

DOI:10.22144/ctu.jvn.2020.059

ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT CHIẾT TỪ LÁ CÂY HOÀN NGỌC (*Pseuderanthemum palatiferum* (Wall.) Radlk) LÊN TĂNG TRƯỞNG VÀ ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Bùi Thị Bích Hằng* và Nguyễn Thanh Phương

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

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

ABSTRACT

This study was conducted to observe the impact of dietary supplementation of *Pseuderanthemum palatiferum* (Wall.) Radlk leaf extract on growth and non-specific immune response of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). The experiment was randomly designed with 4 triplicated treatments including 0%, 0.02%, 0.1%, and 0.5% *Pseuderanthemum palatiferum* (Wall.) Radlk leaf extract. Total red blood cells, total white blood cells, lymphocytes, monocytes, neutrophils, thrombocytes and lysozyme activities were observed for immune responses at the 3rd and the 6th week post-feeding and the 3rd day post challenge with pathogenic bacteria. The results showed that the treatments of supplemented 0.02%, 0.1%, and 0.5% extract did not significantly affect the growth of striped catfish. The total red blood cell and total white blood cell counts significantly increased in supplemented extract treatments if compared to the control. After 6-week feeding, lysozyme activity was highest (90,7 mg/mL) in treatment of 0.5%. After challenge with *Edwardsiella ictaluri*, the results indicated that mortality rates in 0.1% and 0.5% treatments were lower than those of the control treatment. These results suggested that the supplementation of *Pseuderanthemum palatiferum* (Wall.) Radlk leaf extract in diets could improve the immune responses and reduce the mortality of striped catfish after being challenged with *E. ictaluri*.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tìm hiểu ảnh hưởng của bổ sung chất chiết lá hoàn ngọc (*Pseuderanthemum palatiferum* (Wall.) Radlk) vào thức ăn lên tăng trưởng và đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 nghiệm thức gồm 0%; 0,02%; 0,1% và 0,5% chất chiết lá hoàn ngọc và được lặp lại 3 lần. Các chỉ tiêu miễn dịch bao gồm tổng hồng cầu, tổng bạch cầu, tế bào lympho, bạch cầu đơn nhân, trung tính, tiểu cầu và hoạt tính lysozyme được theo dõi vào tuần thứ 3 và 6 của thí nghiệm và 3 ngày sau cảm nhiễm với vi khuẩn. Kết quả cho thấy bổ sung chất chiết lá cây hoàn ngọc không ảnh hưởng đến tăng trưởng cá tra. Mật độ tổng hồng cầu và tổng bạch cầu tăng cao có ý nghĩa ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết lá cây hoàn ngọc. Sau 6 tuần thì hoạt tính lysozyme đạt giá trị cao nhất (90, 7 mg/mL) ở nghiệm thức 0,5%, khác biệt có ý nghĩa thống kê với nghiệm thức đối chứng (57,8 U/mL) ($p < 0,05$). Sau khi gây cảm nhiễm với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* thì các nghiệm thức có bổ sung 0,1% và 0,5% chất chiết lá cây hoàn ngọc có tỉ lệ chết thấp hơn đối chứng. Kết quả chỉ ra rằng bổ sung chất chiết lá cây hoàn ngọc vào thức ăn giúp cải thiện hệ thống miễn dịch và giảm tỉ lệ chết của cá tra khi kháng lại vi khuẩn *E. ictaluri*.

Keywords:

Immune system, *Pseuderanthemum palatiferum*, striped catfish

Trích dẫn: Bùi Thị Bích Hằng và Nguyễn Thanh Phương, 2020. Ảnh hưởng của chất chiết từ lá cây hoàn ngọc (*Pseuderanthemum palatiferum* (Wall.) Radlk) lên tăng trưởng và đáp ứng miễn dịch cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(3B): 101-111.

1 GIỚI THIỆU

Đồng bằng sông Cửu Long là vùng khu vực có thế mạnh về nuôi trồng thủy sản, trong đó cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là một trong những đối tượng nuôi phổ biến nhất. Sản lượng cá tra trong năm 2019 đạt 1.519 tấn tăng 6,9% so với năm 2018 (Tổng cục Thống kê, 2020). Trong vài thập kỷ qua, nghề nuôi cá tra phát triển mạnh và đã trở thành mặt hàng thủy sản xuất khẩu chủ lực mang lại kim ngạch lớn. Bên cạnh những thành tựu đạt được thì nghề nuôi cá tra hiện đang phải đối mặt với nhiều thách thức do biến đổi khí hậu, giá cả bấp bênh, dịch bệnh thường xuyên bùng phát. Bệnh gan thận mũ thường xuyên xảy ra trong quá trình nuôi cá tra và gây nhiều thiệt hại cho người nuôi (Từ Thanh Dung và *ctv.*, 2010). Nhiều loại kháng sinh và hóa chất đã được người nuôi sử dụng phổ biến để kiểm soát bệnh. Tuy nhiên, lạm dụng thuốc và hóa chất không theo quy định sẽ dẫn đến nguy cơ tồn dư lượng trên sản phẩm, tạo các dòng vi khuẩn kháng thuốc, phá hủy quần thể vi sinh vật trong môi trường và ức chế hệ miễn dịch ở cá (Smith *et al.*, 2003, Sapkota *et al.*, 2008). Vì thế, tìm ra một giải pháp mới thay thế kháng sinh để phòng trị bệnh cho cá tra hiện rất quan trọng và cần thiết. Nhiều nghiên cứu sử dụng thảo dược trong nuôi trồng thủy sản đã được tiến hành và ghi nhận khả năng kháng khuẩn, tăng cường đáp ứng miễn dịch cho cá, giúp cá kháng lại mầm bệnh,... (Huỳnh Kim Diệu, 2010; Chakraborty *et al.*, 2011). Kết quả nghiên cứu của Huỳnh Kim Diệu (2010) về hoạt tính kháng khuẩn của 30 loài cây thuốc nam cho thấy tất cả các loài cây này đều có khả năng kháng khuẩn (MIC=16-2048 µg/mL). Nghiên cứu bổ sung gừng (*Zingiber officinale*) vào thức ăn cá hồi cũng làm gia tăng hoạt động thực bào trong máu cá (Düğenci *et al.*, 2003). Chiết xuất từ ôi (*Psidium guajava*) có khả năng kiểm soát và hạn chế được dịch bệnh do *Aeromonas hydrophila* gây ra trên cá nhờ tác dụng tăng khả năng hoạt động hệ miễn dịch (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2009). Cây hoàn ngọc được đánh giá là nguồn dược liệu đa dụng, thường được sử dụng trong điều trị viêm nhiễm và có khả năng kháng khuẩn cao. Kết quả phân tích cho thấy mẫu lá cây hoàn ngọc rất giàu axit amin, khoáng chất và một số hợp chất có hoạt tính sinh học có giá trị như lupeol, lupenone, belutin và acid pomolic (Huỳnh Kim Diệu, 2008). Một số bộ phận của cây hoàn ngọc như lá, rễ được sử dụng để sản xuất dược phẩm điều trị bệnh viêm, nhiễm, ung thư trên người và gia súc (Padee *et al.*, 2010). Tuy nhiên, hiện nay vẫn chưa có nhiều nghiên cứu đánh giá tác động của cây hoàn ngọc lên hoạt động, tăng trưởng, sức khỏe của các

loài thủy sản cũng như trên cá tra. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của chất chiết lá cây hoàn ngọc lên tăng trưởng và đáp ứng miễn dịch của cá tra, làm cơ sở đề xuất phương pháp phòng trị bệnh hiệu quả cho cá tra.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Cá tra giống (20-25 g) được mua từ trại giống ở tỉnh Hậu Giang, vận chuyển về trại thực nghiệm của Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. Cá được thuần dưỡng 2 tuần trước khi bố trí thí nghiệm.

Chất chiết từ lá cây hoàn ngọc dạng cao thô được cung cấp bởi doanh nghiệp tư nhân Hoàn Ngọc 7 Nga Tây Ninh (số 37, đường Nguyễn Trọng Cát, phường Hiệp Ninh, tỉnh Tây Ninh).

Thức ăn thí nghiệm: thức ăn sử dụng trong quá trình thí nghiệm là thức ăn viên công nghiệp 32% đạm, kích cỡ 2 mm (Grobest). Chất chiết được pha loãng với DMSO tương ứng theo tỉ lệ của mỗi nghiệm thức và phun đều vào thức ăn, để khô tự nhiên trong vòng 4 giờ. Sau đó áo ngoài viên thức ăn bằng 5 mL dầu mực, tiếp tục để khô tự nhiên trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng. Thức ăn được đóng gói và trữ ở 4°C trong suốt thời gian thí nghiệm.

Nguồn vi khuẩn: vi khuẩn *E. ictaluri* được cung cấp từ bộ sưu tập của Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. Vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường Nutrient Broth, ly tâm ở 4.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 610 nm. Nguồn vi khuẩn này được sử dụng để cảm nhiễm cho cá trong thí nghiệm tiếp theo.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm cho cá ăn thức ăn có bổ sung chất chiết cây hoàn ngọc

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 nghiệm thức (NT) bao gồm đối chứng (không bổ sung chất chiết lá cây hoàn ngọc – gọi là chất chiết) (NT1), 0,02% chất chiết (NT2), 0,1% chất chiết (NT3) và 0,5% chất chiết (NT4). Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Bể thí nghiệm nuôi 30 cá. Cá được cho ăn 3% khối lượng thân, 3 lần/ngày trong vòng 6 tuần. Định kỳ 2 ngày làm vệ sinh bể ương nuôi. Thu mẫu cá vào các tuần thứ 3 và 6 (đợt 1 và 2). Mỗi lần thu mẫu máu của 3 cá/bể để xác định các chỉ tiêu huyết học và hoạt tính lysozyme. Cá được cân khối

lượng ở thời gian bắt đầu và kết thúc thí nghiệm để tính tăng trưởng. Kết thúc thí nghiệm, cá được cảm nhiễm với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* để đánh giá khả năng kháng khuẩn.

Thí nghiệm cảm nhiễm cá cho ăn thức ăn có chất chiết với vi khuẩn

Cá sau 6 tuần cho ăn thức ăn có bổ sung chất chiết được cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 nghiệm thức gồm 4 nghiệm thức cá của thí nghiệm thứ nhất được tiêm vi khuẩn và 1 nghiệm thức đối chứng âm, cá được tiêm nước muối sinh lí (0,85% NaCl). Thí nghiệm cảm nhiễm được thực hiện bằng phương pháp tiêm vi khuẩn với mật độ 10^5 CFU/mL, liều lượng 0,1 mL/cá (Hang *et al.*, 2013). Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, 13 cá/bể, bể được sục khí liên tục và không thay nước. Trong thời gian cảm nhiễm cá được cho ăn bằng thức ăn viên công nghiệp theo nhu cầu. Theo dõi cá trong 2 tuần, ghi nhận những biểu hiện bệnh lý và số lượng cá chết mỗi ngày. Sau 3 ngày cảm nhiễm tiến hành thu mẫu máu của 3 cá/bể (đợt 3) để xác định các chỉ tiêu huyết học và hoạt tính lysozyme; 3 cá được thu mẫu sẽ không tính vào tỉ lệ chết tích lũy của cá cảm nhiễm. Mẫu thận trước của cá lờ đờ, sắp chết được thu và trữ trong ethanol để tái định danh vi khuẩn.

2.2.2 Phương pháp phân tích và tính toán số liệu

Tăng trưởng

Tăng trọng: $WG = (W_t - W_0)$

Tăng trưởng theo ngày: $DWG (g/ngày) = (W_t - W_0)/t$

Tăng trưởng tương đối: $SGR (\%/ngày) = [(LnW_t - LnW_0)/t] \times 100$

Trong đó, W_0 : Khối lượng cá ở thời điểm ban đầu (g); W_t : Khối lượng cá ở thời điểm kết thúc thí nghiệm (g); t : Thời gian nuôi (ngày).

Hồng cầu được định lượng theo phương pháp của Natt and Herrick (1952); mật độ hồng cầu được xác định bằng buồng đếm Neubauer và tính theo công thức:

$HC = C \times 10 \times 5 \times 200$ (tb/mm³) (C: Tổng số hồng cầu trong 5 vùng đếm)

Tổng bạch cầu và từng loại bạch cầu được định lượng theo phương pháp của Hrubec *et al.* (2000). Trãi mẫu máu bằng cách nhỏ một giọt máu lên lame,

sau đó dùng lamelle chạm vào giọt máu và đẩy lamelle ngược về phía trước. Mẫu máu sau khi khô được cố định trong methanol 1 phút. Giữ cho mẫu khô tự nhiên và nhuộm Wright & Giemsa.

Tổng số lượng bạch cầu được tính theo công thức:

$TBC (tb/mm^3) = (số BC \text{ trong } 1.500 \text{ tế bào} \times R) / số HC \text{ trong } 1.500 \text{ tế bào}$ (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. Tính mật độ từng loại bạch cầu theo công thức:

Mật độ loại bạch cầu (tb/mm³) = (Số lượng mỗi loại bạch cầu \times TBC)/200

Hoạt tính lysozyme được phân tích theo phương pháp của Ellis *et al.* (1990). Dụng đường chuẩn lysozyme với các nồng độ 0, 2, 4, 8 và 16 μ g/mL. Cho 10 μ L dung dịch từ các nồng độ pha loãng cho vào đĩa 96 giếng, tiếp theo cho 200 μ L/giếng dịch huyền phù *Micrococcus luteus* (Sigma). Đối với mẫu huyết thanh của cá thì cho 10 μ L huyết thanh vào đĩa 96 giếng, thêm 200 μ L/giếng vi khuẩn *M. luteus*; 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.

2.3 Phương pháp phân tích số liệu

Số liệu được tính toán và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel. Xử lý thống kê bằng phương sai 1 nhân tố ANOVA và so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức 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 6 tuần thí nghiệm, cá ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết tăng khối lượng trung bình từ 12,9-13,4 g, nhưng khác biệt không có ý nghĩa so với cá ở nghiệm thức đối chứng 11,7 g (Bảng 1). Tốc độ tăng trưởng tương đối (DWG) của cá ở các nghiệm thức dao động từ 0,31-0,32 (g/ngày), tốc độ tăng trưởng tương đối (SGR) dao động từ 0,87-0,92 (%/ngày) cao hơn cá ở nghiệm thức đối chứng (0,28 g/ngày; 0,79%/ngày). Nhìn chung, cá ở nghiệm thức bổ sung 0,5% chất chiết có tăng trưởng, DWG và SGR đạt cao nhất, cụ thể 13,4 g; 0,32 g/ngày; 0,92%/ngày, nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với cá đối chứng ($p > 0,05$).

Bảng 1: Tăng trưởng cá tra sau 42 ngày bổ sung chất chiết

Nghiệm thức	Tăng trưởng		
	WG (g)	DWG (g/ngày)	SGR (%/ngày)
NT1 (Đối chứng)	11,7 ± 1,23	0,28 ± 0,03	0,79 ± 0,06
NT2 (0,02% Hoàn ngọc)	12,9 ± 0,93	0,31 ± 0,02	0,87 ± 0,04
NT3 (0,1% Hoàn ngọc)	13,3 ± 1,42	0,32 ± 0,03	0,91 ± 0,11
NT4 (0,5% Hoàn ngọc)	13,4 ± 0,98	0,32 ± 0,02	0,92 ± 0,10

Ghi chú: Các giá trị trình bày là trung bình ± độ lệch chuẩn.

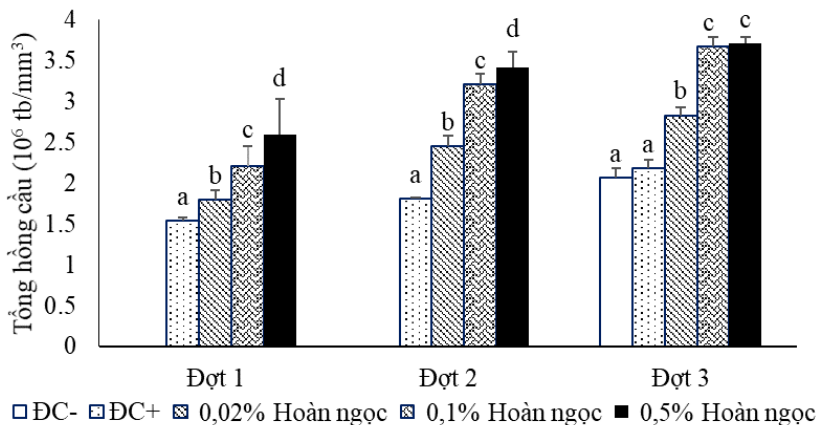
3.2 Chỉ tiêu huyết học

3.2.1 Mật độ tổng hồng cầu và tổng bạch cầu

Tổng hồng cầu

Mật độ hồng cầu cá tra ở các nghiệm thức được bổ sung chất chiết đều tăng cao và khác biệt có ý nghĩa so với cá ở nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$) (Hình 1). Mật độ hồng cầu tăng sau 3 tuần bổ sung thảo dược, dao động từ $1,54 \times 10^6$ – $2,59 \times 10^6$ tế bào/mm³. Nghiệm thức bổ sung hoàn ngọc ở nồng độ 0,1% và 0,5% hoàn ngọc đều có tổng hồng cầu tăng cao, trong đó nghiệm thức 0,5% tăng cao nhất ($2,59 \times 10^6$ tế bào/mm³) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$). Sau 6 tuần thí nghiệm, mật độ hồng cầu của cá ở các nghiệm thức dao động từ $1,81 \times 10^6$ đến $3,41 \times 10^6$ tế

bào/mm³. Mật độ hồng cầu của cá ở nghiệm thức bổ sung 0,1% và 0,5% chất chiết đều cho kết quả cao, lần lượt là $3,20 \times 10^6$ và $3,41 \times 10^6$ tế bào/mm³. Nghiệm thức bổ sung 0,5% chất chiết đạt cao nhất ($3,41 \times 10^6$ tế bào/mm³) và khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) với các nghiệm thức còn lại. Sau khi cảm nhiễm với *E. ictaluri*, mật độ hồng cầu của cá ở các nghiệm thức đều gia tăng, dao động trong khoảng $2,06 \times 10^6$ - $3,71 \times 10^6$ tế bào/mm³; nghiệm thức 0,1% và 0,5% có giá trị cao nhất $3,67 \times 10^6$ tế bào/mm³ và $3,71 \times 10^6$ tế bào/mm³, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$). Bên cạnh, mật độ hồng cầu của cá ở nghiệm thức đối chứng dương (tiêm vi khuẩn) là $2,18 \times 10^6$ tế bào/mm³, cao hơn nghiệm thức đối chứng âm (tiêm NaCl 0,85%) $2,06 \times 10^6$ tế bào/mm³, nhưng khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).



Hình 1: Mật độ hồng cầu cá tra sau 42 ngày bổ sung chất chiết

Ghi chú: Giá trị thể hiện trên hình là giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Các giá trị trên cùng một đợt thu mẫu có các chữ cái khác nhau a, b, c, d thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). ĐC-: nghiệm thức đối chứng âm, cá đối chứng được tiêm nước muối sinh lý; ĐC+: nghiệm thức đối chứng dương, cá đối chứng được tiêm vi khuẩn.

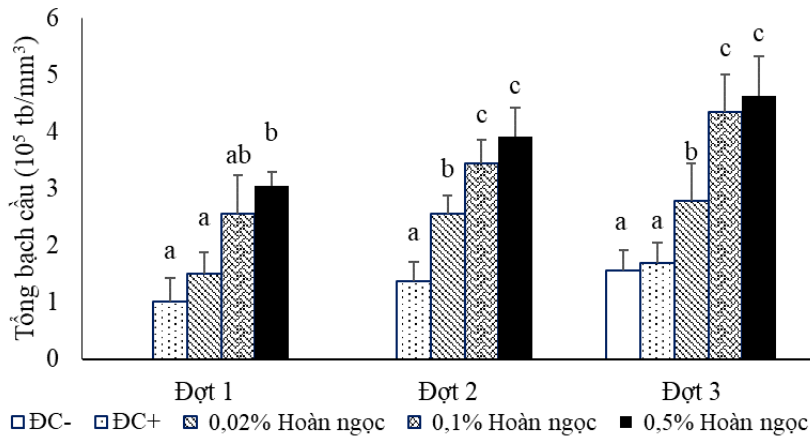
Tổng bạch cầu

Sau 3 tuần thí nghiệm thì mật độ tổng bạch cầu của cá ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết dao động từ $1,51$ - $3,05 \times 10^5$ tế bào/mm³, cao hơn so với nghiệm thức đối chứng ($1,00 \times 10^5$ tế bào/mm³). Tuy nhiên, chỉ có nghiệm thức bổ sung 0,5% hoàn ngọc

là cho mật độ bạch cầu tăng cao có ý nghĩa so với đối chứng ($p < 0,05$). Sau 6 tuần, mật độ bạch cầu của các nghiệm thức có sự gia tăng so với tuần thứ 3. Tổng bạch cầu ở nghiệm thức 0,02%, 0,1% và 0,5% lần lượt là $2,56 \times 10^5$; $3,44 \times 10^5$ và $3,90 \times 10^5$ tế bào/mm³ cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($1,37 \times 10^5$ tế bào/mm³) ($p < 0,05$)

(Hình 2). Sau cảm nhiễm với vi khuẩn thì mật độ tổng bạch cầu của các nghiệm thức bổ sung chất chiết đều tăng cao hơn có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng, trong đó nghiệm thức bổ sung 0,1%

và 0,5% đạt giá trị cao nhất, $4,34 \times 10^5$ tế bào/mm³ và $4,63 \times 10^5$ tế bào/mm³, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$).



Hình 2: Mật độ tổng bạch cầu cá sau 42 ngày bổ sung chất chiết

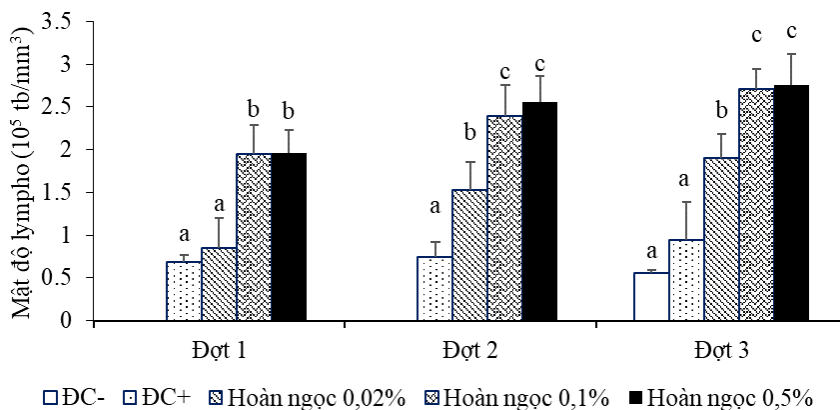
Ghi chú: Giá trị thể hiện trên hình là giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Các giá trị trên cùng một đợt thu mẫu có các chữ cái khác nhau a, b, c thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). ĐC-: Nghiệm thức đối chứng âm, cá đối chứng được tiêm nước muối sinh lý; ĐC+: Nghiệm thức đối chứng dương, cá đối chứng được tiêm vi khuẩn.

3.2.2 Mật độ các loại tế bào bạch cầu

Mật độ tế bào lympho

Tuần thứ 3 thì mật độ tế bào lympho gia tăng ở nghiệm thức bổ sung chất chiết so với nghiệm thức đối chứng. Tuy nhiên, tế bào lympho tăng cao có ý nghĩa thống kê ở hai nghiệm thức bổ sung 0,1% ($1,94 \times 10^5$ tế bào/mm³) và 0,5% chất chiết ($1,96 \times 10^5$ tế bào/mm³) so với nghiệm thức đối chứng ($0,68 \times 10^5$ tế bào/mm³) ($p < 0,05$) (Hình 3). Tuần thứ 6 thì tế bào lympho ở các nghiệm thức bổ sung 0,1%

và 0,5% chất chiết vẫn tiếp tục tăng cao ($2,39$ và $2,56 \times 10^5$ tế bào/mm³) gấp 3 lần so với đối chứng ($0,75 \times 10^5$ tế bào/mm³) và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Sau 3 ngày cảm nhiễm vi khuẩn, mật độ tế bào lympho ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết đều cao hơn so với nghiệm thức đối chứng. Nghiệm thức bổ sung 0,1% và 0,5% đều có mật độ tế bào lympho tăng cao nhất ($2,71 \times 10^5$ và $2,76 \times 10^5$ tế bào/mm³), khác biệt có ý nghĩa so với cá ở các nhóm đối chứng.



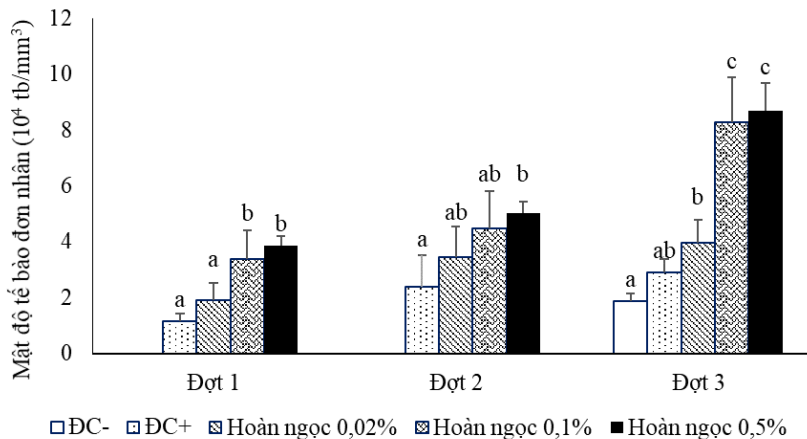
Hình 3: Mật độ tế bào lympho của cá tra sau 42 ngày bổ sung chất chiết

Ghi chú: Giá trị thể hiện trên hình là giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Các giá trị trên cùng một đợt thu mẫu có các chữ cái khác nhau a, b, c thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). ĐC-: Nghiệm thức đối chứng âm, cá đối chứng được tiêm nước muối sinh lý; ĐC+: Nghiệm thức đối chứng dương, cá đối chứng được tiêm vi khuẩn.

Mật độ tế bào đơn nhân

Tương tự tế bào lympho, kết quả thí nghiệm cho thấy chất chiết có khả năng kích thích làm gia tăng tế bào đơn nhân. Sau 3 tuần thí nghiệm, các nghiệm thức được bổ sung chất chiết có mật độ tế bào đơn nhân tăng cao so với nghiệm thức đối chứng. Trong đó, mật độ tế bào đơn nhân ở nghiệm thức 0,1% hoàn ngọc ($3,38 \times 10^4$ tế bào/mm³) và 0,5% hoàn ngọc ($3,87 \times 10^4$ tế bào/mm³) tăng cao có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng ($1,15 \times 10^4$ tế bào/mm³) ($p < 0,05$). Tuy nhiên, nghiệm thức bổ sung 0,02% chất chiết có mật độ tế bào đơn nhân cao hơn nghiệm thức đối chứng nhưng khác biệt không có ý nghĩa

thống kê. Sau 6 tuần, tế bào đơn nhân của các nghiệm thức bổ sung chất chiết tăng cao so với tuần thứ 3. Mật độ tế bào đơn nhân ở các nghiệm thức bổ sung hoàn ngọc dao động từ $3,44 \times 10^4$ - $5,03 \times 10^4$ tế bào/mm³ cao hơn so với nghiệm thức đối chứng ($2,39 \times 10^4$ tế bào/mm³) nhưng chỉ có nghiệm thức bổ sung 0,5% hoàn ngọc cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) (Hình 4). Sau khi cảm nhiễm, tế bào đơn nhân ở 2 nghiệm thức bổ sung 0,1% và 0,5% hoàn ngọc tăng rất cao, gấp 3 lần so với nghiệm thức đối chứng và gấp 2 lần so với nghiệm thức bổ sung 0,02% chất chiết khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).



Hình 4: Mật độ tế bào đơn nhân của cá tra sau 42 ngày bổ sung chất chiết

Ghi chú: Giá trị thể hiện trên hình là giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Các giá trị trên cùng một đợt thu mẫu có các chữ cái khác nhau a, b, c thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). DC-: Nghiệm thức đối chứng âm, cá đối chứng được tiêm nước muối sinh lý; DC+: Nghiệm thức đối chứng dương, cá đối chứng được tiêm vi khuẩn.

Mật độ tế bào trung tính

Sau 3 tuần cho thấy bạch cầu trung tính gia tăng ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết, dao động từ $1,60 \times 10^4$ - $3,83 \times 10^4$ tế bào/mm³, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với đối chứng ($0,83 \times 10^4$ tế bào/mm³). Trong đó, nghiệm thức bổ sung 0,5% đạt giá trị cao nhất ($3,83 \times 10^4$ tế bào/mm³). Sau 6 tuần thí nghiệm, số lượng tế bào trung tính ở các nghiệm thức bổ sung hoàn ngọc vẫn tiếp tục tăng cao. Hai nghiệm thức bổ sung 0,1 và 0,5% đạt giá trị cao nhất, lần lượt là $4,27 \times 10^4$ và $3,90 \times 10^4$ tế bào/mm³, cao gấp 3,8 lần so với nghiệm thức đối chứng ($1,15 \times 10^4$ tế bào/mm³). Tương tự, nghiệm thức bổ sung 0,02% ($2,38 \times 10^4$ tế bào/mm³) cũng tăng gấp đôi so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Sau cảm nhiễm, mật độ tế bào trung tính cũng gia tăng ở các nghiệm thức. Các nghiệm thức bổ sung chất chiết đều có mật độ tế bào trung tính tăng cao hơn nghiệm thức đối chứng. Nghiệm thức bổ sung

0,5% hoàn ngọc có giá trị cao nhất $5,49 \times 10^4$ tế bào/mm³, khác biệt so với các nghiệm thức khác ngoại trừ nghiệm thức 0,1% chất chiết (Bảng 2).

Mật độ tế bào tiểu cầu

Sau 3 tuần thí nghiệm, mật độ tiểu cầu của cá dao động từ $0,74 \times 10^4$ - $3,44 \times 10^4$ tế bào/mm³ (Bảng 2). Nghiệm thức bổ sung 0,5% chất chiết có mật độ tiểu cầu cao nhất ($3,44 \times 10^4$ tế bào/mm³) và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng ($0,74 \times 10^4$ tế bào/mm³). Hai nghiệm thức còn lại, nghiệm thức bổ sung 0,02% và 0,1% chất chiết cũng tăng so với nghiệm thức đối chứng, lần lượt là $1,42 \times 10^4$ và $2,33 \times 10^4$ tế bào/mm³. Sau 6 tuần, mật độ tiểu cầu của cá ở các nghiệm thức bổ sung 0,1% và 0,5% chất chiết đều tăng cao và cho kết quả tương đương nhau ($3,23 \times 10^4$ và $3,51 \times 10^4$ tế bào/mm³); nghiệm thức 0,02% chất chiết đạt $2,76 \times 10^4$ tế bào/mm³, cao hơn có ý nghĩa so với các nghiệm thức

đôi chứng ($1,07 \times 10^4$ tế bào/mm³) ($p < 0,05$). Sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn, mật độ tiểu cầu của cá ở các nghiệm thức bổ sung hoàn ngọc vẫn cao hơn

nghiệm thức đối chứng, nhưng chỉ có nghiệm thức bổ sung 0,1% và 0,5% hoàn ngọc thể hiện khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng.

Bảng 2: Mật độ tế bào trung tính và tiểu cầu của cá tra sau 42 ngày bổ sung chất chiết

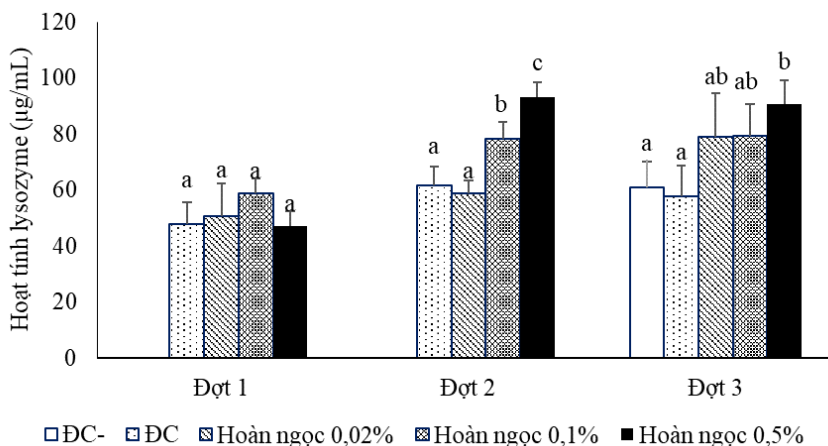
Nghiệm thức	Đợt 1	Đợt 2	Đợt 3
Tế bào trung tính ($\times 10^4$ tế bào/mm³)			
NT1 (Đối chứng)	0,83 ± 0,32a	1,15 ± 0,27a	2,61 ± 0,38b
NT2 (0,02% Hoàn ngọc)	1,60 ± 0,89ab	2,38 ± 0,61b	3,87 ± 0,72c
NT3 (0,1% Hoàn ngọc)	2,50 ± 0,54b	4,27 ± 0,85c	5,11 ± 1,04d
NT4 (0,5% Hoàn ngọc)	3,83 ± 0,79c	3,90 ± 0,62c	5,49 ± 0,72d
NT5 (ĐC- tiêm NaCl)			1,08 ± 0,16a
Tiểu cầu ($\times 10^4$ tế bào/mm³)			
NT1 (Đối chứng)	0,74 ± 0,24a	1,07 ± 0,51a	2,29 ± 0,11ab
NT2 (0,02% Hoàn ngọc)	1,42 ± 0,70ab	2,76 ± 0,55b	3,48 ± 0,73b
NT3 (0,1% Hoàn ngọc)	2,33 ± 0,89b	3,23 ± 1,16b	5,52 ± 1,09c
NT4 (0,5% Hoàn ngọc)	3,44 ± 0,81c	3,51 ± 1,59b	5,28 ± 0,98c
NT5 (ĐC- tiêm NaCl)			0,96 ± 0,11a

Ghi chú: Giá trị thể hiện trên bảng là giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Các giá trị trên cùng một cột có các chữ cái khác nhau a, b, c thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Hoạt tính lysozyme

Kết quả hình 5 cho thấy sau 3 tuần sử dụng thức ăn có bổ sung chất chiết, hoạt tính lysozyme của cá cao hơn so với nghiệm thức đối chứng, dao động từ 47,8 đến 58,67 µg/mL. Nghiệm thức bổ sung 0,1% chất chiết biểu hiện cao nhất 58,7 µg/mL nhưng không có sự khác biệt thống kê giữa các nghiệm thức ($p > 0,05$). Sau 6 tuần thí nghiệm, hoạt tính lysozyme tăng cao hơn ở tuần thứ 3 và dao động trong khoảng 58,9-93,0 µg/mL. Trong đó, hoạt tính

lysozyme ở nghiệm thức bổ sung 0,5% chất chiết đạt giá trị cao nhất (93,0 µg/mL), nghiệm thức bổ sung 0,1% chất chiết đạt 78,2 µg/mL, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức bổ sung 0,02% chất chiết (58,9 µg/mL) và nghiệm thức đối chứng (61,5 µg/mL) ($p < 0,05$) (Hình 5). Sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn, hoạt tính lysozyme của các nghiệm thức bổ sung chất chiết đều cao hơn các nghiệm thức đối chứng. Cụ thể, nghiệm thức bổ sung 0,5% hoàn ngọc thể hiện hoạt tính lysozyme cao nhất 90,7 µg/mL và khác biệt với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$).



Hình 5: Hoạt tính lysozyme của cá tra sau 42 ngày bổ sung chất chiết lá cây hoàn ngọc

Ghi chú: Giá trị thể hiện trên hình là giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Các giá trị trên cùng một đợt thu mẫu có các chữ cái khác nhau a,b,c thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). ĐC-: Nghiệm thức đối chứng âm, cá đối chứng được tiêm nước muối sinh lý; ĐC+: Nghiệm thức đối chứng dương, cá đối chứng được tiêm vi khuẩn.

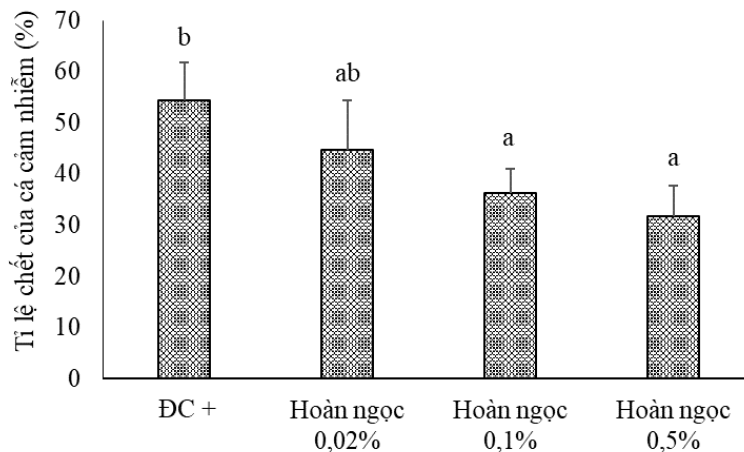
3.3 Ảnh hưởng của chất chiết hoàn ngọc lên khả năng kháng *E. ictaluri*

Dấu hiệu bệnh lý

Sau 2 tuần theo dõi thí nghiệm cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*, kết quả cho thấy cá sau khi cảm nhiễm có dấu hiệu bơi lờ đờ, kém ăn, không phản ứng với tiếng động và một số vảy có dấu hiệu tưa rách, xuất huyết. Khi giải phẫu bên trong nội quan thường có dịch bên trong xoang bụng và có mùi hôi; gan thận và tỷ tạng xuất hiện nhiều đốm trắng nhỏ li ti.

Tỉ lệ chết của cá cảm nhiễm

Tỉ lệ chết của cá cảm nhiễm sau 2 tuần có sự khác biệt giữa các nghiệm thức. Cá ở nghiệm thức đối chứng âm (ĐC-: tiêm nước muối sinh lý) không chết, không biểu hiện dấu hiệu bệnh lý, hoạt động bình thường. Nghiệm thức đối chứng dương (ĐC+, không bổ sung chất chiết hoàn ngọc, tiêm vi khuẩn) có tỉ lệ chết cao nhất 54,3%. Hai nghiệm thức bổ sung 0,1% và 0,5% chất chiết hoàn ngọc có tỉ lệ chết thấp nhất, lần lượt là 36,3% và 31,7% khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ($p < 0,05$) (Hình 6).



Hình 6: Tỉ lệ chết của cá sau khi cảm nhiễm với *E. ictaluri*

Ghi chú: Giá trị thể hiện trên hình là giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Các giá trị trên hình có các chữ cái khác nhau a, b, c thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). ĐC+: Nghiệm thức đối chứng, cá không bổ sung chất chiết hoàn ngọc, tiêm vi khuẩn.

4 THẢO LUẬN

Kết quả thí nghiệm cho thấy bổ sung chất chiết lá cây hoàn ngọc vào thức ăn cá tra làm cá tăng trưởng nhanh hơn nhưng khác biệt không ý nghĩa so với nhóm cá đối chứng. Một số nghiên cứu trước đây cũng chỉ ra nhiều loài cá tăng trưởng tốt hơn khi ăn thức ăn có bổ sung thảo dược. Bổ sung 0,5% chất chiết lá ôi vào khẩu phần ăn của cá trôi giúp kích thích miễn dịch và tăng trưởng cao hơn so với nhóm đối chứng (Giri *et al.*, 2015). Nghiên cứu của Ferdous *et al.* (2017) bổ sung chất chiết từ lá ôi với nồng độ 8% vào thức ăn cá rô phi cho cá tăng trưởng tốt hơn so với cá không bổ sung hay bổ sung chất chiết lá ôi với nồng độ thấp hơn (2%, 4%, và 6%). Ngược lại, khi bổ sung chất chiết từ cây sấu đầu với liều lượng 1 g/kg thức ăn giúp cá tăng trưởng nhanh, liều lượng 2 g/kg thức ăn không ảnh hưởng đến tăng trưởng của cá và với liều lượng cao (4 và 8 g/kg thức ăn) đã làm cá chậm tăng trưởng (Obaroh and Achionye-Nzeh, 2011). Các sản phẩm từ thực vật đã

được chứng minh có khả năng kích hoạt enzyme tiêu hóa, tăng cường hiệu quả sử dụng thức ăn của cá làm cá tăng trưởng nhanh và gia tăng tỉ lệ sống trong suốt quá trình nuôi (Radhakrishnan *et al.*, 2014).

Nghiên cứu này cũng đã thể hiện chất chiết có tác động lên một số chỉ tiêu huyết học của cá tra. Hầu hết mật độ hồng cầu và bạch cầu đều tăng cao ở nghiệm thức bổ sung 0,1% và 0,5% chất chiết. Tương đồng với kết quả thí nghiệm này, nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của chất chiết từ thảo dược lên động vật thủy sản đã ghi nhận có sự tác động lên một số chỉ tiêu huyết học của cá. Binaii *et al.* (2014) sử dụng chất chiết từ lá và thân cây tầm ma (*Urtica dioica*) bổ sung vào thức ăn cho cá tầm (*Huso huso*) với các nồng độ 0%, 3%, 6% và 12% trong 8 tuần. Kết quả cho thấy số lượng hồng cầu của nghiệm thức bổ sung 12% đạt cao nhất và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng ($p < 0,05$), trong khi nghiệm thức bổ sung 6%, 12% lại cho mật độ tổng bạch cầu tăng cao có ý nghĩa với đối chứng. Cá tầm (*Huso*

huso) sử dụng thức ăn có bổ sung chất chiết hành (*Allium cepa*) ở 3 mức 0%, 0,5%, và 1% trong 8 tuần cho thấy cá được bổ sung 1% chất chiết hành có mật độ hồng cầu tăng cao nhất và khác biệt với đối chứng ($p < 0,05$) (Akrami *et al.*, 2015). Adel *et al.* (2015) bổ sung chất chiết cây bạc hà cay (*Mentha piperita*) với 4 nồng độ 0%, 1%, 2% và 3% vào thức ăn của cá kutum (*Rutilus frisii kutum*) trong 8 tuần. Kết quả ghi nhận mật độ hồng cầu ($2,25 \times 10^6$ tế bào/mm³) và tổng bạch cầu của cá ở nghiệm thức bổ sung 3% chất chiết bạc hà có giá trị cao nhất, khác biệt có ý nghĩa so với cá ở nhóm đối chứng và nhóm bổ sung 1% bạc hà ($p < 0,05$). Kakoolaki *et al.* (2016) nghiên cứu trên cá đối đầu đẹt (*Mugilce cephalus*) khi cho ăn thức ăn có bổ sung chất chiết từ lá trà (*Camellia sinensis*) trong 8 tuần. Kết quả cho thấy số lượng bạch cầu của cá tăng cao khi được bổ sung 200 ppm chất chiết trà xanh, khác biệt với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$). Sự gia tăng mật độ bạch cầu của cá tra được bổ sung chất chiết hoàn ngọc góp phần cải thiện hệ thống miễn dịch không đặc hiệu và tăng cường sức khỏe của cá.

Ngoài ra, kết quả nghiên cứu còn cho thấy khi bổ sung chất chiết không chỉ tăng cường hồng cầu hay tổng bạch cầu mà còn kích hoạt nhiều loại bạch cầu khác nhau như tế bào lympho, bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính. Tương đồng với kết quả này, nghiên cứu bổ sung 3% tỏi và 1 ppt *Echinacea* vào thức ăn cá rô phi đã báo cáo mật độ tế bào lympho tăng cao và khác biệt thống kê so với nghiệm thức đối chứng (Aly and Mohamed, 2010). Một thí nghiệm khác đánh giá ảnh hưởng của một số loài thảo dược lên đáp ứng miễn dịch của cá nheo cũng cho thấy thảo dược *Solanum trilobatum*, *Ocimum sanctum* và hỗn hợp giữa hai loại thảo dược này đều kích hoạt gia tăng tế bào bạch cầu trung tính (Subeenabegum *et al.*, 2016). Mai Thanh Thanh và Bùi Thị Bích Hằng (2018) thí nghiệm bổ sung tỏi vào thức ăn cho cá điêu hồng ghi nhận sự gia tăng mật độ tế bào trung tính và tiểu cầu của cá được bổ sung tỏi; nghiệm thức bổ sung 0,25% bột tỏi cho kết quả cao nhất. Tuy nhiên, không phải chất chiết hay bất kỳ loài thảo dược nào cũng làm tăng số lượng tiểu cầu của đối tượng nghiên cứu. Prasad and Priyanka (2011) bổ sung quả nụ khô vào thức ăn cho cá tra, ghi nhận số lượng tiểu cầu tăng nhưng khác biệt không có ý nghĩa giữa các nghiệm thức. Bùi Thị Bích Hằng và *ctv.* (2015) đã sử dụng vitamin C bổ sung vào thức ăn cá tra cũng cho thấy số lượng tế bào tiểu cầu khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức sau 2 và 4 tuần thí nghiệm.

Trong nghiên cứu này, hoạt tính lysozyme của cá ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết đều cao hơn

cá đối chứng sau 8 tuần thí nghiệm. Kết quả thí nghiệm này cũng phù hợp với ghi nhận của Christyapita *et al.* (2007) khi bổ sung chất chiết cỏ mực vào thức ăn cá rô phi trong 3 tuần. Kết quả cho thấy hoạt tính lysozyme tăng cao chỉ sau 1 tuần thí nghiệm. Tương tự, theo Ahmadi *et al.* (2012) ghi nhận bổ sung chất chiết cây kế sữa vào thức ăn cá hồi thu được kết quả lysozyme cao hơn có ý nghĩa so với đối chứng ở 2 nồng độ 0,1 và 0,4 g/kg thức ăn. Lysozyme là một enzyme có khả năng cắt cầu nối giữa phân tử N-acetyl glucosamine và N-acetyl muramin có trong cấu tạo của màng vi khuẩn. Chính nhờ hoạt tính trên mà lysozyme có thể tiêu diệt vi khuẩn Gram dương và một số vi khuẩn Gram âm, vì thế hoạt động của lysozyme càng cao thì khả năng kháng bệnh càng cao (Đỗ Ngọc Liên, 2004).

Nghiên cứu còn chỉ ra bổ sung chất chiết vào thức ăn làm giảm tỉ lệ chết của cá tra khi cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*, tác nhân chính gây bệnh gan thận mù trên loài cá này. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Pade and Somsak (2009), lá và rễ cây hoàn ngọc chứa nhiều thành phần hóa học quan trọng bao gồm β -sitosterol, stigmasterol, kaempferol, apigenin, phytol, triterpenoids saponin và salicylic acid, có hoạt tính kháng oxy hóa, kháng nấm và kháng khuẩn cao. Tương đồng với kết quả trên, nhiều nghiên cứu trước đây cũng đã cho thấy tiềm năng của việc sử dụng các sản phẩm có hoạt tính sinh học cao từ thực vật, tảo và nấm trong việc phòng và điều trị một số tác nhân gây bệnh (Tagboto and Townson, 2001; Zahir *et al.*, 2009). Cụ thể, thí nghiệm bổ sung 0,2% hoa cỏ xước (*Achyranthes aspera*) và 0,5% sâm Ấn Độ (*Withania somnifera*) vào thức ăn cá trôi (*Labeo rohita*) là giảm 41% và 49% tỉ lệ chết của cá so với nhóm đối chứng khi cảm nhiễm với vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* (Vasudeva *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2010). Ngoài ra, Divyagnaneswari *et al.* (2007) nhận thấy khi tiêm chất chiết cà gai leo (*Solanum trilobatum*) với liều cao (400 mg/kg) trên cá rô phi cũng cho hiệu quả phòng bệnh xuất huyết rất cao. Tương tự, tiêm chất chiết cà gai leo liều thấp (2 lần) cũng cho thấy tỉ lệ chết của cá rô phi giảm thấp, chỉ 16,7% khi cảm nhiễm với *A. hydrophila*.

5 KẾT LUẬN

Cá tra giống ăn thức ăn có bổ sung chất chiết lá cây hoàn ngọc trong 6 tuần làm gia tăng một số chỉ tiêu huyết học bao gồm tổng hồng cầu, tổng bạch cầu, các loại bạch cầu và hoạt tính lysozyme. Trong đó, bổ sung 0,1% và 0,5% chất chiết cho đáp ứng miễn dịch của cá tốt nhất. Sau cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh gan thận mù, tỉ lệ chết

của cá ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết lá cây hoàn ngọc đều giảm so với đối chứng. Vì vậy, nên bổ sung 0,1% chất chiết hoàn ngọc vào thức ăn cá tra nhằm kích hoạt đáp ứng miễn dịch, tăng cường khả năng phòng vệ bệnh gan thận mù cho cá.

LỜI CẢM ƠN

Chân thành cảm ơn Doanh nghiệp Tư nhân Hoàn Ngọc 7 Nga Tây Ninh đã cung cấp cao của cây hoàn ngọc để thực hiện hiện cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adel, M., Amiri, A. A., Zorriehzahra, J., Nematollahi, A., Esteban, M.A., 2015. Effect of dietary peppermint (*Mentha piperita*) on growth performance, chemical body composition and hematological and immune parameters of fry Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*). *Fish and Shellfish Immunology*. 45(2): 841-847.
- Ahmadi, K., Banaee, M., Vosoghei, A.R. et al., 2012. Evaluation of the immunomodulatory effects of silymarin extract (*Silybum marianum*) on some immune parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Actinopterygii: Salmoniformes: Salmonidae). *Acta Ichthyol Piscat*. 42(2):113-120.
- Akrami, R., Gharaei, A., Mansour, M.R., Gaeshi, A., 2015. Effect of dietary onion (*Allium cepa*) powder on growth, innate immune responses and hematobiochemical parameters of beluga (*Huso huso* Linnaeus, 1754) juvenile. *Fish and Shellfish Immunology*. 45(2): 828-834.
- Aly, S.M. and Mohamed, M.F., 2010. *Echinacea purpurea* and *Allium sativum* as immunostimulants in fish culture using Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 94(5): 31-39.
- Binaii, M., Ghiasi, M., Farabi, S.M.V., et al., 2014. Biochemical and hemato-immunological parameters in juvenile beluga (*Huso huso*) following the diet supplemented with nettle (*Urtica dioica*). *Fish and Shellfish Immunology*. 36: 46-51.
- Bùi Thị Bích Hằng, Phạm Văn Thi, Nguyễn Văn Tân, Trương Quỳnh Như và Nguyễn Thanh Phương, 2015. Ảnh hưởng của vitamin C lên một số yếu tố miễn dịch không đặc hiệu và khả năng kháng khuẩn gây bệnh của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 39B: 85-91.
- Chakraborty, S.B. and Hancz, C., 2011. Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. *Reviews in Aquaculture*. 3: 103-119.
- Christybapita, D., Divyagnaneswari, M., Michael, R.D., 2007. Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 23(4): 840-852.
- Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương, 2009. Phát hiện vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan thận mù trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bằng phương pháp PCR. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 13: 151-159.
- Dügenci, S. K., Arda, N., Candan, A., 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *Journal of Ethnopharmacology*. 88(1): 99-106.
- Divyagnaneswari, M., Christybapita, D., Michael, R.D., 2007. Enhancement of nonspecific immunity and disease resistance in *Oreochromis mossambicus* by *Solanum trilobatum* leaf fractions. *Fish and Shellfish Immunology*. 23: 249-259.
- Đỗ Ngọc Liên, 2004. *Miễn dịch học cơ sở*. NXB Đại học Quốc gia Hà Nội. 340 trang
- 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* Fair Haven, SOS Publications, Fair Haven, pp. 101-103.
- Ferdous, J., M., Hossain, M., Jaman, M.H.U., Rupom, A.H., Tonny, N.I. and Jaman, A., 2017. *Psidium guajava* leaf extracts fed to mono-sex Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* enhance immune response against *Pseudomonas fluorescens*. *European Journal of Clinical and Biomedical Sciences*. 3(1): 34-42.
- Giri, S.S., Sen, S.S., Chi, C., Kim, H.J., Yun, S., Park, S., Sukumaran, C., 2015. Effect of guava leaves on the growth performance and cytokine gene expression of *Labeo rohita* and its susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish and Shellfish Immunology*. 46(2): 217-224
- Hang, B.T.B., Milla, S., Gillardin, V., Phuong, N.T., Kestemont, P., 2013. *In vivo* effects of *Escherichia coli* lipopolysaccharide on regulation of immune response and protein expression in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Fish and Shellfish Immunology*. 34: 339-347.
- Hrubec, T.C., Cardinale, J.L., Smith, S.A., 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for culture tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Veterinary Clinical Pathology*. 29: 7-12.
- Huỳnh Kim Diệu, 2008. Khảo sát thành phần hóa học của lá cây xuân hoa (*Pseuderanthemum palatiferum*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại Học Cần Thơ*. 9: 232-240.
- 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 Trường Đại học Cần Thơ* 15B: 222-229.

- Kakoolaki, S., Akbary, P., Zoriehzahra, M.J., Salehi, H., Sepahdari, A., Afsharnasab, M., Mehrabi, M.R., Jadgal, S., 2006. *Camellia sinensis* supplemented diet enhances the innate non-specific responses haematological parameters and growth performance in *Mugil cephalus* against *Photobacterium damsela*. Fish and Shellfish Immunology. 57: 379-385.
- 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.
- Natt, M.P., and Herrick, C.A., 1952. A new blood diluent for counting erythrocytes and leukocytes of the chicken. Poultry Science. 31:735-738.
- Obaroh, I.O., and Achionye-Nzeh, G.C., 2011. Effects of crude extract of *Azadirachta indica* leaves at controlling profile breeding in *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Asia Journal Agriculture Research. 5: 277-282.
- Padee, P., Nualkaew, S., Talubmook, C., Sakuljaitrong, S., 2010. Hypoglycemic effect of a leaf extract of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology. 132: 491-496.
- Prasad, G. and Priyanka, G.L., 2011. Effect of fruit rind extract of *Garcinia gummi-guta* on haematology and plasma biochemistry of catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). Asia Journal of a biochemistry. 6(3): 240-251.
- Radhakrishnan, S., Saravana, B., Seenivasan, C., Shanthi, R., Poongodi, R., 2014. Influence of medicinal herbs (*Alteranthera sessilis*, *Eclipta alba* and *Cissus quadrangularis*) on growth and biochemical parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture International. 22, 551-572.
- Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P., 2009. Protective effect of clove oil-supplemented fish diets on experimental *Lactococcus graviae* infection in tilapia. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 73: 2085-2089.
- Sapkota, A.A.R., Kucharski, M., Burke, J., McKenzie, S., Walker, P., Lawrence, R., 2008. Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. Environment International, 34(8): 1215-1226.
- Sharma, A., Deo, A.D., Tandel Riteshkumar, S., Chanu, T.I., Das, A., 2010. Effect of *Withania somnifera* (L. Dunal) root as a feed additive on immunological parameters and disease resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. Fish and Shellfish Immunology. 29: 508-512.
- Smith, V.J., Brown, J.H., Hauton, C., 2003. Immunostimulation in crustaceans: Does it really protect against infection?. Fish and Shellfish Immunology. 15(1): 71-90.
- Subeenabegum, S. and Navaraj, P.S., 2016. Dietary supplement of mixture of medicinal plant leaf extracts on immune response of fresh water fish *Mystus keletius*. International Journal of Applied Research. 2(2): 361-364.
- Tagboto, S. and Townson, S., 2001. Antiparasitic properties of medicinal plants and other naturally occurring products. Advances in Parasitology. Academic Press, pp.199-295.
- Taggart, J. B., Hynes, A., Podohl, P. A. and Ferguson, A., 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolate from salmonid fishes. Journal of fish Biology. 40: 963-965.
- Tổng cục thống kê, 2020. Tình hình kinh tế xã hội quý IV và năm 2019. <https://www.gso.gov.vn/default.aspx?tabid=621&ItemID=19454> (truy cập ngày 4/4/2020).
- Từ Thanh Dung, Freddy Haesebrouck, Nguyễn Anh Tuấn, Partrick Sorgeloos, Margo Baele và Annemie Decostere, 2010. Hiện trạng kháng thuốc kháng sinh trên vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan, thận mù trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở Đồng bằng sông Cửu long. Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ. 15A: 162-171.
- Vasudeva, R. Y., Das, B.K., Jyotirmayee, P., Chakrabarti, R., 2006. Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology. 20: 263-273.
- Zahir, A.A., Rahuman, A.A., Kamaraj, C., Bagavan, A., Elango, G., Sangaran, A., Kumar, B.S., 2009. Laboratory determination of efficacy of indigenous plant extracts for parasites control. Parasitology Research. 105: 453-461.