

DOI:10.22144/ctu.jsi.2020.018

ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT CHIẾT LỤU (*Punica granatum*) LÊN TĂNG TRƯỞNG VÀ ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH CỦA CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Bùi Thị Bích Hằng* và Trần Thị Tuyết Hoa

Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, ĐH Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm bài viết: Bùi Thị Bích Hằng (email: btbhang@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 21/10/2019

Ngày nhận bài sửa: 04/12/2019

Ngày duyệt đăng: 23/04/2020

Title:

Effects of Pomegranate (*Punica granatum*) extract on growth performance and immune responses of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Từ khóa:

Cá tra, đáp ứng miễn dịch, *Edwardsiella ictaluri*, *Punica granatum*

Keywords:

Edwardsiella ictaluri, immune response, *Punica granatum*, striped catfish

ABSTRACT

The study was conducted to evaluate the effects of *Punica granatum* extract on growth performance and immune response of catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). The experiment was in the completely randomized design with three treatments including 0% (control); 1.5% and 3% supplemented *P. granatum* extract for 4 weeks. After four weeks, fish were infected with *Edwardsiella ictaluri*. The parameters including the erythrocytes, leukocytes, lymphocytes, monocytes, neutrophils, thrombocytes and lysozyme activity were examined in the week 2nd, 4th of experiment and day 3rd post challenge test. Results showed that supplemented *P. granatum* extract enhanced the growth performance of striped catfish. In addition, total leukocytes, monocytes, lymphocytes and lysozyme activity significantly increased in treatment of supplemented *P. granatum* extracts compare to the control ($p < 0.05$). The accumulative mortality of fish in *P. granatum* treatments were lower than control treatment after challenge with *E. ictaluri*. The study indicated that supplemented of 1.5% *P. granatum* extract could improve the immune system of fish, thereby protecting the striped catfish against *E. ictaluri* bacteria.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng chất chiết lựu lên tăng trưởng và đáp ứng miễn dịch của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với ba nghiệm thức bao gồm 0% (đối chứng); 1,5% và 3% chất chiết lựu trong bốn tuần. Sau bốn tuần, cá được cảm nhiễm với *Edwardsiella ictaluri*. Các chỉ tiêu bao gồm mật độ hồng cầu, bạch cầu, lympho, bạch cầu đơn nhân, trung tính, tiểu cầu và hoạt tính lysozyme được theo dõi vào tuần thứ 2, 4 của thí nghiệm và ngày thứ 3 sau cảm nhiễm. Kết quả cho thấy bổ sung chất chiết lựu giúp cá tăng trưởng nhanh. Mật độ bạch cầu, tế bào đơn nhân, lympho và hoạt tính lysozyme gia tăng ở các nghiệm thức bổ sung lựu so với đối chứng ($p < 0,05$). Sau cảm nhiễm với *E. ictaluri*, cá được bổ sung chất chiết lựu đều có tỷ lệ chết thấp hơn đối chứng. Nghiên cứu cho thấy bổ sung 1,5% chất chiết lựu vào thức ăn giúp cải thiện hệ miễn dịch của cá và bảo vệ cá kháng lại vi khuẩn *E. ictaluri*.

Trích dẫn: Bùi Thị Bích Hằng và Trần Thị Tuyết Hoa, 2020. Ảnh hưởng của chất chiết lựu (*Punica granatum*) lên tăng trưởng và đáp ứng miễn dịch của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(Số chuyên đề: Thủy sản)(1): 161-169.

1 GIỚI THIỆU

Cá Tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) đã và đang là đối tượng nuôi hấp dẫn đối với người dân vùng đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Theo thống kê của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2018) diện tích nuôi cá tra của Việt Nam trong năm 2018 đạt 5.400 ha, tăng 3,3%, sản lượng đạt 1,42 triệu tấn, tăng 8,4% và kim ngạch xuất khẩu cá tra đạt 2,26 tỷ USD tăng 26,4% so với năm 2017. Bên cạnh thành công về sản lượng nuôi, người nuôi cá tra hiện đang đối mặt với nhiều thách thức, trong đó bệnh là một trong những trở ngại chính cho nghề nuôi cá. Để kiểm soát mầm bệnh trên cá nuôi, người dân đã sử dụng nhiều loại kháng sinh, việc sử dụng kháng sinh thường rất tốn kém nhưng chỉ có hiệu quả nhất thời. Hơn nữa, lượng kháng sinh tồn lưu không chỉ ảnh hưởng đến chất lượng của sản phẩm mà còn ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng, việc sử dụng kháng sinh làm tăng chi phí nuôi, giảm lợi nhuận và gặp nhiều bất lợi khi xuất khẩu sang các thị trường nước ngoài (Bùi Quang Tề, 2006).

Do vậy, thay đổi biện pháp quản lý dịch bệnh trên cá nuôi bằng sản phẩm có hoạt tính sinh học cao, có nguồn gốc tự nhiên, thân thiện môi trường là rất cần thiết và sử dụng sản phẩm thảo dược là một trong những giải pháp tiềm năng (Johnson and Banerji, 2007; Budzynska *et al.*, 2011). Một số nghiên cứu đã cho thấy nhiều loại thảo dược có khả năng kháng vi sinh vật tốt, là giải pháp sinh học thay thế thuốc và hóa chất trong nuôi thủy sản. Bỏ sung chất chiết từ ôi (*Psidium guajava*) vào thức ăn làm tăng hoạt động của hệ miễn dịch và hạn chế dịch bệnh do vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* (Rattanachaisophon and Phumkhaehorn, 2009); Chiết xuất từ ôi và hoa cúc cũng cho thấy khả năng kháng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* với MIC là 6,25 mg/mL (Abdelhadi and Soliman, 2012). Ngoài ra, nhiều loài thảo dược được ghi nhận có khả năng kích thích tăng trưởng và miễn dịch ở cá nuôi (Pavaraj *et al.*, 2011; Harikrishnan *et al.*, 2012).

Lựu (*Punica granatum*), loại cây ăn trái thuộc họ *Punicaceae*, được trồng phổ biến ở Việt Nam và nhiều nước khác. Tất cả các bộ phận của cây bao gồm hạt, hoa, trái, vỏ, lá, cành và rễ đều thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng viêm và kháng ung thư cao (Seeram *et al.*, 2006). Nhiều dược phẩm có nguồn gốc từ lựu được sử dụng để phòng trị nhiều bệnh trên người và động vật như nhiễm trùng vi khuẩn, tiêu chảy, kiết lỵ, xuất huyết và các bệnh hô hấp (Kim and Choi, 2009). Trong thủy sản, cá hồi sử dụng thức ăn có bổ sung dầu hạt lựu cho tăng trưởng nhanh, tăng hoạt tính miễn dịch

và hạn chế tỉ lệ chết của cá khi nhiễm khuẩn *Yersinia ruckeri* (Acar *et al.*, 2018). Tuy nhiên, các nghiên cứu ảnh hưởng của lựu lên các đối tượng nuôi thủy sản chưa nhiều. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá tác động của việc bổ sung chất chiết lựu vào thức ăn lên một số chỉ tiêu huyết học và miễn dịch của cá tra (*P. hypophthalmus*).

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguồn vật liệu

Cá tra (15-20 g) được thuần dưỡng trong trại thực nghiệm của Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ trong 2 tuần. Trước khi bố trí thí nghiệm, 5 cá được kiểm tra lâm sàng ngẫu nhiên về hình dạng, ký sinh trùng và vi khuẩn.

Nguyên liệu thảo dược: lá lựu được loại bỏ phần sâu bệnh, rửa sạch và sấy khô ở nhiệt độ từ 40-45°C. Mẫu sau khi khô được xay nhuyễn thành mẫu bột nguyên liệu. Bột nguyên liệu được cho vào trong túi vải và ngâm trong dung môi methanol (100%). Mẫu được ngâm 5 lần, mỗi lần ngâm khoảng 24 giờ, dịch chiết từ các lần ngâm được gom lại, cô quay loại bỏ dung môi, thu được cao tổng thực vật (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007).

Thức ăn thí nghiệm: thức ăn sử dụng trong quá trình thí nghiệm là thức ăn công nghiệp 32% đạm, kích cỡ 2 mm/viên (Grosbest). Chất chiết lựu theo tỉ lệ của mỗi nghiệm thức được bổ sung vào thức ăn bằng cách pha loãng với 10 mL DMSO và tiếp tục với 10 mL nước, phun và trộn đều cho chất chiết thấm vào thức ăn, để khô tự nhiên trong vòng 4 giờ. Sau đó áo ngoài viên thức ăn bằng dầu mực, tiếp tục để khô tự nhiên trong 8 giờ ở nhiệt độ phòng. Thức ăn đóng gói và trữ ở 4°C trong suốt thời gian thí nghiệm.

2.2 Thí nghiệm bổ sung chiết xuất lựu

Thí nghiệm bổ sung chiết xuất lựu được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 nghiệm thức 0% (đối chứng), 1,5% và 3% chất chiết lựu. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần với số lượng 40 cá/bể 250 mL. Cá được cho ăn với khẩu phần 3% khối lượng thân, chia thành 3 lần/ngày trong thời gian 4 tuần. Bê được sục khí liên tục, theo dõi và siphon đáy bể 2 ngày/lần, mỗi lần thay 20-30% thể tích nước. Định kỳ thu mẫu máu vào tuần thứ 2 và tuần 4, thu 3 cá/bể để xác định các chỉ tiêu huyết học và hoạt tính lysozyme. Cá được cân trọng lượng ở thời gian bắt đầu và kết thúc thí nghiệm để tính tăng trưởng.

2.3 Thí nghiệm cảm nhiễm

Sau 4 tuần cho ăn thức ăn có bổ sung chất chiết lựu, cá được cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*. Thí

thực nghiệm được thực hiện với 4 nghiệm thức gồm NT1: cá được bổ sung 1,5% chất chiết lựu và tiêm vi khuẩn; NT2: cá được bổ sung 3% chất chiết lựu và tiêm vi khuẩn; NT3: cá đối chứng và tiêm vi khuẩn; NT4: cá đối chứng và tiêm NaCl (0,85%). Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần với số lượng 10 cá/bể, sục khí liên tục và không thay nước cá, cá được cho ăn thức ăn đối chứng theo nhu cầu. Mỗi cá được tiêm 0,1 mL vi khuẩn *E. ictaluri* (10^5 CFU/ml). Cá cảm nhiễm được theo dõi trong 14 ngày. Hằng ngày quan sát dấu hiệu bệnh lý, ghi nhận số cá chết, phân lập vi khuẩn *E. ictaluri* từ thận cá lờ đờ và tiến hành tái định danh vi khuẩn bằng phương pháp PCR.

Tỉ lệ sống của cá (%) = (Tổng số cá thí nghiệm – tổng số cá chết) / (Tổng số cá thí nghiệm) x 100

2.4 Phương pháp phân tích

Tăng trưởng

Khối lượng gia tăng: $WG (g) = (Wt - Wo)$

Tốc độ tăng trưởng tuyệt đối: $DWG (g/ngày) = (Wt - Wo) / t$

Trong đó:

Wo: Khối lượng cá ở thời điểm ban đầu (g); Wt: Khối lượng cá ở thời điểm kết thúc thí nghiệm (g); t: Thời gian nuôi (ngày).

Định lượng hồng cầu được thực hiện theo phương pháp của Natt and Herick (1952). Mật độ hồng cầu được xác định bằng buồng đếm Neubauer và tính theo công thức: $HC = C \times 10 \times 5 \times 200$ (tế bào/mm³) (C: Tổng số hồng cầu của 5 vùng đếm).

Định lượng bạch cầu được phân tích theo phương pháp của Hrubec *et al.*, (2000). Trải mẫu máu bằng cách nhỏ một giọt máu lên lame, dùng một lame khác chạm vào giọt máu, sau đó đẩy về phía trước, để khô tự nhiên. Mẫu máu sau khi khô cố định bằng methanol trong 1 phút, tiếp tục để khô tự nhiên và nhuộm Wright & Giemsa. Tổng số lượng bạch cầu được tính theo công thức: $TBC (tb/mm^3) = (Số BC trong 1.500 \text{ tế bào} \times R) / Số HC trong 1.500 \text{ tế bào}$ (TBC: mật độ tổng bạch cầu, BC: bạch cầu, R: mật độ hồng cầu, HC: hồng cầu).

Định lượng từng loại bạch cầu trong tổng số 200 tế bào bạch cầu (Hrubec *et al.*, 2000). Tính mật độ từng loại bạch cầu theo công thức: $Mật độ loại bạch cầu (tb/mm^3) = (Số lượng mỗi loại bạch cầu \times TBC) / 200$.

Hoạt tính lysozyme được phân tích theo phương pháp Ellis *et al.* (1990). Xây dựng đường chuẩn lysozyme với các nồng độ 0, 2, 4, 8 và

16µg/mL. Cho 10 µL dung dịch từ các nồng độ pha loãng và huyết thanh vào đĩa 96 giếng, tiếp theo cho 130 µL dịch huyền phù *Micrococcus luteus* (Sigma) vào mỗi giếng. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ 27°C và đo ở bước sóng 495 nm. Hoạt tính lysozyme được tính dựa vào đường chuẩn lysozyme.

Qui trình PCR phát hiện vi khuẩn *E. ictaluri*:

Vi khuẩn *E. ictaluri* được phát hiện dựa theo qui trình PCR được mô tả bởi Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương (2009). Mẫu hiện vạch 407 bp là mẫu dương tính với *E. ictaluri*.

2.5 Phương pháp phân tích số liệu

Số liệu được tính toán và xử lý bằng phần mềm Excel. Xử lý thống kê bằng phương sai 1 nhân tố ANOVA và so sánh sự khác biệt có ý nghĩa bằng phép thử Duncan ở mức ý nghĩa $p=0,05$ với phần mềm SPSS 16.0.

3 KẾT QUẢ

3.1 Tăng trưởng

Sau 4 tuần thí nghiệm, kết quả cho thấy tăng trọng của cá dao động trong khoảng 7,92–15,53 g (Bảng 1). Nghiệm thức bổ sung 1,5% và 3% lựu tăng lần lượt 15,53 g và 11,28 g, trong khi nghiệm thức đối chứng chỉ tăng 7,92 g. Khối lượng trung bình của các nghiệm thức có bổ sung chiết xuất lựu đều tăng cao hơn so với nghiệm thức đối chứng lần lượt là 1,9 và 1,4 lần. Tuy nhiên, nghiệm thức bổ sung 1,5% lựu thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) so với đối chứng. Tương tự, tốc độ tăng trưởng tương đối của cá ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết lựu cũng cao hơn so với cá đối chứng. Cá ở nghiệm thức bổ sung 1,5% cho kết quả tốc độ tăng trưởng tương đối cao nhất (0,55 g/ngày) và cao hơn có ý nghĩa ($p<0,05$) so với nghiệm thức đối chứng.

Bảng 1: Ảnh hưởng của thảo dược lên tăng trưởng của cá tra.

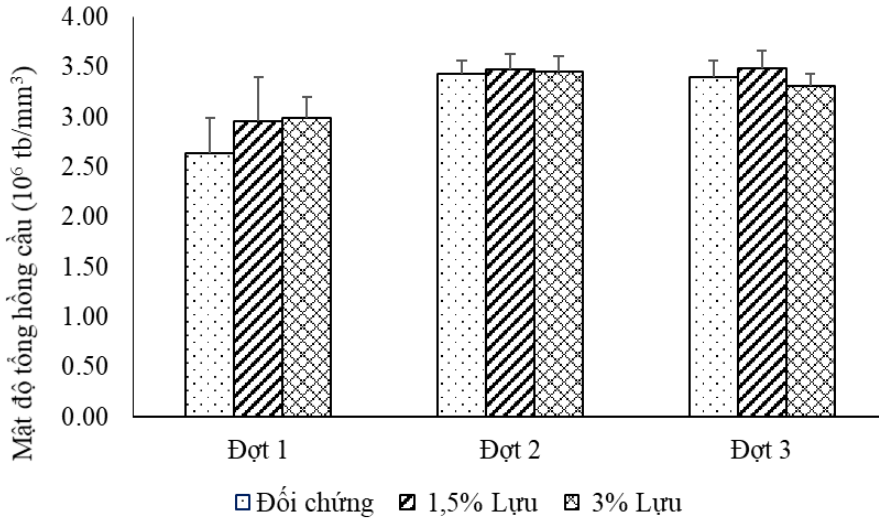
Nghiệm thức	Tăng trưởng	
	WG(g)	DWG (g/ngày)
Đối chứng (0% lựu)	7,92 ± 1,11 ^a	0,29 ± 0,04 ^a
1,5% lựu	15,53 ± 2,75 ^b	0,55 ± 0,10 ^b
3% lựu	11,28 ± 4,55 ^{ab}	0,40 ± 0,16 ^{ab}

Ghi chú: Các giá trị thể hiện trên bảng là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. WG: Tăng trọng (g). DWG: Tốc độ tăng trưởng theo ngày (g/ngày). Các giá trị có ký tự giống nhau trong cùng một cột (a,b) thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

3.2 Chỉ tiêu huyết học

Hồng cầu: kết quả định lượng hồng cầu cho thấy mật độ tổng hồng cầu gia tăng sau 2 tuần cho ăn chiết xuất lựu (Hình 1). Mật độ hồng cầu ở nghiệm thức 1,5% lựu là $2,96 \times 10^6$ tb/mm³ và nghiệm thức 3% lựu là $2,99 \times 10^6$ tb/mm³ cao hơn so với nhóm đối chứng ($2,64 \times 10^6$ tb/mm³). Tuy nhiên, sự khác biệt

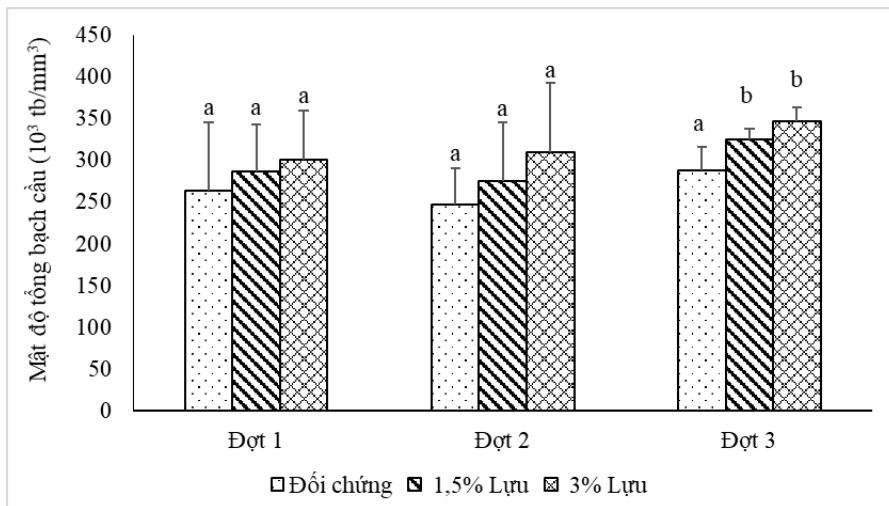
giữa các nghiệm thức không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Sau 4 tuần bổ sung chất chiết lựu, mật độ hồng cầu của cá ở các nghiệm thức đều tăng cao hơn so với ở thời điểm thu mẫu tuần thứ 2 nhưng không có sự khác biệt thống kê ở các nghiệm thức thí nghiệm. Tương tự, sau cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*, mật độ hồng cầu ở các nghiệm thức không có sự khác biệt thống kê ($p > 0,05$)



Hình 1: Ảnh hưởng của chất chiết lựu lên mật độ hồng cầu cá tra

Tổng bạch cầu: kết quả định lượng tổng bạch cầu cho thấy sau 2 tuần bổ sung chiết xuất lựu, tổng bạch cầu của cá ở 2 nghiệm thức 1,5% và 3% tăng cao so với nghiệm thức 0%, nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Tương tự, sau

4 tuần cho ăn chiết xuất tổng bạch cầu của nghiệm thức 3% tăng cao hơn so với nghiệm thức 0% và 1,5% nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Sau 3 ngày cảm nhiễm tổng bạch cầu của cá ở nghiệm thức 1,5% và 3% tăng cao có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức 0% (Hình 2).



Hình 2: Số lượng tổng bạch cầu sau 3 đợt thu mẫu

Ghi chú: các giá trị có ký tự giống nhau trong cùng một đợt thu mẫu (a,b,c) thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)

Bạch cầu đơn nhân: sau 2 tuần bổ sung chiết xuất lựu vào thức ăn cá tra, mật độ bạch cầu đơn nhân của cá dao động từ $21,24 \times 10^3$ - $32,94 \times 10^3$ tb/mm³ (Bảng 2). Nghiệm thức bổ sung 3% chất chiết lựu có mật độ bạch cầu đơn nhân ($32,94 \times 10^3$ tb/mm³) tăng cao nhất, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$). Sau 4 tuần thí nghiệm, nghiệm thức bổ sung 1,5% và 3% chất chiết lựu tiếp tục tăng cao, lần lượt đạt giá trị $37,96 \times 10^3$ và $38,41 \times 10^3$ tb/mm³, cao hơn có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng ($28,06 \times 10^3$ tb/mm³) ($p < 0,05$). Sau 3 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn, số lượng bạch cầu đơn nhân ở nghiệm thức 1,5% và 3% lựu cũng cao hơn có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng.

Tế bào trung tính: Bảng 2 cho thấy sau 2 tuần bổ sung chất chiết lựu thì mật độ tế bào trung tính của cá nằm trong khoảng $22,29 \times 10^3$ – $25,05 \times 10^3$ tb/mm³. Cá ở nghiệm thức 1,5% chất chiết lựu có mật độ tế bào trung tính tăng cao nhất ($25,05 \times 10^3$ tb/mm³) nhưng khác biệt không có ý nghĩa so với các nghiệm thức khác. Sau 4 tuần thí nghiệm thì cá ở các nghiệm thức bổ sung lựu vẫn có mật độ bạch cầu trung tính cao hơn nghiệm thức đối chứng. Khi cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* thì mật độ tế bào trung tính của nghiệm thức bổ sung 1,5 và 3% chất chiết lựu tăng cao, lần lượt đạt giá trị $28,59 \times 10^3$ và $28,84 \times 10^3$ tb/mm³, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($20,62 \times 10^3$ tb/mm³) ($p > 0,05$).

Tế bào lympho: sau 2 tuần sử dụng thức ăn có bổ sung chất chiết lựu, số lượng tế bào lympho ở các nghiệm thức bổ sung lựu tăng cao có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng. Trong đó, nghiệm thức 3% lựu có mật độ lympho cao nhất ($231,52 \times 10^3$ tb/mm³). Tương tự, các nghiệm thức bổ sung chất chiết lựu có mật độ lympho cao hơn nghiệm thức đối chứng sau 4 tuần thí nghiệm. Sau 3 ngày cảm nhiễm với *E. ictaluri*, số lượng tế bào lympho ở các nghiệm thức đều tăng cao ($179,17 \times 10^3$ - $237,37 \times 10^3$ tb/mm³). Trong đó, nghiệm thức bổ sung 1,5% và 3% chất chiết lựu lần lượt đạt giá trị $237,37 \times 10^3$ và $209,83 \times 10^3$ tb/mm³ cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($179,17 \times 10^3$ tb/mm³) (Bảng 2).

Tế bào tiểu cầu: sau 2 tuần thí nghiệm, mật độ tế bào tiểu cầu của các nghiệm thức dao động từ $19,23 \times 10^3$ - $22,06 \times 10^3$ tb/mm³, chưa có sự khác biệt giữa nghiệm thức bổ sung và không bổ sung chất chiết lựu. Sau 4 tuần, mật độ tiểu cầu tiếp tục gia tăng ở các nghiệm thức. Nghiệm thức bổ sung chất chiết lựu có mật độ tiểu cầu tăng cao hơn nghiệm thức đối chứng nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Sau 3 ngày cảm nhiễm, nghiệm thức bổ sung 1,5% và 3% chất chiết lựu có mật độ tiểu cầu lần lượt là $31,99 \times 10^3$ và $30,49 \times 10^3$ tb/mm³, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($23,55 \times 10^3$ tb/mm³) ($p < 0,05$).

Bảng 2: Ảnh hưởng của chất chiết lựu lên mật độ các loại bạch cầu của cá

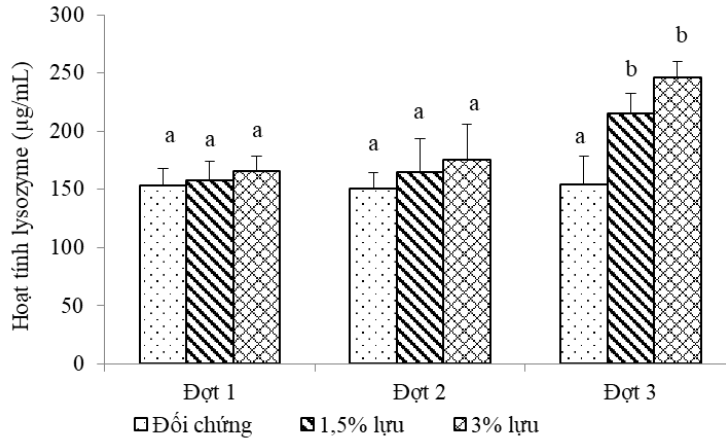
Nghiệm thức	2 tuần (Đợt 1)	4 tuần (Đợt 2)	Sau cảm nhiễm (Đợt 3)
Bạch cầu đơn nhân (x 10³ tb/mm³)			
Đối chứng	21,24±8,34 ^a	28,06±4,53 ^a	29,93±4,60 ^a
1,5% Lựu	22,22±9,96 ^a	37,96±6,33 ^b	39,20±4,37 ^b
3% Lựu	32,94±7,69 ^b	38,08±7,69 ^b	38,41±7,55 ^b
Bạch cầu trung tính (x 10³ tb/mm³)			
Đối chứng	22,29±3,96 ^a	18,07±5,21 ^a	20,62±6,89 ^a
1,5% Lựu	25,05±7,21 ^a	24,45±11,50 ^a	28,59±4,51 ^b
3% Lựu	22,18±8,13 ^a	23,46±10,49 ^a	28,84±4,97 ^b
Tế bào lympho (x 10³ tb/mm³)			
Đối chứng	171,34±32,97 ^a	143,56±25,29 ^a	179,17±30,26 ^a
1,5% Lựu	216,54±24,14 ^b	191,12±40,71 ^b	237,37±13,96 ^b
3% Lựu	231,52±31,77 ^b	175,50±82,44 ^{ab}	209,83±15,27 ^{ab}
Tiểu cầu (x 10³ tb/mm³)			
Đối chứng	20,17±8,32 ^a	22,39±7,69 ^a	23,55±2,58 ^a
1,5% Lựu	22,06±6,92 ^a	27,53±8,48 ^a	31,99±7,56 ^b
3% Lựu	19,23±4,33 ^a	26,25±8,43 ^a	30,49±4,68 ^b

Ghi chú: Các giá trị trong cùng 1 chỉ tiêu, cùng một cột mang cùng chữ cái (a, b, c) thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Giá trị thể hiện là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn.

3.3 Hoạt tính lysozyme

Sau 2 tuần bổ sung chất chiết lựu, hoạt tính lysozyme của các nghiệm thức dao động trong khoảng 153,67-165,38 $\mu\text{g/mL}$ và khác biệt không có ý nghĩa giữa các nghiệm thức. Sau 4 tuần thí nghiệm, hoạt tính lysozyme của nghiệm thức bổ sung chất chiết lựu tăng cao hơn nghiệm thức đối

chứng. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*, hoạt tính lysozyme của các nghiệm thức bổ sung chất chiết lựu tăng cao, lần lượt là 215,33 và 246,42 $\mu\text{g/mL}$, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng (154,33 $\mu\text{g/mL}$) ($p < 0,05$) (Hình 3).



Hình 3: Ảnh hưởng của chất chiết lựu lên hoạt tính lysozyme

Ghi chú: các giá trị có ký tự giống nhau trong cùng một đợt thu mẫu (a,b) thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)

3.4 Ảnh hưởng của chất chiết lựu lên khả năng kháng vi khuẩn *E. ictaluri*

Dấu hiệu bệnh lý: sau 2 tuần theo dõi thí nghiệm cá cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*, cá ở nghiệm thức đối chứng âm (tiêm nước muối sinh lí 0,85% NaCl) khỏe mạnh và không có bất cứ dấu hiệu bệnh lí, tỉ lệ sống đạt 100%. Cá ở các nghiệm thức được tiêm vi khuẩn xuất hiện các dấu hiệu bệnh lí bên

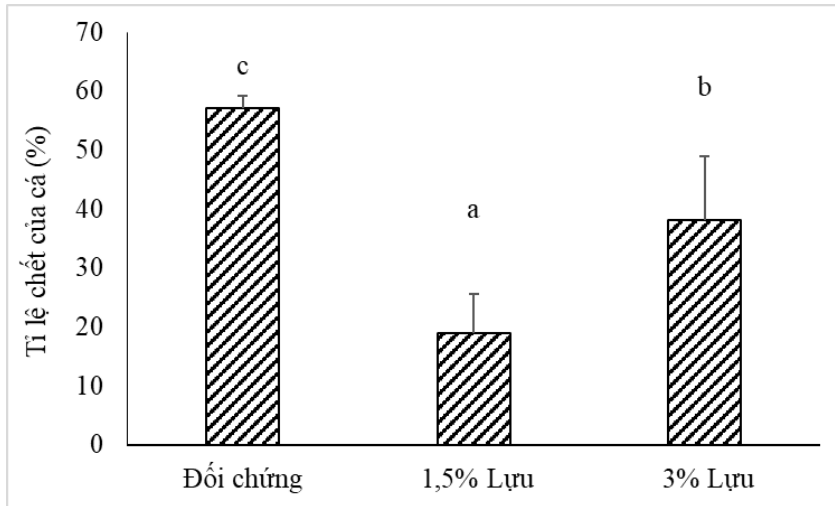
ngoài như bơi lờ đờ, màu sắc nhợt nhạt, không phản ứng với tiếng động, một số vây có dấu hiệu tưa rách, xuất huyết nhẹ, bụng trương nhẹ. Giải phẫu trong xoang bụng thường có dịch, gan, thận và tỳ tạng xuất hiện nhiều đốm trắng nhỏ li ti (Hình 4). Các đặc điểm trên đều tương đồng với dấu hiệu bệnh lí của cá tra bị nhiễm *E. ictaluri* theo mô tả của Đặng Thụy Mai Thy (2010).



Hình 4: Cá tra nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* (mũi tên trắng: đốm trắng li ti xuất hiện trên gan thận, mũi tên đen: xuất huyết nhẹ ở gốc vây)

Tỷ lệ chết của cá cảm nhiễm: hai ngày đầu sau khi tiêm vi khuẩn *E. ictaluri*, chưa xuất hiện cá chết ở tất cả các nghiệm thức, đến ngày thứ 3 cá bắt đầu chết và tiếp tục chết ở các ngày 4 và 5. Cá giảm chết từ ngày thứ 6 và ngừng chết vào ngày thứ 7. Cá đối chứng ở nghiệm thức tiêm nước muối sinh lí vẫn bình thường, không có biểu hiện bệnh và không có

cá chết. Sau 14 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn, kết quả cho thấy tỷ lệ chết ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết lựu thấp hơn tỷ lệ cá chết ở nghiệm thức đối chứng (Hình 5). Cụ thể nghiệm thức bổ sung 1,5% chất chiết lựu có tỷ lệ cá chết là 19,05%, nghiệm thức bổ sung 3% lựu có tỷ lệ chết 38,1%, thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với cá đối chứng (57,14%).



Hình 5: Tỷ lệ chết của cá cảm nhiễm với *E. ictaluri*

Ghi chú: các giá trị có ký tự giống nhau (a,b,c) thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)

4 THẢO LUẬN

Kết quả thí nghiệm cho thấy bổ sung chất chiết lựu làm cá tăng trưởng tốt hơn, điều này hoàn toàn tương đồng với kết quả của một số nghiên cứu trước đây. Qi *et al.* (2010) bổ sung rong nâu *Laminari japonica* vào khẩu phần ăn của bào ngư giúp bào ngư tăng trưởng nhanh. Theo Huỳnh Kim Diệu (2011) sử dụng bột lá xuân hoa (*Pseuderanthemum palatiferum*) bổ sung vào thức ăn của cá tra với liều 15 g/kg thức ăn trong 1 tháng thì cá có tăng trọng cao hơn nghiệm thức đối chứng 27%. Nghiên cứu của Trần Trung Giang và *ctv* (2016) bổ sung hỗn hợp polysaccharide chiết xuất từ rong mơ *S. microcystum* vào thức ăn cá tra trong 60 ngày cũng giúp cá tăng trưởng nhanh. Nghiên cứu của Ferdous *et al.* (2017) bổ sung cao chiết từ lá ôi với nhiều nồng độ 0%, 2, 4, và 6 và 8% vào thức ăn cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) thì tốc độ tăng trưởng của cá được bổ sung cao chiết ôi cao hơn cá đối chứng; nhóm cá sử dụng 8% cao chiết ôi có tăng trọng cao nhất. Bổ sung 0,5% cao chiết ôi vào khẩu phần ăn của cá trôi giúp cá tăng trưởng cao hơn so với nhóm cá đối chứng (Giri *et al.*, 2015).

Bên cạnh tác động tích cực lên tăng trưởng của cá, kết quả nghiên cứu này còn chỉ ra chất chiết lựu

có khả năng điều biến miễn dịch của cá tra thông qua việc gia tăng một số chỉ tiêu miễn dịch không đặc hiệu như tế bào bạch cầu và hoạt tính lysozyme. Tương tự, thí nghiệm bổ sung chất chiết cỏ xạ hương, hương thảo và hồ đào vào thức ăn cá rô phi cũng ghi nhận có sự gia tăng mật độ tế bào bạch cầu trong máu cá so với nhóm cá đối chứng (Gultepe *et al.*, 2014). Bên cạnh, Kumar *et al.* (2014) cũng cho biết mật độ bạch cầu của cá da trơn *Mystus montanus* sử dụng thức ăn có chứa thảo dược tăng cao hơn cá ăn chế độ không có thảo dược. Nghiên cứu việc bổ sung tỏi với nhiều nồng độ 0; 0,5 và 1 g/kg thức ăn cho cá rô phi lai thì mật độ bạch cầu tăng cao có ý nghĩa thống kê của cá ở nghiệm thức bổ sung 0,5 g tỏi/kg thức ăn (Ndong and Fall, 2011). Dadvaran *et al.* (2014) bổ sung chất chiết xuất của tỏi vào thức ăn với liều 0,15 g/kg thức ăn cho cá hồi vân làm tăng mật độ bạch cầu của cá. Thí nghiệm sử dụng chiết xuất cỏ mực ngâm cho cá trê trong 28 ngày cho kết quả tăng số lượng bạch cầu ở 2 nồng độ 100 và 200 ppm (Misha and Gupta, 2014). Tế bào bạch cầu là một trong những tế bào quan trọng tham gia vào quá trình đáp ứng miễn dịch của động vật, chúng giữ chức năng quan trọng trong việc nhận diện, thực bào các kháng nguyên bảo vệ cơ thể tránh sự xâm nhập của các vật lạ (Đỗ Ngọc Liên, 2004).

Sự thay đổi mật độ tế bào máu bao gồm hồng cầu, bạch cầu của cá cũng là một chỉ tiêu quan trọng để đánh giá tình trạng sức khỏe của cá (Basusta, 2005). Ngoài ra, hoạt tính lysozyme cũng là một trong những chỉ tiêu miễn dịch quan trọng để đánh giá sức khỏe của cá. Badawi and Gomaa (2006) đã ghi nhận chất chiết xuất có khả năng cải thiện tình trạng miễn dịch của cá thông qua việc gia tăng 2 yếu tố miễn dịch quan trọng là lysozyme và IgM trong huyết thanh cá. Trong nghiên cứu này thì hoạt tính lysozyme cũng được kích hoạt tăng cao ở nhóm cá bổ sung chất chiết xuất so với nhóm đối chứng. Đặc biệt, khi cá nhiễm khuẩn, hoạt tính lysozyme càng được kích hoạt tăng cao hơn có ý nghĩa thống kê ở nhóm cá sử dụng thức ăn có chất chiết xuất và kết quả này cũng tương đồng với thí nghiệm của Zheng *et al.* (2009) khi bổ sung dầu hương thảo vào thức ăn cá Nheo Mỹ (*Ictalurus punctatus*) hay Mai Thanh Thanh và Bùi Thị Bích Hằng (2018) bổ sung tỏi vào thức ăn cá điêu hồng cũng ghi nhận sự gia tăng hoạt tính lysozyme trong huyết thanh của cá.

Sau 4 tuần bổ sung chất chiết xuất, cá thí nghiệm đã được cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*, gây bệnh gan thận mù trên cá tra. Tỷ lệ chết tích lũy của cá sử dụng thức ăn có chất chiết xuất thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm cá đối chứng và điều này hoàn toàn hợp lý và có thể lý giải dựa trên các chỉ tiêu miễn dịch được đánh giá ở trên. Kết quả đã cho thấy bổ sung chất chiết xuất làm cải thiện tình trạng miễn dịch của cá thông qua sự gia tăng mật số tế bào bạch cầu, tế bào đơn nhân, lympho và hoạt tính lysozyme, từ đó giúp cá tăng sức đề kháng chống lại sự tấn công của một số tác nhân gây bệnh, tiêu biểu như vi khuẩn *E. ictaluri*. Bổ sung chất chiết quế và đinh hương cũng làm giảm tỷ lệ chết của cá rô phi khi cảm nhiễm với vi khuẩn *Streptococcus iniae* và *Lactococcus garvieae* (Rattanachaiakunsoopon and Phumkhachorn, 2009; 2010). Cá rô phi được cho ăn thức ăn bổ sung tỏi (*Allium sativum*) và *Echinacea purpurea* có tỷ lệ sống và sức đề kháng cao với mầm bệnh *A. hydrophila* (Aly *et al.*, 2010). Ngoài ra, đa số các loài thảo dược đều có hoạt tính kháng khuẩn cao. Nghiên cứu của Huỳnh Kim Diệu (2010) sử dụng 30 loại thảo dược thường dùng trong dân gian, trong đó có bán tự mọc (*Hemigraphis glaucescens*), bàng (*Terminalia catappa*), ôi (*Psidium guajava*), từ bi (*Pluchea indica*) để thử hoạt tính kháng khuẩn trên 3 loại vi khuẩn *E. ictaluri*, *E. tarda* và *Aeromonas hydrophila* cho thấy các cây thuốc này đều có khả năng kháng khuẩn (MIC=162048 µg/ml). Hoạt phổ mạnh trên cả 3 loại vi khuẩn là bàng, ôi, tràu không, trầm (MIC=64-512 µg/ml). Nhìn chung, kết quả nghiên cứu này và các nghiên

cứ trước đây (Harikrishnan *et al.* 2012; Badawi and Gomaa, 2016) cho thấy bổ sung chất chiết xuất vào thức ăn cho cá là giải pháp hiệu quả trong việc giảm thấp tỷ lệ chết và phòng bệnh cho cá nuôi.

5 KẾT LUẬN

Cá tra (10-12 g) ăn thức ăn có bổ sung chiết xuất lựu trong 4 tuần gia tăng một số chỉ tiêu huyết học bao gồm tổng bạch cầu, các loại bạch cầu và hoạt tính lysozyme. Sau cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh gan thận mù, tỷ lệ chết của cá ở các nghiệm thức bổ sung chiết xuất lựu đều giảm so với đối chứng. Trong đó, bổ sung 1,5% chất chiết xuất vào thức ăn cá tra cho kết quả đáp ứng miễn dịch và khả năng kháng vi khuẩn *E. ictaluri* tốt nhất.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài này được tài trợ bởi Dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 bằng nguồn vốn vay ODA từ Chính phủ Nhật Bản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdelhamid A.M., and Soliman, A.A.A., 2012. Possibility of using dried leaves of guava and camphor trees in tilapia diets. *J. Arab Aquac. Soc.* 7: 91–108.
- Acar, Ü., Parrino, V., Kesbiç, O.S., Lo Paro, G., Saoca, C., Abbate, F., Yılmaz, S., and Fazio, F., 2018. Effects of different levels of pomegranate seed oil on some blood parameters and disease resistance against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout. *Front Physiol.*, 9: 596-613.
- Aly, S.M., and Mohamed, M.F., 2010. *Echinacea purpurea* and *Allium sativum* as immunostimulants in fish culture using Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Anim Physiol Anim Nutr (Berl.)*, 94(5): 31-39.
- Badawi, M.E., and Gomaa, A.M., 2016. Influence of diets supplemented with pomegranate peel extract on performance in *Oreochromis niloticus*. *JPN. J. VET. RES.*, 64 (2): 87-94.
- Basusta, G.A., 2005. Fish hematology and hematological techniques, in *Research Techniques in Fish Biology*, ed. M. Karatas (Ankara: Nobel Publications), 275–300.
- Budzynska, A., Wieckowska-Szakiel, M., and Sadowska, B., 2011. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. *Pol. J. Microbiol.*, 60: 35-41.
- Bùi Quang Tề, Lê Xuân Thành, Ngô Đại Quang và Lư Hoàng Ngọc, 2006. Báo cáo kết quả nghiên cứu chế phẩm (VTS1-C và VTS1-T) tách chiết từ thảo dược phòng trị bệnh cho tôm sú và cá tra. Viện NTTS 1.

- Dadvaran, S.P., Mansureh, G., and Abolfazl, A.S., 2014. Effect of garlic (*Allium sativum* L.) extract on some hematological parameters and immune response of rainbow trout fingerlings. *J. Herbal Drugs* 4(4): 162-169.
- Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương, 2010. Phát hiện vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh mù gan trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bằng phương pháp PCR. *Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ* 13: 151-159.
- Đặng Thụy Mai Thy, 2010. Nghiên cứu đặc tính gây bệnh của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* ở cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Luận văn cao học, Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ*. 83 trang.
- Đỗ Ngọc Liên, 2004. Miễn dịch học cơ sở. NXB Đại học Quốc gia Hà Nội. 340tr.
- Ellis, A.E., 1990. Lysozyme activity. *In: T.C. Stolen, P.D. Fletcher, B.S. Anderson, B.S. Roberson, W.B. Muiswinkel (editors). Technique in Fish Immunology*. New York: SOS Publications; p 101-103.
- Gültepe, N., Bilen, S., Yılmaz, S., Güroy, D. and Aydın, S., 2014. Effects of herbs and spice on health status of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) challenged with *Streptococcus iniae*. *Acta Vet. Brno.*, 83(2): 125-131.
- Harikrishnan, R.; Kim, J., Kim, M., Balasundaram, C., and Heo, M., 2012. Pomegranate enriched diet enhances the hematology, innate immune response and disease resistance in olive flounder against *Philasterides dicentrarchi*. *Vet. Parasitol.*, 187(1-2): 147-156.
- Hrubec, T.C., J. L. Cardinale, S., and Smith, A., 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Vet. Clin. Path.* 29: 7-12.
- Huỳnh Kim Diệu, 2010. Hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh trên cá của một số cây thuốc nam ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ* 15b: 222-229.
- Johnson, C., and Banerji, A., 2007. Influence of extract isolated from the plant *Sesuvium portulacastrum* growth and metabolism in freshwater teleost, *Labeo rohita* (Rohu), *Fish Technol.*, 44: 229-234.
- Kim, Y.H., and Choi, E.M., 2009. Stimulation of osteoblastic differentiation and inhibition of interleukin-6 and nitric oxide in MC3T3-E1 cells by pomegranate ethanol extract. *Phytother. Res.*, 23: 737-739.
- Kumar, I.V., Chettadurai, G., Veri, T., Peeran, S.H., and Mohanraj, J., 2014. Medicinal plants as immunostimulants for health management in Indian catfish. *J. Coast. Life Med.*, 2(6): 426-430.
- Mai Thanh Thanh và Bùi Thị Bích Hằng, 2018. Ảnh hưởng của việc bổ sung tỏi (*Allium sativum*) vào thức ăn lên một số chỉ tiêu miễn dịch và khả năng kháng khuẩn của cá điêu hồng (*Oreochromis sp.*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 54(2): 168-176.
- Mishra, P., and Gupta, S., 2014. Hematological evaluation of *Eclipta alba* root extract in catfish *Clarias batrachus* (Linnaeus, 1758). *J. Phar. Sci. Inno.*, 3 (3): 240-244.
- Natt, M. P., and C.A. Herrick, 1952. A new blood diluent for counting erythrocytes and leukocytes of the chicken. *Poultry Science* 31: 735-738.
- Ndong, D., and Fall, J., 2011. The effect of garlic (*Allium sativum*) on growth and immune responses of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*). *J. Clin. Immunol. Immunopathol. Res.*, 3:1-9
- Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007. Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh.
- Pavaraj, M., Balasubram, V., Baskaran, S., and Ramasamy, P., 2011. Development of immunity by extract of medicinal plant *Ocimum sanctum* on common carp *Cyprinus carpio* (L.). *J. Immuno. Res.* 4: 12-18.
- Rattanachaikunsopon, P., and Phumkhachorn, P., 2009. Protective effect of clove oil-supplemented fish diets on experimental *Lactococcus graviae* infection in tilapia. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 2085-2089.
- Rattanachaikunsopon, P., and Phumkhachorn, P., 2010. Potential of cinnamon (*Cinnamomum verum*) oil to control *Streptococcus iniae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish. Sci.* 76: 287-293.
- Qi, Z., Liu, H., Li, B., Mao, Y., Jiang, Z., Zhang, J., and Fang J., 2010. Suitability of two seaweeds, *Gracilaria lemaneiformis* and *Sargassum pallidum*, as feed for the abalone *Haliotis discus hannai* Ino. *Aquaculture* 300(1-4): 189-193.
- Seeram, N. P., Schulman, R. N., and Heber, D., 2006. *Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine*, Boca Raton, FL: Taylor and Francis Group.
- Trần Trung Giang, Dương Thị Hoàng Oanh, Trương Quốc Phú và Huỳnh Trường Giang, 2016. Nghiên cứu ảnh hưởng của hỗn hợp polysaccharide chiết xuất từ rong mơ *Sargassum microcystum* lên tăng trưởng và tỉ lệ sống của cá tra *Pangasianodon hypophthalmus*. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 47b: 102-109.
- Zheng, Z.L., Tan, J.Y.W., Liu, H.Y., Zhou, X.H., Xiang, X., and Wang, K.Y., 2009. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 292: 214-218.