

## ẢNH HƯỞNG CỦA DOPAMINE LÊN ĐỘC LỰC CỦA VI KHUẨN *Streptococcus agalactiae* TRÊN CÁ RÔ PHI (*Oreochromis* sp.)

Nguyễn Đức Quỳnh Anh\*, Nguyễn Nam Quang, Nguyễn Thị Huệ Linh,  
Nguyễn Thị Xuân Hồng, Nguyễn Ngọc Phước

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

\*Tác giả liên hệ: nguyenducquynhanh@hueuni.edu.vn; nguyenducquynhanh@hualf.edu.vn  
Nhận bài: 03/10/2024 Hoàn thành phản biện: 15/11/2024 Chấp nhận bài: 21/11/2024

### TÓM TẮT

Trong mô hình nuôi thâm canh cá rô phi lồng bè với mật độ cao có thể làm động vật thủy sản tiết ra các stress hormone (catecholamine) như norepinephrine, epinephrine và dopamine. Nhiều nghiên cứu đã khẳng định sự có mặt của các hormone này có thể kích thích sự phát triển và độc lực của vi khuẩn gây bệnh. Do vậy, mục đích của nghiên cứu này là đánh giá sự ảnh hưởng của stress hormone dopamine lên độc lực của vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá rô phi, với hai thí nghiệm chính: (1) thí nghiệm bổ sung dopamine vào môi trường nuôi cấy nhằm đánh giá hoạt động thủy phân của các enzyme và sự hình thành màng sinh học biofilm trong điều kiện *in vitro* và (2) thí nghiệm cảm nhiễm cá rô phi với *S. agalactiae* được nuôi trong cấy trong điều kiện có hoặc không bổ sung dopamine. Kết quả thí nghiệm *in vitro* cho thấy bổ sung dopamine ở các nồng độ 50, 100 và 200  $\mu$ M đã tăng cường khả năng hình thành màng sinh học biofilm, đồng thời hoạt động các enzyme lipase, phospholipase và haemolysin được nâng cao nhưng làm giảm sự thủy phân của enzyme caseinase ở vi khuẩn *S. agalactiae*. Thí nghiệm cảm nhiễm cá rô phi với vi khuẩn *S. agalactiae* nuôi cấy trong môi trường bổ sung dopamine nồng độ 50  $\mu$ M, làm tăng tỷ lệ chết của cá rô phi thí nghiệm so với các nghiệm thức đối chứng.

**Từ khóa:** Dopamine, Hoạt tính enzyme, Màng sinh học biofilm, *Streptococcus agalactiae*

## INFLUENCE OF DOPAMINE ON VIRULENCE FACTORS OF *Streptococcus agalactiae* IN TILAPIA (*Oreochromis* sp.)

Nguyen Duc Quynh Anh\*, Nguyen Nam Quang, Nguyen Thi Hue Linh,  
Nguyen Thi Xuan Hong, Nguyen Ngoc Phuoc

University of Agriculture and Forestry, Hue University

\*Corresponding author: nguyenducquynhanh@hueuni.edu.vn; nguyenducquynhanh@hualf.edu.vn

Received: October 3, 2024 Revised: November 15, 2024 Accepted: November 21, 2024

### ABSTRACT

It has been widely found that stress-rearing conditions of intensive tilapia farming in cages could trigger the release of catecholamine stress hormones, including norepinephrine, epinephrine and dopamine in aquatic animals. These hormones could enhance the growth and virulence factors of pathogenic bacteria. Thus, this study aimed to evaluate the effects of the stress hormone dopamine on the virulence of *S. agalactiae* in tilapia with two experiments: (1) impact of dopamine supplemented in enzymatic assays and biofilm formation of *S. agalactiae* in *in vitro* and (2) challenge test in tilapia towards pre-treated or non-treated *S. agalactiae* with dopamine. The results showed that dopamine (50, 100 and 200  $\mu$ M) increased biofilm formation and enzymatic activities of lipase, phospholipase and haemolysin but decreased the caseinolytic activity in *S. agalactiae* compared to those assays in controls and treatments with dopamine 25  $\mu$ M. Results from the challenge test confirmed that pre-treated *S. agalactiae* with dopamine 50  $\mu$ M significantly enhanced the mortality of tilapia in comparison with untreated bacteria and control treatment.

**Keywords:** Dopamine, Enzymatic activity, Biofilm formation, *Streptococcus agalactiae*

## 1. MỞ ĐẦU

Cá rô phi (*Oreochromis* sp.) là một trong bốn đối tượng thủy sản được nuôi phổ biến nhất trên toàn cầu (Romana-Eguia và cs., 2020) với sản lượng đứng thứ hai sau họ cá chép. Ở Việt Nam, cá rô phi được xác định là đối tượng thủy sản chiến lược nhằm phục vụ sản xuất hàng hóa cho tiêu thụ nội địa và xuất khẩu (Quyết định số 985/QĐ-TTg năm 2022). Tuy nhiên, trong những năm gần đây nghề nuôi cá rô phi đang gặp nhiều khó khăn và thách thức với sự bùng nổ bệnh lồi mắt và xuất huyết do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra. Bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá rô phi có khả năng gây thiệt hại nghiêm trọng, với tỷ lệ chết lên đến 70% chỉ trong 5 - 7 ngày (Nguyễn Ngọc Phước và cs., 2019). Khả năng gây bệnh của vi khuẩn *S. agalactiae* phụ thuộc vào nhiều yếu tố độc lực đã được nghiên cứu và công bố rộng rãi, như lớp polysaccharide ở màng tế bào,  $\beta$ -haemolysin/cytolysin, glycoprotein *Srr1*, nuclease A và một số protein bề mặt có vai trò liên kết với các tế bào vật chủ, nguyên sinh chất và máu (Li và cs., 2014).

Catecholamine stress hormone là những chất hóa học có bản chất là các acid amin và được cơ thể vật chủ tạo ra khi căng thẳng (stress), bao gồm: norepinephrine, epinephrine và dopamine (Sharaff và Freestone, 2011). Sự tích lũy nồng độ stress hormone trong cơ thể ảnh hưởng đến sự suy giảm hệ thống miễn dịch vật chủ (Reiche và cs., 2005) và có liên quan trực tiếp đến sự tăng trưởng và độc lực vi khuẩn (Belay và cs., 2003; Sharaff và Freestone, 2011). Cơ chế này cho phép các vi sinh vật tìm được các ký chủ tiềm năng và sau đó gia tăng về số lượng và độc lực nhằm xâm nhập vào vật chủ thành công. Theo Lesouhaitier và cs. (2009), stress hormone có khả năng kích thích sự gia tăng số lượng tế bào và các yếu tố độc lực ở nhiều vi khuẩn Gram (-), bao

gồm: sự tạo thành màng sinh học biofilm, sản xuất các enzyme ngoại bào và độc tố, các chất kết dính và khả năng giao tiếp của vi khuẩn (quorum sensing). Khả năng nhận biết và phản ứng với các stress hormone đã được xác nhận ở nhiều vi khuẩn gây bệnh trên động vật thủy sản như: *Aeromonas hydrophila* (Kinney và cs., 1999; Ramona và cs., 2024), *Vibrio parahaemolyticus* (Nakano và cs., 2007; Yang và cs., 2021), *V. anguillarum* và *V. campbellii* (Pande và cs., 2014), *V. harveyi* (Yang và cs., 2014; Nguyễn Đức Quỳnh Anh và cs., 2024) và *Yersinia ruckeri* (Torabi Delshad và cs., 2019).

Cá rô phi là loài cá có khả năng chịu đựng và thích nghi tốt với điều kiện môi trường nước nên có thể nuôi với mật độ cao lên tới 2,32 kg/m<sup>3</sup> (Komal và cs., 2024). Tuy nhiên, trong điều kiện nuôi lồng bè trên sông với mật độ nuôi cao và sự biến động thường xuyên của các yếu tố môi trường nước đặc biệt là oxy hoà tan được cho là nguyên nhân làm tăng nồng độ stress hormone trong máu (Komal và cs., 2024). Sự thay đổi nồng độ stress hormone làm suy giảm hệ thống miễn dịch vật chủ và tăng nguy cơ nhiễm bệnh ở động vật thủy sản (Lacoste và cs., 2001; Cheng và cs., 2006). Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu về mối quan hệ giữa các stress hormone với độc lực của vi khuẩn Gram (-) gây bệnh trên động vật thủy sản (Nguyễn Đức Quỳnh Anh và cs., 2024; Ramona và cs., 2024; Torabi Delshad và cs., 2019), hiện nay vẫn chưa có nghiên cứu nào về sự tương tác của các yếu tố này trên đối tượng vi khuẩn Gram (+) gây bệnh cho nhiều loài thủy sản như *S. agalactiae*. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của dopamine lên một số yếu tố độc lực của vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi.

## 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nội dung nghiên cứu

Nghiên cứu này được thực hiện với ba nội dung chính bao gồm:

- Ảnh hưởng của nồng độ dopamine lên hoạt động thủy phân của enzyme lipase, phospholipase, caseinase và haemolysin ở vi khuẩn *S. agalactiae*

- Ảnh hưởng của nồng độ dopamine lên sự tạo thành màng sinh học biofilm ở vi khuẩn *S. agalactiae*

- Đánh giá tỷ lệ sống của cá rô phi cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* trong môi trường có hoặc không bổ sung dopamine

### 2.2. Vật liệu nghiên cứu

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

Chủng vi khuẩn *S. agalactiae* (Sequence Type ST 1395) phân lập từ mẫu bệnh phẩm cá rô phi bị lỗi mắt xuất huyết tại tỉnh Thừa Thiên Huế (Phuoc và cs., 2021) được bảo quản trong dung dịch glycerol 20% ở nhiệt độ -80°C. Vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường Tryptic soy agar (TSA, Himedia, Ấn Độ) và nuôi cấy tăng sinh trong môi trường Tryptic soy broth (TSB, Himedia, Ấn Độ) với tốc độ lắc duy trì 180 vòng/phút ở nhiệt độ 28°C. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng máy quang phổ UV-VIS (U2900, Hitachi, Nhật Bản) tại bước sóng 600 nm, với OD = 1 tương ứng mật độ tế bào là  $10^8$  CFU/mL (Phuoc và cs., 2021).

#### 2.2.2. Dopamine

Trong nghiên cứu này dopamine hydrochloride (Sigma-Aldrich, Singapore) được pha loãng với nước cất và lọc qua giấy lọc với có kích thước 0,2  $\mu$ m để tạo thành dung dịch có nồng độ gốc 10 mM và bảo quản ở -20°C.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Ảnh hưởng của nồng độ dopamine lên hoạt động thủy phân của enzyme lipase, phospholipase, caseinase và haemolysin của vi khuẩn *S. agalactiae*

Ảnh hưởng của hormone dopamine lên hoạt động thủy phân của enzyme vi khuẩn *S. agalactiae* được thực hiện theo phương pháp của Yang và cs. (2014). Cụ thể, môi trường TSA sau khi hấp diệt trùng (121°C, 15 phút) và để nguội ở 55°C được bổ sung cơ chất và dopamine với các nồng độ 25, 50, 100 và 200  $\mu$ M. Nghiệm thức đối chứng được chuẩn bị hoàn toàn như trên nhưng không bổ sung dopamine.

Hoạt tính thủy phân của enzyme lipase được thực hiện bằng cách nhỏ 5  $\mu$ L huyền phù vi khuẩn nuôi cấy trong môi trường TSB và pha loãng đến giá trị mật độ quang học OD = 0,5 trên đĩa thạch có hoặc không bổ sung (đối chứng) dopamine và 1% Tween 80 (Xilong, Trung Quốc). Sau đó, khả năng thủy phân của enzyme trong các nghiệm thức được so sánh dựa vào giá trị trung bình của tỷ lệ giữa đường kính vòng thủy phân và đường kính khuẩn lạc đo được sau khi ủ 24 giờ ở 28°C. Hoạt động của enzyme phospholipase, caseinase và haemolysin được tiến hành hoàn toàn tương tự với enzyme lipase. Trong đó hoạt tính enzyme phospholipase được thực hiện bằng cách thay thế cơ chất là Tween 80 bằng 1% nhũ tương lòng đỏ trứng (egg yolk emulsion - Sigma-Aldrich). Hoạt tính enzyme caseinase và haemolysin được thực hiện với 4% bột sữa tách béo (A2, Woolworths, Úc) hoặc 5% máu cừu (Nam Khoa, Việt Nam). Thí nghiệm được thực hiện với 24 lần lặp lại cho mỗi enzyme và mỗi nồng độ dopamine nghiên cứu.

#### 2.3.2. Ảnh hưởng của hormone dopamine lên khả năng tạo màng sinh học biofilm của vi khuẩn *S. agalactiae*

Khả năng tạo thành màng sinh học của vi khuẩn được xác định bằng mật độ vi khuẩn bám dính vào đĩa nhựa 96 giếng và thực hiện bằng phương pháp nhuộm màu cristal violet theo mô tả của Yang và cs. (2014). Cụ thể, *S. agalactiae* được nuôi trong môi trường TSB ở nhiệt độ 28°C trong 18 giờ. Sinh khối vi khuẩn được pha loãng

về giá trị  $OD_{600} = 0,1$ ; sau đó dopamine được thêm vào môi trường để đạt các nồng độ thí nghiệm là 0 (đối chứng), 25, 50, 100 và 200  $\mu M$ . Sau đó, 200  $\mu L$  dung dịch huyền phù vi khuẩn với các nồng độ dopamine khác nhau được chuyển vào đĩa nhựa 96 giếng (đáy phẳng). Mỗi nghiệm thức được thực hiện lặp lại trên 6 giếng và được ủ ở nhiệt độ  $28^{\circ}C$  trong 48 giờ. Để loại bỏ các vi khuẩn không bám dính vào đĩa nhựa, dung dịch huyền phù được hút bỏ và các giếng được rửa 3 lần với 300  $\mu L$  nước muối sinh lý (0,86% NaCl) tiệt trùng. Sau đó, vi khuẩn còn lại trong giếng được cố định bằng 150  $\mu L$  methanol 99% trong 20 phút. Tiếp theo, methanol được loại bỏ và đĩa nhựa được để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng, và nhuộm với 150  $\mu L$  thuốc nhuộm tím crystal violet (1%) trong 15 phút. Thuốc nhuộm được rửa sạch dưới vòi nước chảy đến khi không còn màu tím. Đĩa nhựa để khô hoàn toàn và sau cùng thêm vào 150  $\mu L$  ethanol 95% và đo mật độ quang bằng máy đo OD ở bước sóng 570 nm.

### 2.3.3. Tỷ lệ sống của cá rô phi cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* trong môi trường có hoặc không bổ sung dopamine

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá rô phi đỏ (điều hồng) được bố trí trong bể nhựa (80L). Bể nhựa được khử trùng bằng chlorine, phơi khô và cấp 50L nước ngọt. Mật độ cá thí nghiệm là 20 con/bể với khối lượng trung bình 6,2 g/con.

Cá thí nghiệm: Cá rô phi mua từ Trại giống Võ Liêm (Tây Lộc, Huế, Thừa Thiên Huế) được nuôi cách ly 14 ngày trong bể composite 1000 L tại phòng thí nghiệm khoa Thủy sản, trường Đại học Nông Lâm trước khi đưa vào thí nghiệm chính thức. Hàng ngày cá được cho ăn bằng 3% trọng lượng thân với thức ăn CP (Việt Nam; với thành phần gồm: độ ẩm (max): 11%, protein

thô (min): 35%, proetin tiêu hóa (min): 28%, chất béo tổng số (max): 5%, xơ thô (max): 6%, Ca: 1-2%, P tổng số: 1-2%, lysin tổng số: 1-4%, methionine + cystine: 1%) vào lúc 8 giờ và 14 giờ. Chế độ sục khí được duy trì liên tục suốt thời gian thí nghiệm và nước được thay khoảng 10-20% hàng ngày trong quá trình xi phong. Các thông số môi trường chất lượng nước được duy trì và điều chỉnh ở mức: nhiệt độ:  $32 - 35^{\circ}C$ , pH: 6,5 - 7,0, DO: > 5 mg/L,  $NH_3$  < 0,3 mg/L. Cá trước khi thí nghiệm được kiểm tra đảm bảo không nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* bằng cách lấy ngẫu nhiên mẫu nảo của 5 cá và nuôi cấy trên môi trường TSA ở  $28^{\circ}C$  trong 24 giờ và quan sát sự phát triển của vi khuẩn (Phuoc và cs., 2021).

Chuẩn bị vi khuẩn: Vi khuẩn *S. agalactiae* được nuôi trong môi trường TSB hoặc trong TSB có bổ sung dopamine với nồng độ 50  $\mu M$  (căn cứ theo kết quả của thí nghiệm *in vitro*). Sau 24 giờ nuôi cấy, sinh khối của vi khuẩn được thu lại sau quá trình ly tâm và rửa với nước muối sinh lý tiệt trùng. Nồng độ vi khuẩn sử dụng trong quá trình cảm nhiễm được căn cứ theo liều lượng gây chết 50% -  $LD_{50}$  là  $10^6$  CFU/mL (Phuoc và cs., 2021).

Cảm nhiễm cá: Trong thí nghiệm này, cá được tiêm vào xoang bụng 0,1 mL dung dịch vi khuẩn (nuôi cấy trong môi trường TSB hoặc TSB bổ sung 50  $\mu M$  dopamine) hoặc nước muối sinh lý (đối chứng). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần cho mỗi nghiệm thức (với tổng số cá 180 con). Cá sau khi tiêm được thả trở lại trong các bể thí nghiệm, với các yếu tố môi trường nước và các biện pháp chăm sóc quản lý được thực hiện hoàn toàn như miêu tả ở trên. Thí nghiệm kéo dài trong 14 ngày, số lượng cá chết được theo dõi và ghi lại hàng ngày, tỷ lệ sống của cá (TLS) được tính bằng công thức:

$$TLS (\%) = \frac{\text{số cá sống}}{\text{tổng số cá thí nghiệm}} \times 100$$

### 2.3.4. Phương pháp xử lý số liệu

Hoạt động thủy phân của các enzyme ở các nghiệm thức khác nhau được so sánh bằng phương pháp ANOVA với kiểm định Tukey post hoc, sử dụng mức ý nghĩa  $p < 0,05$  trên phần mềm SPSS phiên bản IBM SPSS 23.0. Trước khi thực hiện phân tích ANOVA, phân bố chuẩn và sự đồng nhất phương sai được kiểm tra bằng kiểm định Shapiro-Wilk và Levene's test. Nếu phương sai không đồng nhất, phép so sánh nhiều cặp - Multiple comparisons of Dunnett T3 sẽ được áp dụng. Tỷ lệ sống của cá rô phi sau cảm nhiễm được phân tích bằng phương pháp Kaplan-Meier (Survival analysis) với phần mềm GraphPad Prism 9.0.

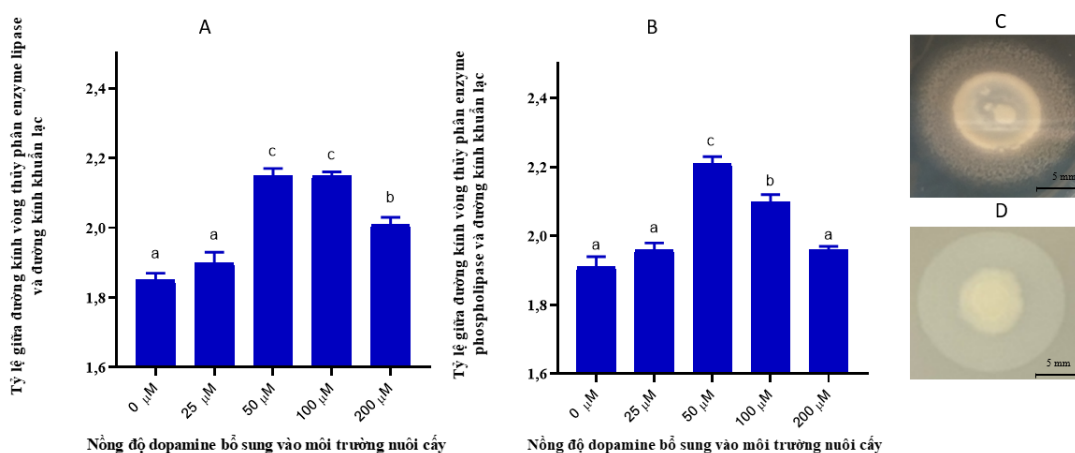
## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ dopamine lên hoạt động thủy phân của enzyme lipase, phospholipase, caseinase và haemolysin ở vi khuẩn *S. agalactiae*

Hoạt động thủy phân của tất cả enzyme của vi khuẩn *S. agalactiae* thử nghiệm đều chịu sự ảnh hưởng của dopamine được bổ sung trong môi trường thử nghiệm. Ở các nồng độ dopamine 50,

100 và 200  $\mu\text{M}$  hoạt động của enzyme caseinase giảm thấp, ngược lại sự hiện diện của dopamine ở ba nồng độ trên đẩy mạnh sự thủy phân của các enzyme còn lại bao gồm lipase, phospholipase và haemolysin so với đối chứng ( $p < 0,05$ ).

Bổ sung dopamine 50, 100 và 200  $\mu\text{M}$  tăng cường hoạt động thủy phân của enzyme lipase (Hình 1A). Trong đó, ở nghiệm thức bổ sung 50 và 100  $\mu\text{M}$  dopamine cho tỷ lệ đường kính vòng thủy phân và đường kính khuẩn lạc cao nhất đạt 2,15 so với các nghiệm thức còn lại ( $p < 0,05$ ). Kết quả này hoàn toàn tương đồng với kết quả thử nghiệm ảnh hưởng của epinephrine (một catecholamine stress hormone khác) lên hoạt tính của enzyme lipase trên vi khuẩn *V. harveyi*, cụ thể tăng nồng độ của epinephrine trong các thử nghiệm ở các nồng độ 50, 100 và 200  $\mu\text{M}$  đều làm tăng hoạt tính của enzyme lipase so với đối chứng và nghiệm thức bổ sung epinephrine 25  $\mu\text{M}$  (Nguyễn Đức Quỳnh Anh và cs., 2024). Tuy vậy cơ chế tác động của các loại stress hormone như dopamine lên hoạt động thủy phân của enzyme lipase vẫn chưa được hiểu rõ.



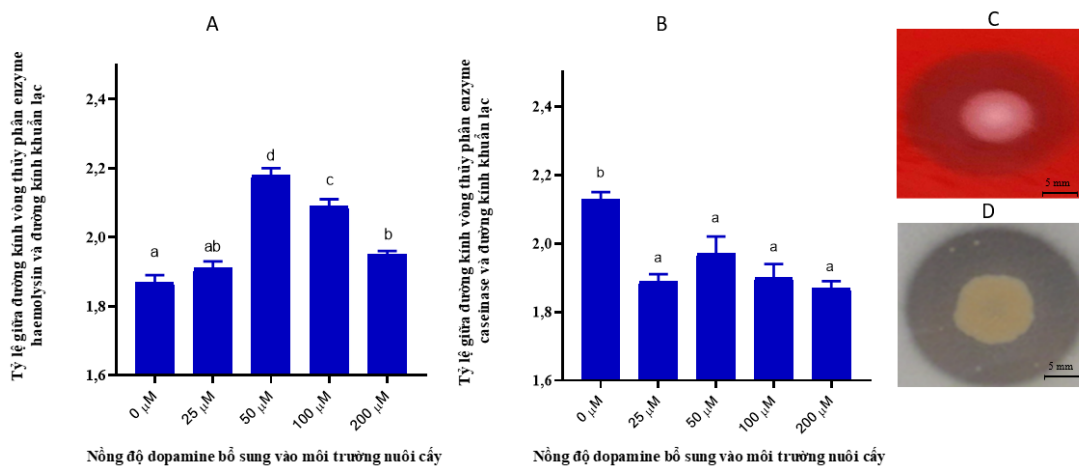
**Hình 1.** Tác động của dopamine lên khả năng thủy phân của enzyme lipase (A), phospholipase (B) ở vi khuẩn *S. agalactiae* và hoạt tính của lipase (C) và phospholipase (D) trên môi trường thí nghiệm

Dữ liệu trong đồ thị được thể hiện dưới dạng Giá trị trung bình  $\pm$  sai số chuẩn, các kí tự a,b,c khác nhau biểu thị sự khác biệt thống kê ( $p < 0,05$ ) giữa các nghiệm thức

Hoạt động enzyme phospholipase thể hiện mạnh nhất ở nghiệm thức bổ sung dopamine trong môi trường ở nồng độ 50 và 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) (Hình 1B). Ở nghiệm thức bổ sung dopamine 25 và 200  $\mu\text{M}$ , hoạt tính của enzyme này không thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ( $p > 0,05$ ). Phospholipase là enzyme có khả năng thủy phân phospholipid, trong đó phospholipid và protein là hai thành phần hóa học chính cấu thành lớp vỏ tế bào của ký chủ. Vì vậy, phospholipase có thể liên quan đến các quá trình gây tổn thương màng tế bào, đảm bảo sự thành công của quá trình xâm nhập ký chủ (Istivan và Coloe, 2006). Theo Nguyễn Đức Quỳnh Anh và cs. (2024), bổ sung epinephrine ở các nồng độ  $> 25 \mu\text{M}$  làm gia tăng hoạt tính của enzyme phospholipase trên vi khuẩn *V. harveyi*. Tuy nhiên nhóm tác giả vẫn chưa giải thích được cơ chế ảnh hưởng của stress hormone

epinephrine lên hoạt tính của enzyme phospholipase. Khác với các kết quả trên, nghiên cứu của Yang và cs. (2014) trên cùng đối tượng vi khuẩn *V. harveyi* đã khẳng định việc bổ sung các stress hormone norepinephrine và dopamine (nồng độ 50 và 100  $\mu\text{M}$ ) không ảnh hưởng đến hoạt tính của phospholipase. Từ đó có thể thấy được tác dụng của các stress hormone lên hoạt tính của enzyme thủy phân rất khác nhau cho dù được thử nghiệm trên cùng một đối tượng nghiên cứu.

Hoạt tính tan huyết của enzyme haemolysin được thể hiện ở khả năng phá vỡ, thủy phân tế bào hồng cầu, từ đó ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng sinh lý của hồng cầu. Trên môi trường thạch máu cừu, vi khuẩn *S. agalactiae* thể hiện kiểu tan máu  $\beta$  thủy phân hoàn toàn tế bào máu và hình thành vòng thủy phân trong suốt xung quanh khuẩn lạc (Hình 2C).



**Hình 2.** Tác động của dopamine lên khả năng thủy phân của enzyme haemolysin (A), caseinase (B) ở vi khuẩn *S. agalactiae* và hoạt tính của haemolysin (C), caseinase (D) trên môi trường nuôi cấy. Dữ liệu trong đồ thị được thể hiện dưới dạng Giá trị trung bình  $\pm$  sai số chuẩn, các kí tự a, b, c khác nhau biểu thị sự khác biệt thống kê ( $p < 0,05$ ) giữa các nghiệm thức

Tác động của dopamine lên hoạt động của enzyme haemolysin hoàn toàn tương tự như kết quả thử nghiệm với enzyme lipase và phospholipase. Bổ sung dopamine 25  $\mu\text{M}$  trong môi trường thạch máu không ảnh hưởng đến sự phân giải hồng cầu của haemolysin so với nghiệm thức

đối chứng ( $p > 0,05$ ). Enzyme này thể hiện hoạt động thủy phân mạnh nhất ở nồng độ dopamine 50 và 100  $\mu\text{M}$ , và suy giảm ở nồng độ 200  $\mu\text{M}$  (Hình 2A). Hoạt tính của enzyme haemolysin phụ thuộc vào nồng độ dopamine trong thí nghiệm trên hoàn toàn tương đồng với công bố của Nguyễn Đức

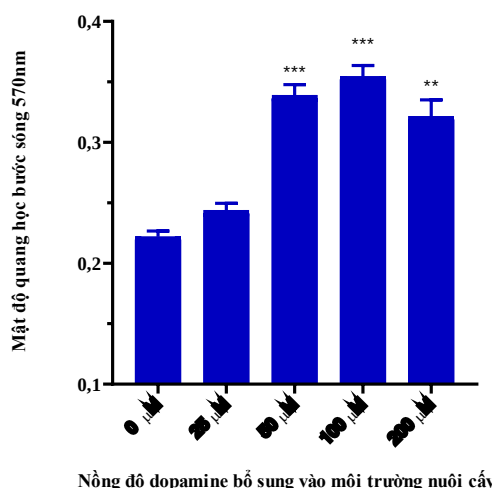
Quỳnh Anh và cs. (2024) khi thử nghiệm với hormone epinephrine trên vi khuẩn *V. harveyi*. Gần đây, nghiên cứu ảnh hưởng của dopamine lên khả năng làm tan huyết của vi khuẩn *A. hydrophila* cũng đã chỉ ra các nồng độ 25, 50, 75 và 100  $\mu\text{M}$  dopamine bổ sung trong thạch máu cừu làm tăng hoạt tính của enzyme haemolysin so với đối chứng ( $p < 0,05$ ), trong đó vòng tan huyết lớn nhất được ghi nhận ở nghiệm thức có nồng độ 50  $\mu\text{M}$  và giảm dần từ 75 đến 100  $\mu\text{M}$  (Ramona và cs., 2024). Khác với các kết quả trên, công bố của Yang và cs. (2014) cho thấy bổ sung norepinephrine và dopamine không làm thay đổi hoạt tính của enzyme haemolysin ở vi khuẩn *V. harveyi*. Hoạt tính của enzyme haemolysin biểu hiện khác nhau như vậy có thể giải thích do hoạt tính phân giải máu của haemolysin chịu sự ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố môi trường. Nghiên cứu của Romalde và Toranzo (1993) ở vi khuẩn *Y. ruckeri* đã xác nhận các sản phẩm sinh ngoại bào của vi khuẩn này chỉ có thể phân giải máu cừu và máu cá hồi khi nuôi cấy trên thạch máu mềm. Tương tự, vi khuẩn *Salmonella typhi* không thể hiện khả năng phân giải hồng cầu trên môi trường thạch máu (Huang và DuPont, 2005), nhưng bổ sung catecholamine ở môi trường thạch máu lỏng đã làm tăng hoạt động của haemolysin đến 40% (Karavolos và cs., 2011). Theo tác giả, ảnh hưởng của norepinephrine và epinephrine lên hoạt tính enzyme haemolysin được cho là có liên quan đến sự giảm biểu hiện của protein A màng tế bào (OmpA) do các hormone này liên kết với thụ thể CpxAR. Sự suy giảm biểu hiện của protein này làm tăng sự bong tróc và tăng tiết haemolysin ở màng ngoài. Do vậy để xác định cơ chế ảnh hưởng của dopamine lên hoạt tính enzyme haemolysin ở vi khuẩn *S. agalactiae*, những nghiên cứu

sau có thể tập trung vào sự biểu hiện của các gene hoặc protein liên quan đến hoạt động gây tan huyết trong môi trường có hoặc không bổ sung hormone này.

Caseinase là một enzyme thuộc nhóm protease và là sản phẩm ngoại bào quan trọng đối với sự phát triển và xâm nhập vật chủ thành công của vi khuẩn. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này sự có mặt của dopamine ở các nồng độ khác nhau đều làm giảm khả năng thủy phân của caseinase so với nghiệm thức đối chứng ( $p < 0,05$ ) (Hình 2B). Kết quả này khác hoàn toàn so với công bố của Nguyễn Đức Quỳnh Anh và cs. (2024) trên vi khuẩn *V. harveyi* khi bổ sung hormone epinephrine (tăng hoạt tính của caseinase). Nguyên nhân của sự khác biệt này có thể là do vi khuẩn *S. agalactiae* là Gram (+) có cấu trúc màng tế bào khác so với các vi khuẩn Gram (-) và/hoặc vi khuẩn này có những phản ứng khác biệt trong điều kiện vật chủ bị stress (hoặc có mặt của stress hormone như dopamine). Ngoài ra, cũng có thể sản phẩm enzyme như caseinase không đóng vai trò là một yếu tố độc lực của chủng vi khuẩn *S. agalactiae* sử dụng trong nghiên cứu này.

### 3.2. Ảnh hưởng của dopamine lên khả năng tạo thành màng sinh học của vi khuẩn *S. agalactiae*

Sự có mặt của dopamine với nồng độ 50, 100 và 200  $\mu\text{M}$  làm tăng khả năng tạo thành màng sinh học biofilm của vi khuẩn *S. agalactiae* so với nghiệm thức đối chứng ( $p < 0,001$ ). Ở nồng độ dopamine 25  $\mu\text{M}$  không làm ảnh hưởng đến khả năng tạo màng sinh học biofilm của vi khuẩn này so với nghiệm thức đối chứng ( $p > 0,05$ ) (Hình 3).



**Hình 3.** Ảnh hưởng của dopamine lên khả năng tạo thành màng sinh học biofilm ở vi khuẩn *S. agalactiae*

Số liệu trong đồ thị được biểu diễn ở dạng Giá trị trung bình  $\pm$  sai số chuẩn, các kí hiệu \*\*\*, \*\* và \* chỉ sự khác biệt thống kê ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  và  $p < 0,05$ ) giữa nghiệm thức thí nghiệm và đối chứng

Theo Cambrone et al. (2019), sự tạo thành màng sinh học biofilm có thể nâng cao tốc độ tăng trưởng và tỷ lệ sống của vi khuẩn do được tiếp cận với nguồn dinh dưỡng đầy đủ, đồng thời màng sinh học biofilm có thể giúp bảo vệ vi khuẩn khỏi hệ thống miễn dịch của vật chủ và các hợp chất kháng khuẩn. Đối với đa số vi khuẩn, khả năng tạo thành màng sinh học biofilm là yếu tố quan trọng hàng đầu giúp vi khuẩn xâm lấn và sống sót thành công trong môi trường cơ thể vật chủ. Catecholamine được chứng minh có khả năng kích thích sự hình thành màng sinh học biofilm ở nhiều loài vi khuẩn. Lyte et al. (2003) đã kết luận inotropes, norepinephrine và dobutamine làm tăng khả năng tạo màng sinh học biofilm của vi khuẩn *Staphylococcus epidermidis* trên cả hai loại bề mặt là polystyrene and silicone. Tương tự, norepinephrine và dopamine làm tăng khả năng hình thành biofilm và sản phẩm exopolysaccharides ở vi khuẩn gây bệnh ở động vật thủy sản như *V. harveyi*, và *Y. ruckeri* (Yang et al., 2014, Torabi Delshad et al., 2019) và *V. parahaemolyticus* (Yang et al., 2021). Theo Cambrone et al. (2019), epinephrine có khả năng làm tăng sự tạo thành màng sinh học biofilm có thể

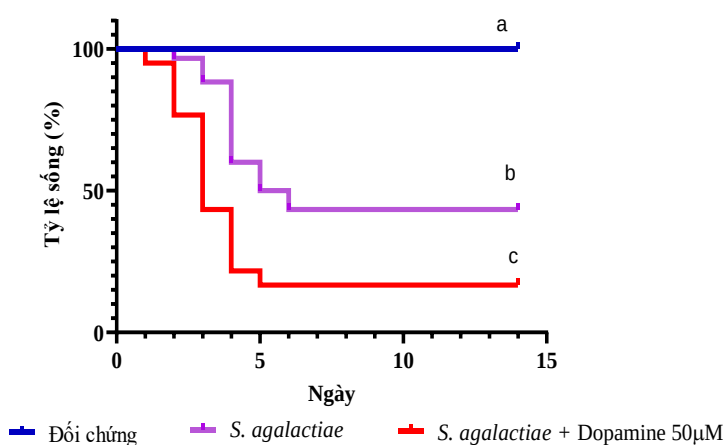
do epinephrine ảnh hưởng lên hệ thống các sợi protein polymere động gọi là pili loại IV (type IV pili) trên bề mặt vi khuẩn, từ đó làm tăng khả năng bám dính và tạo màng sinh học biofilm của vi khuẩn. Hệ thống các pili loại IV này có vai trò quan trọng trong việc chuyển đổi từ trạng thái di động của vi khuẩn sang trạng thái bám dính vào bề mặt giá thể, là điều kiện cần thiết để tạo màng biofilm của vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*. Ngoài ra, hệ thống pili loại IV này còn được tìm thấy ở nhiều vi khuẩn Gram (+), trong đó có *S. agalactiae* và nó có vai trò quan trọng trong quá trình điều khiển sự di động, bám dính và xâm nhập vào vật chủ (Konto-Ghiorgi et al., 2009). Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, *S. agalactiae* NEM316 có thể tạo thành màng sinh học biofilm và nếu gây đột biến pilA, pilB (2 trong 3 subunit protein của pili loại IV), khả năng tạo thành màng sinh học của chủng vi khuẩn này giảm đáng kể. Do vậy, sự gia tăng khả năng hình thành màng sinh học biofilm trong nghiên cứu này cũng có thể do dopamine có ảnh hưởng tương tự trên vi khuẩn *S. agalactiae* thông qua hệ thống pili loại IV.



### 3.3. Tỷ lệ sống của cá rô phi cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* trong môi trường có hoặc không bổ sung dopamine

Từ các kết quả nghiên cứu *in vitro*, nồng độ dopamine 50  $\mu\text{M}$  là mức thấp nhất có tác động lớn nhất đến hoạt động của các enzyme và tạo thành màng sinh học biofilm, vì vậy trong thí nghiệm xác định khả năng gây bệnh của vi khuẩn *S. agalactiae* lên cá rô phi, chúng tôi nuôi cấy *S. agalactiae* trong môi trường TSB bổ sung thêm 50  $\mu\text{M}$  dopamine. Tỷ lệ sống của cá rô phi cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae* nuôi cấy trong TSB bổ sung dopamine thấp nhất đạt 16,7% so với các nghiệm thức đối chứng ( $p < 0,05$ ). Cá cảm nhiễm với vi khuẩn nuôi cấy tăng sinh trong điều kiện bình thường (TSB, không bổ sung dopamine) có tỷ lệ sống là 43,3% (Hình 4). Ở nghiệm thức bổ sung dopamine, cá có hiện tượng chết nhanh và sớm hơn so với cá chỉ cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae*, chủ yếu trong 2-4 ngày đầu tiên của thí nghiệm. Nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* (nuôi trong TSB, không bổ sung dopamine) cá bắt đầu chết từ ngày thứ 2 đến ngày 6, và chết tập trung trong ngày 3-5. Tất cả cá chết trong thí nghiệm đều có dấu hiệu bỏ ăn, bơi lờ đờ và mất cá lồi và đục như miêu tả của Phuoc và cs. (2021) và *S. agalactiae* được

tái phân lập từ mẫu não của cá mang dấu hiệu bệnh lý trên. Cá ở nghiệm thức đối chứng (tiêm nước muối sinh lý) có tỷ lệ sống 100% và không có dấu hiệu của bệnh. Tác động của stress hormone tới độc lực vi khuẩn gây bệnh trên động vật thủy sản đã được báo cáo trên artemia (*Artemia franciscana*), tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii*), cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*) và cá diếc (*Carassius carassius*). Cảm nhiễm artemia và tôm càng xanh tương ứng với vi khuẩn *V. harveyi* và *V. campbelli* trong môi trường nuôi có norepinephrine/ dopamine làm tăng mạnh tỷ lệ chết của artemia và tôm càng xanh so với đối chứng (Yang và cs., 2014; Pande và cs., 2014). Tương tự, cá hồi vân và cá diếc cảm nhiễm vi khuẩn *Y. ruckeri* (Torabi Delshad và cs., 2019) và *A. hydrophila* (Gao và cs., 2019) trong môi trường có bổ sung hormone cũng làm tăng tỷ lệ chết của cá cảm nhiễm. Nghiên cứu gần đây, Nguyễn Đức Quỳnh Anh và cs. (2024) kết luận tỷ lệ sống của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) đạt thấp nhất khi cảm nhiễm với vi khuẩn *V. harveyi* được bổ sung epinephrine trong môi trường nuôi cấy (11,7%) so với các nghiệm thức đối chứng là 40% và 98%. Dựa vào các kết quả nghiên cứu trên có thể kết luận rằng dopamine đã làm tăng độc lực của vi khuẩn *S. agalactiae*, do đó làm tăng tỷ lệ chết của cá rô phi.



**Hình 4.** Tỷ lệ sống của cá rô phi cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*  
 Các ký tự a, b, c khác nhau biểu thị sự khác biệt thống kê giữa các nghiệm thức dựa trên phân tích tỷ lệ sống Kaplan-Meier (Survival analysis – Graphpad Prism)

#### 4. KẾT LUẬN

Bổ sung dopamine (50, 100 và 200  $\mu\text{M}$ ) vào môi trường nuôi cấy làm tăng khả năng tạo màng sinh học biofilm, tăng hoạt tính enzyme lipase, phospholipase, haemolysin và làm giảm hoạt tính của enzyme caseinase. Tỷ lệ sống của cá rô phi trong thí nghiệm cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae* trong điều kiện nuôi có bổ sung dopamine 50  $\mu\text{M}$  thấp hơn (16,7%) so với nghiệm thức không bổ sung dopamine (43,3%).

#### LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của Nhóm nghiên cứu tiêu biểu Đại học Huế mã số NCTB.ĐHH.2025.08 và Đề tài cấp cơ sở trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế mã số DHL2024-TS-02.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

##### 1. Tài liệu tiếng Việt

Nguyễn Đức Quỳnh Anh, Nguyễn Thị Huệ Linh, Nguyễn Nam Quang, Huỳnh Văn Vi và Nguyễn Ngọc Phước. (2024). Ảnh hưởng của epinephrine lên độc lực vi khuẩn *Vibrio harveyi* trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp- Đại học Nông Lâm, Đại học Huế*, 8(1), 4015-4026.

Nguyễn Ngọc Phước, Nguyễn Thị Huệ Linh và Trần Thị Nhật Anh. (2019). Phân lập và xác định một số đặc điểm sinh học các chủng *Streptococcus agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi đỏ (*Oreochromis* sp.) nuôi tại Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế*, 3(3), 1591-1601.

##### 2. Tài liệu tiếng nước ngoài

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.

Cambrone, M., Tortuel, D., Biaggini, K., Maillot, O., Taupin, L., Réhel, K., Rincé, I.,

Muller, C., Hardouin, J., Feuilloley, M., Rodrigues, S., & Connil, N. (2019). Epinephrine affects motility, and increases adhesion, biofilm and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* H103. *Scientific reports*, 9(1), 20203.

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.

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.

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 Rep*, 12(3), 252-258.

Kinney, K. S., Austin, C. E., Morton, D. S., & Sonnenfeld, G. (1999). Catecholamine enhancement of *Aeromonas hydrophila* growth. *Microbial Pathogenesis*, 26(2), 85-91.

Komal, W., Fatima, S., Minahal, Q., & Liaqat, R. (2024). Investigating the optimum stocking density of tilapia (*Oreochromis niloticus*) for intensive production focused to in-pond raceway system. *Science Progress*, 107(2), 00368504241257128.

Konto-Ghiorgi, Y., Mairey, E., Mallet, A., Duménil, G., Caliot, E., Trieu-Cuot, P., & Dramsi, S. (2009). Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS pathogens*, 5(5), e1000422.

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.

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.
- Li, W., Su, Y. L., Mai, Y. Z., Li, Y. W., Mo, Z. Q., & Li, A. X. (2014). Comparative proteome analysis of two *Streptococcus agalactiae* strains from cultured tilapia with different virulence. *Veterinary Microbiology*, 170(1-2), 135-143.
- Lyte, M., Freestone, P. P., Neal, C. P., Olson, B. A., Haigh, R. D., Bayston, R., & Williams, P. H. (2003). Stimulation of *Staphylococcus epidermidis* growth and biofilm formation by catecholamine inotropes. *The Lancet*, 361(9352), 130-135.
- Nakano, M., Takahashi, A., Sakai, Y., Kawano, M., Harada, N., Mawatari, K., & Nakaya, Y. (2007). Catecholamine-induced stimulation of growth in *Vibrio* species. *Letters in applied microbiology*, 44(6), 649-653.
- 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.
- Phuoc, N. N., Linh, N. T. H., Crestani, C., & Zadoks, R. N. (2021). Effect of strain and environmental conditions on the virulence of *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*; GBS) in red tilapia (*Oreochromis* sp.). *Aquaculture*, 534, 736256.
- Sharaff, F., & Freestone, P. (2011). Microbial endocrinology. *Central European Journal of Biology*, 6, 685-694.
- Reiche, E. M. V., Morimoto, H. K., & Nunes, S. M. V. (2005). Stress and depression-induced immune dysfunction: implications for the development and 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.
- Ramona, Y., Darmayasa, I. B. G., Widiyanti, N. P., Shanti, N. N. B. D., Hani, N. L., Julyantoro, P. G. S., Oktariani, A.F., & Shetty, K. (2024). Catecholamines (dopamine) increases the virulence of *Aeromonas hydrophila* ATCC AH-1N, the causative agent of motile *Aeromonas* septicemia (MAS). *한국미생물생명공학회지*, 52(2), 179-188.
- Romana-Eguia, M. R. R., Eguia, R. V., & Pakingking Jr, R. V. (2020). *Tilapia culture: The basics*. Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Sharaff, F., & Freestone, P. (2011). Microbial Endocrinology. *Central European Journal of Biology*, 6(5), 685-694.
- 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.Q., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2014). Norepinephrine and dopamine increase motility, biofilm formation, and virulence of *Vibrio harveyi*. *Frontiers in microbiology*, 5, 584.
- Yang, Q., Zou, P., Cao, Z., Wang, Q., Fu, S., Xie, G., & Huang, J. (2021). QseC inhibition as a novel antivirulence strategy for the prevention of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 594652.