ± 2%), nghiệm thức 2 (100 ± 3%), nghiệm thức 3 (100 ± 2%), nghiệm thức 4 (99 ± 1%) và cao hơn so với hoạt động thực bào của tôm thẻ chân trắng ở nghiệm thức đối chứng (90 ± 2%) ($p < 0,05$).

Thực bào là hoạt động bảo vệ cơ thể và được thực hiện bởi các tế bào có chức năng thực bào, các tế bào này có khả năng nhận biết và tiêu hoá phải các phân tử lạ, chẳng hạn như vi khuẩn hoặc bào tử. Đối với đáp ứng miễn dịch tế bào của giáp xác, chức năng thực bào chủ yếu được đảm nhiệm bởi tế bào máu không hạt (hyaline cell) và tế bào máu bán hạt (semi-granular cell), các tế bào có chức năng thực bào có thể tìm thấy ở tiểu động mạch của khối gan tụy, mang hoặc trong khoang cơ thể mà thông qua đó dịch máu được lưu thông (Johansson và cs., 2000; Vazquez và cs., 2009). Thông qua việc bổ sung synbiotic (hỗn hợp của galactooligo-saccharide và lợi khuẩn *L. plantarum*) vào thức ăn của tôm thẻ chân trắng Huynh và cs. (2018) đã cho thấy hiệu quả tăng hoạt động thực bào đối với tôm thẻ chân trắng thí nghiệm. Tương tự, chế phẩm synbiotic chứa hỗn hợp vi khuẩn *L. lactis* và fructooligosaccharide khi bổ sung vào thức ăn trong nghiên cứu này cũng đã chứng minh được khả năng kích thích làm tăng hoạt động thực bào của tôm ở các nghiệm thức thí nghiệm.

4. KẾT LUẬN

Kết quả của nghiên cứu cho thấy chế phẩm synbiotic chứa hỗn hợp vi khuẩn *L. lactis* và fructooligosaccharide có thể tăng

cường một số yếu tố đáp ứng miễn dịch của tôm thẻ chân trắng *L. vannamei* ở các nghiệm thức thí nghiệm như: tổng số tế bào máu, hoạt tính của enzyme phenoloxidase và hoạt động thực bào. Trong đó chế độ ăn có chế phẩm synbiotic chứa hàm lượng fructooligosaccharide 0,5% và 1% được ghi nhận có hiệu quả tốt hơn ở tôm thí nghiệm so với tôm ở các chế độ ăn còn lại. Bên cạnh đó, hỗn hợp vi khuẩn *L. lactis* và fructooligosaccharide khi bổ sung vào thức ăn đã không có ảnh hưởng đối với hoạt tính enzyme lysozyme của tôm thẻ chân trắng ở các nghiệm thức thí nghiệm.

Những kết quả đạt được trong nghiên cứu này sẽ cung cấp những thông tin cơ bản về hiệu quả của synbiotic trong hoạt động kích thích các yếu tố đáp ứng miễn dịch của tôm thẻ chân trắng. Mặc dù vậy, cơ chế tương tác giữa vật chủ và chế phẩm synbiotic này vẫn chưa được biết rõ, cơ chế hoạt động vẫn chưa được xác định, do đó vẫn cần có những nghiên cứu sâu hơn để làm rõ thêm những điểm này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adel, M., Yeganeh, S., Dadar, M., & Giri, S. S. (2017). Effect of potential probiotic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* on growth performance, intestinal microbiota, digestive enzyme activities, and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Probiotics and Antimicrobial Protein*, 9, 150 - 156.
- Ajitha, S. I., Sridhar, M., Sridhar, N., Singh, I. S. B. & Varghese, V. (2004). Probiotic effects of lactic acid bacteria against *Vibrio alginolyticus* in *Penaeus (Fenneropenaeus) indicus* (H. Milne Edwards). *Asian Fisheries Science*, 17, 71 - 80.
- Castex, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Nicolas, J.-L., Schmidely, P. &

- Mariojouis, C. (2008). Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture*, 275, 182 - 193.
- Chiu, C.-H., Guu, Y.-K., Liu, C.-H., Pan, T.-M., & Cheng, W. (2007). Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 23, 364 - 377.
- De Vrese, M., & Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, prebiotics, and synbiotics. In: *Food Biotechnology* (pp. 1 - 66). Springer Berlin Heidelberg.
- Dong, C., & Wang, J. (2013). Immunostimulatory effects of dietary fructooligosaccharides on red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *Aquaculture Research*, 44, 1416 - 1424.
- Ellis, A. E. (1990). Lysozyme Assays. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S. and Van Muiswinkel, W.B., Eds., *Techniques in Fish Immunology*, SOS Publications, Fair Haven, 101 - 103.
- Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E., & Ringø, E. (1997). Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia*, 352, 279 - 285.
- Haziyanin, T., Hamid, T. A., Khan, A. J., Jalil, M. F., & Azhar, N. S. (2012). Isolation and screening of lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis* from *Clarias gariepinus* (African catfish) with potential use as probiotic in aquaculture. *African Journal of Biotechnology* 11(29), 7494 - 7499.
- Hikima, S., Hikima, J., Rojtinnakorn, J., Hirono, I., & Aoki, T. (2003). Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. *Gene*, 316, 187 - 95.
- Huynh, T.-H., Cheng, A.-C., Chi, C.-C., Chiu, K.-H., & Liu, C.-H. (2018). A synbiotic improves the immunity of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Metabolomic analysis reveal compelling evidence. *Fish and Shellfish Immunology*, 79, 284 - 293.
- Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagawa, A., Takeno, N., Nishimura H., Maeda M., Kondo M., & Takahashi, Y. (1998). Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture*, 164, 277 - 288.
- Ji, G., Liu, Z., & Leng, X. (2004). Effects of dietary beta-glucan and fructooligosaccharides on the growth and activities of superoxide dismutase and lysozyme of *Trionyx sinensis*. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 13, 36 - 40.
- Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., & Söderhäll, K. (2000). Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191, 45 - 52.
- Kuo, S. M. (2013). The interplay between fiber and the intestinal microbiome in the inflammatory response. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 4(1), 16 - 28.
- Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M. A., Guzmán-Méndez, B. E., & López-Madrid, W. (2003). Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216, 193 - 201.
- Lin, X., & Söderhäll, I. (2011). Crustacean hematopoiesis and the astakine cytokines. *Blood Journal*, 117, 6417 - 6424.
- Linh, N.T.H., Nagai, S., Nagasaka, N., Okane, S., & Taoka, Y. (2018). Effect of *Lactococcus lactis* K-C2 on the growth performance, amino acid content and gut microflora of amberjack *Seriola dumerili*. *Fisheries Science*, 84, 1051 - 1062.
- 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.
- Luna-González, A., Almaraz-Salas, J. C., Fierro-Coronado, J. A., Flores-Miranda, M. del C., González-Ocampo, H. A., & Peraza-Gómez, V. (2012). The prebiotic inulin increases the phenoloxidase activity and reduces the prevalence of WSSV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. *Aquaculture* 362 - 363, 28 - 32.
- Mahious, A., Gatesoupe, F., Hervi, M., Metailler, R., & Ollevier, F. (2006). Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). *Aquaculture International*, 14(3), 219 - 229.
- Nguyen, T. L., Park, C.-I., & Kim, D.-H. (2017). Improved growth rate and disease resistance in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, by probiotic *Lactococcus lactis* WFLU12 isolated from wild marine fish. *Aquaculture*, 471, 113 - 120.
- Nikoskelainen, S., Salminen, S., Bylund, G., & Ouwehand, A. C. (2001). Characterization of the properties of human- and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2430 - 2435.

- Oktaviana, A., Widanami, & Yuhana, M. (2014). The use of synbiotics to prevent IMNV and *Vibrio harveyi* co-infection in *Litopenaeus vannamei*. *HAYATI Journal of Biosciences*, 21(3), 127 - 134.
- Ouwehand, A. C., & Vesterlund, S. (2004). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. *Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker*, 139, 375 - 396.
- Pan, L.-Q., Hu, F.-W., Jing, F.-T., & Liu, H.-J. (2008). The effect of different acclimation temperatures on the prophenoloxidase system and other defence parameters in *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 25, 137 - 142.
- Pandey, K. R, Naik, S. R., & Vakil, B. V. (2015) Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7577 - 7587.
- Partida-Arangué, B. O., Luna-González, A., Fierro-Coronado, J. A., Flores-Miranda, M. del C., & González-Ocampo, H. A. (2012). Effect of inulin and probiotic bacteria on growth, survival, immune response, and prevalence of white spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* cultured under laboratory conditions. *African Journal of Biotechnology*, 12(21), 3366 - 3375.
- Planas, M., Vázquez, J. A., Marqués, J., Pérez-Lomba, R., González, M. P., & Murado, M. (2004). Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. *Aquaculture*, 240, 313 - 329.
- Ringø, E., & Song, S. K. (2016). Application of dietary supplements (synbiotics and probiotics in combination with plant products and β -glucans) in aquaculture. *Aquaculture Nutrition*, 22, 4 - 24.
- Ruiz-Ponte, C., Samain, J., Sanchez, J., & Nicolas, J. (1999). The benefit of a *Roseobacter* species on the survival of scallop larvae. *Marine Biotechnology*, 1, 52 - 59.
- Sang, H. M., Ky, L. T., & Fotedar, R. (2009). Dietary supplementation of mannan oligosaccharide improves the immune responses and survival of marron, *Cherax tenuimanus* (Smith, 1912) when challenged with different stressors. *Fish & Shellfish Immunology*, 27, 341 - 348.
- Scholz, U., Diaz, G. G., Ricque, D., Suarez, L. C., Albores, F. V., & Latchford, J. (1999). Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture*, 176, 271 - 283.
- Sritunyalucksana, K., & Söderhall, K. (2000). The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, 191, 53 - 69.
- Sung, H. H., Kou, G. H., & Song, Y. L. (1994). Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology*, 29, 11 - 17.
- Supphantharika, M., Khunrae, P., Thanardkit, P., & Verduyn, C. (2003). Preparation of spent brewer's yeast β -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Bioresource Technology*, 88, 55 - 60.
- Vaseeharan, B., & Ramasamy, P. (2003). Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letter in Applied Microbiology*, 36, 83 - 87.
- Vazquez, L., Alpuche, J., Maldonado, G., Agundis, C., Pereyra-Morales, A., & Zenteno, E. (2009). Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate Immunity*, 15 (3), 179 - 188.
- Vieira, F. do N., Pedrotti, F. S., Neto, B. C. C., Mourino, J. L. P., Beltrame, E., Martins, M. L., Ramirez, C., & Arana, L. A. V. (2007). Lactic acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. *Brazilian Journal of Oceanography*, 55, 251 - 255.
- Zhang, J., Liu, Y., Tian, L., Yang, H., Liang, G., & Xu, D. (2012). Effects of Dietary mannan oligosaccharide on growth performance, gut morphology and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Short communication. *Fish & Shellfish Immunology*, 33, 1027 - 1032.
- Zhou, Q.-C., Buentello, J. A., & Gatlin III, D. M. (2010). Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 309, 253 - 257.
- Zubaidah, A., Yuhana, M., & Widanami. (2015). Encapsulated synbiotic dietary supplementation at different dosages to prevent vibriosis in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *HAYATI Journal of Biosciences*, 22(4), 163 - 168.