

DOI:10.22144/ctu.jsi.2018.051

ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC CHIẾT XUẤT TỪ LÁ ỒI (*Psidium guajava*) VÀ CỎ MỤC (*Eclipta alba*) LÊN SỰ ĐỀ KHÁNG BỆNH ĐỐM TRẮNG NỘI TẠNG Ở CÁ LÓC (*Channa striata*)

Lê Minh Khôi², Lê Nguyễn Thu Dung², Huỳnh Huy Cẩm Tú², Nguyễn Bảo Trung¹ và Từ Thanh Dung^{1*}

¹Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

²Sinh viên ngành Bệnh học Thủy sản Khóa 39, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Từ Thanh Dung (email: ttdung@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 17/05/2018

Ngày nhận bài sửa: 16/06/2018

Ngày duyệt đăng: 30/07/2018

Title:

The effect of extracts from guava (*Psidium guajava*) leaves and false daisy (*Eclipta alba*) against the internal white spot disease of snakehead (*Channa striata*)

Từ khóa:

Aeromonas schubertii, *Channa striata*, cỏ mục, lá ổi

Keywords:

Aeromonas schubertii, *Channa striata*, false daisy, guava leaves

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the antimicrobial activity and to find suitable concentration of false daisy (*Eclipta alba*) and guava (*Psidium guajava*) extracts against *Aeromonas schubertii* causing the internal white-spot disease in snakehead (*Channa striata*). The diameter of clear rings in the antimicrobial testing both extracts false daisy and guava leaves at the same concentration 250mg/mL, 125mg/mL, 62,5 mg/mL were showed 20,83±0,76 mm, 16,00±0,00 mm, 14,00±1,00 mm and 23,17±0,29 mm, 16,67±0,58 mm, 15,00±1,00 mm, respectively. Both herbal extracts were supplemented into two groups of snakehead feed at the same concentrations of 1, 5, 10 g/kg and continuously feeding for 45 days. The results of growth rate and FCR of the herbal supplement groups were significantly higher (at $p < 0,05$) than those of the controls. In the other hand, the total numbers of red blood cells and white blood cells of the fish after 2 and 7 days being challenged with *Aeromonas schubertii* were significantly higher than those of the controls (at $p < 0,05$). Besides, the accumulate mortality of fish with dietaries herbal supplement was significantly lower than that of the controls ($p < 0,05$). The results showed that the addition of extracts from false daisy at 5 g/kg feed or from guava leaves at a concentration of 1 g/kg feed stimulated fish growth, decreased mortality, and enhanced ability to against *A. schubertii* isolates.

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm xác định hoạt tính kháng khuẩn và nồng độ thích hợp của chất chiết xuất từ cỏ mục và lá ổi kháng lại vi khuẩn *Aeromonas schubertii* gây bệnh đốm trắng nội tạng trên cá lóc (*Channa striata*). Đường kính vòng vô trùng của thí nghiệm kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn hai chiết xuất cỏ mục và lá ổi ở cùng nồng độ 250mg/mL, 125mg/mL, 62,5 mg/mL được ghi nhận lần lượt là 20,83±0,76 mm, 16,00±0,00 mm, 14,00±1,00 mm và 23,17±0,29 mm, 16,67±0,58 mm, 15,00±1,00 mm. Hai nhóm cá lóc thí nghiệm được bổ sung vào thức ăn chất chiết xuất từ cỏ mục hoặc lá ổi với có cùng nồng độ 1, 5 và 10 g/kg thức ăn, cho ăn liên tục trong 45 ngày. Kết quả sự tăng trưởng và hệ số FCR (Feed Conversion Ratio) cao hơn so với nghiệm thức không bổ sung thảo dược ($p < 0,05$). Mật khác, chỉ tiêu số lượng tế bào hồng cầu, bạch cầu ở ngày thứ 2 và 7 sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *Aeromonas schubertii* phân lập, đều tăng đáng kể với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Tỷ lệ cá chết tích lũy khi cảm nhiễm ở các nghiệm thức bổ sung chiết xuất cỏ mục (30-40%) và lá ổi (30-36,67%) thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng không bổ sung chiết xuất ($p < 0,05$). Kết quả cho thấy, bổ sung chiết xuất lá ổi ở nồng độ 1 g/kg thức ăn hoặc cỏ mục ở nồng độ 5 g/kg thức ăn giúp kích thích sự tăng trưởng và tăng khả năng đề kháng của cá lóc chống lại vi khuẩn *A. schubertii*.

Trích dẫn: Lê Minh Khôi, Lê Nguyễn Thu Dung, Huỳnh Huy Cẩm Tú, Nguyễn Bảo Trung và Từ Thanh Dung, 2018. Ảnh hưởng của các chiết xuất từ lá ổi (*Psidium guajava*) và cỏ mục (*Eclipta alba*) lên sự đề kháng bệnh đốm trắng nội tạng ở cá lóc (*Channa striata*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(Số chuyên đề: Thủy sản)(2): 177-186.

1 GIỚI THIỆU

Nghề nuôi cá lóc (*Channa striata*) đã được hình thành và phát triển từ lâu ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long, với nhiều hình thức nuôi đa dạng như: nuôi kết hợp, thâm canh, bán thâm canh, nuôi trong ao, vèo ao, vèo sông, bể lót bạt, đem lại lợi nhuận cao (Đỗ Thị Thanh Hương và Ngô Tú Trinh, 2013; Le Xuan Sinh *et al.*, 2014). Tuy nhiên, để đạt được sản lượng và lợi nhuận cao nhất, mức độ thâm canh hóa càng được tăng lên, dẫn đến nhiều dịch bệnh phát sinh gây thiệt hại lớn cho nông dân (Phạm Thanh Hương và *ctv.*, 2011), nhiều loại thuốc kháng sinh đã được sử dụng nhằm giảm bớt thiệt hại do vi khuẩn gây ra trên cá nuôi (Cabello, 2006; Dung *et al.*, 2008). Kháng sinh được sử dụng trong thời gian dài và không đúng cách sẽ dẫn đến hiện tượng kháng thuốc làm giảm hiệu quả phòng và trị bệnh về sau (DePaola *et al.*, 1995). Hiện nay, việc sử dụng các chiết xuất thảo dược như một xu hướng trong công tác kiểm soát dịch bệnh trên cá. Sử dụng thảo dược sẽ hạn chế được sử dụng kháng sinh, giảm được sự kháng thuốc, tránh được sự tồn dư kháng sinh trong sản phẩm, tốt cho sức khỏe con người và giảm được rào cản trong xuất khẩu (Huỳnh Kim Diệu, 2010). Hơn nữa, các loại thảo dược còn thúc đẩy quá trình tăng trưởng. Bồ sung cỏ mực (*Eclipta alba*) giúp tăng khả năng đề kháng trên cá trê (*Clarias batrachus*) (Mishra and Gupta, 2017) và cá rô phi đen (*Oreochromis mossambicus*) (Christyapita *et al.*, 2007). Chiết xuất từ lá ổi (*Psidium guajava*) có thể kiểm soát bệnh do *A. hydrophila* gây bệnh trên cá trôi Ấn Độ (*Labeo rohita*) (Giri *et al.*, 2015), tăng kích thích miễn dịch và khả năng tăng trưởng cho cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) (Yin *et al.*, 2006). Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định nồng độ thích hợp của chiết xuất từ cỏ mực và lá ổi khi bổ sung vào thức ăn cho hiệu quả tốt nhất lên sự tăng trưởng, tỉ lệ sống (TLS) và khả năng đề kháng bệnh của cá lóc lên bệnh đốm trắng nội tạng.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương pháp chiết xuất và thử hoạt tính kháng khuẩn của lá ổi và cỏ mực

Mỗi loại thảo dược (cỏ mực và lá ổi) sau khi thu được rửa sạch, sấy khô ở 50°C, xay nhuyễn, thảo

được ngâm trong ethanol 96° với tỉ lệ 1:2 trong 7 ngày, lọc dịch chiết bằng giấy lọc và cô-quay loại bỏ ethanol, thu được cao chiết thô ở dạng sệt (Nguyễn Văn Đán và Nguyễn Việt Tựu, 1985).

Vi khuẩn *A. Schubertii* (đã được định danh và giải trình tự gen 16S rRNA từ nghiên cứu Dung *et al.*, 2018) được nuôi tăng sinh trong môi trường Brain Heart Infusion – Broth (BHIB) ở mật độ 10⁶ cfu/mL để kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn của các thảo dược từ lá ổi và cỏ mực bằng phương pháp khuếch tán qua giếng thạch. Sử dụng 50 µl dung dịch vi khuẩn trải đều trên môi trường Tryptic soy agar (TSA, Merck). Thảo dược được pha trong dung môi dimethyl sulfoxit (DMSO), giếng thạch có kích thước 6 mm được thêm vào 100 µl dịch chiết thảo dược với các nồng độ chiết xuất giảm dần từ 100% (250 mg/mL), 50% (125mg/mL), 25% (62,5 mg/mL) và giếng đối chứng sử dụng dung dịch NaCl 0,85% tiệt trùng, mỗi loại thảo dược được thực hiện lặp lại 3 lần. Kết quả được đọc sau 24 giờ, khả năng kháng khuẩn của vi khuẩn được xác định bằng độ lớn đường kính vòng kháng khuẩn xung quanh giếng thạch bao gồm đường kính giếng thạch (nếu không có sự xuất hiện của vòng vô trùng giá trị được tính tương đương với kích thước giếng thạch).

2.2 Thí nghiệm bổ sung chiết xuất thảo dược

Cá lóc sử dụng trong thí nghiệm có nguồn gốc ở An Giang, kích cỡ 10 ± 2 g/con được thuần trong điều kiện bể trong thời gian một tuần trước khi tiến hành thí nghiệm. Cá được kiểm tra kí sinh trùng và vi khuẩn trước khi tiến hành bố trí thí nghiệm với 2 loại thảo dược, 4 nghiệm thức mỗi loại thảo dược và 3 lần lặp lại được trình bày ở Bảng 1. Mỗi bể bố trí 50 cá/bể 250 L có sục khí, mực nước duy trì trong bể là 200 L, cá được thay nước mỗi ngày, thức ăn chứa 40% đạm, cho ăn theo nhu cầu 2 lần/ngày.

Sau 45 ngày cho ăn thức ăn có chiết xuất thảo dược, 3 mẫu máu cá lóc mỗi bể được tiến hành thu ngẫu nhiên để kiểm tra các chỉ tiêu huyết học, ghi nhận TLS, hệ số chuyển hóa thức ăn (FCR), khối lượng và chiều dài của cá trước khi gây cảm nhiễm cá thí nghiệm với vi khuẩn *A. schubertii*.

Bảng 1: Nồng độ thảo dược thêm vào của các nghiệm thức bố trí

Thảo dược	NT0	NT1	NT5	NT10
Lá ổi	0 g/kg thức ăn	1 g/kg thức ăn	5 g/kg thức ăn	10 g/kg thức ăn
Cỏ mực	0 g/kg thức ăn	1 g/kg thức ăn	5 g/kg thức ăn	10 g/kg thức ăn

Tăng trưởng của cá được xác định bằng cách cân khối lượng 30 con cá và đo chiều dài 30 con cá một cách ngẫu nhiên. Tăng trưởng khối lượng của cá được xác định bằng khối lượng trung bình của 30

con cá được cân ngẫu nhiên ban đầu. Tăng trưởng chiều dài cũng được xác định của 30 con cá được đo ngẫu nhiên sau khi kết thúc thí nghiệm trừ đi chiều dài đo ngẫu nhiên 30 con cá bố trí ban đầu.

Tiến hành đếm số lượng cá thả lúc đầu và số lượng cá thu hoạch được. Sau đó tính TLS bằng công thức:

$$TLS (\%) = 100 \times (\text{Số lượng cá thu hoạch (con)} / \text{Số lượng cá thả ban đầu (con)})$$

2.3 Thí nghiệm cảm nhiễm sau khi cho ăn thức ăn bổ sung thảo dược

Sau 45 ngày cho ăn thảo dược, tiến hành gây cảm nhiễm với vi khuẩn *A. schubertii* đã được xác định giá trị LD₅₀ = 2,53x10³ CFU/mL từ đề tài Dung *et al.* (2018). Vi khuẩn *A. schubertii* được phục hồi và nuôi tăng sinh trong môi trường BHIB, sau đó dung dịch này được ly tâm để rửa sạch vi khuẩn. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng máy so màu quang phổ, ở bước sóng 610 nm, sau đó pha loãng thành các nồng độ giảm dần. Mật độ vi khuẩn được kiểm tra bằng cách đếm số khuẩn lạc có trong 0,1 ml dung dịch trải đều trên đĩa Tryptic Soya Agar (TSA).

Thí nghiệm được bố trí 10 cá/bể gồm 4 nghiệm thức mỗi loại thảo dược NT0, NT1, NT5, NT10 với 3 lần lặp lại và nghiệm thức tiêm NaCl 0,85% tiệt trùng. Mỗi cá được tiêm 0,1 mL vi khuẩn nồng độ 10³ CFU/mL ở gốc vi bụng. Tiến hành thu các chỉ tiêu huyết học vào ngày thứ 2 và ngày thứ 7 sau khi cảm nhiễm. Trong 14 ngày cảm nhiễm ghi nhận dấu hiệu bệnh lý, tỉ lệ chết của cá.

2.4 Phân tích các chỉ tiêu huyết học

Mẫu máu của cá được thu để kiểm tra các chỉ

Bảng 2: Kích thước vòng vô trùng của hai loại chiết xuất thảo dược

NT	Đường kính vòng vô trùng (mm)			
	250mg/mL (100%)	125mg/mL (50%)	62,5 mg/mL (25%)	NaCl 0,85% (0%)
Cỏ mực	20,83±0,76	16,00±0,00	14,00±1,00	6,00±0,00
Lá ổi	23,17±0,29	16,67±0,58	15,00±1,00	6,00±0,00

Cả hai loại thảo dược có sự tương đồng về khả năng kháng khuẩn. Có thể thấy rằng khi nồng độ của thảo dược tăng lên thì sự đề kháng lại vi khuẩn *A. schubertii* càng lớn. Do thành phần của chiết xuất thảo dược thường chứa các chất oxy hóa mạnh như flavonoid, tannin, saponin, steroid (Prasad and Priyanka, 2011). Đặc biệt nhóm flavonoids (morin,

tiêu miễn dịch sau: Định lượng hồng cầu theo Natt and Herrick (1952); Định lượng tổng bạch cầu (TBC) và từng loại bạch cầu theo Hrubec *et al.* (2000).

2.5 Xử lý số liệu

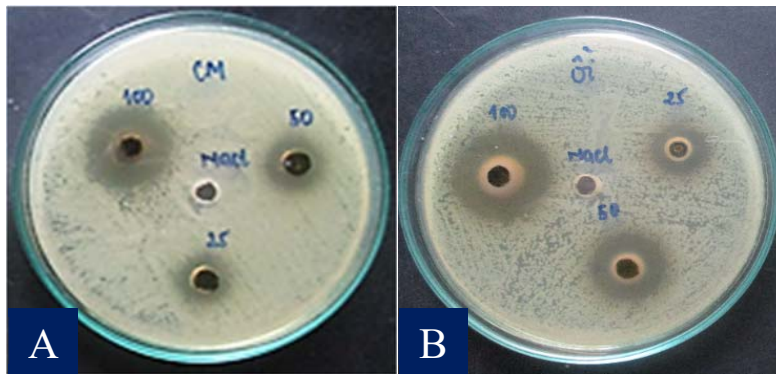
Các số liệu tốc độ tăng trưởng, tỉ lệ sống, tỉ lệ chết khi cảm nhiễm và các chỉ tiêu huyết học được nhập dữ liệu và xử lý phân tích ANOVA 1 nhân tố và phép thử Duncan ở mức ý nghĩa p<0,05 bằng chương trình SPSS 20.0.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Khảo sát tính kháng khuẩn của các chiết xuất thảo dược

Phương pháp khuếch tán qua giếng thạch để thử hoạt tính cho thấy dịch chiết cỏ mực có hoạt tính kháng khuẩn với vi khuẩn *A. schubertii*, vòng kháng khuẩn ở nồng độ 250 mg/mL với đường kính vòng kháng khuẩn là 20,83±0,76 mm và ở nồng độ 125 mg/mL đường kính vòng kháng khuẩn là 16,00±0,00 mm, nồng độ 62,5 mg/mL là 14,00±1,00 mm. Đối với chiết xuất lá ổi thì giá trị tương ứng với nồng độ dịch chiết 250 mg/mL, 125 mg/mL, 62,5 mg/mL lần lượt là 23,17±0,29 mm, 16,67±0,58 mm, 15,00±1,00 mm (Bảng 2). Kết quả tương đương với nghiên cứu của Huỳnh Kim Diệu (2010), khi thử hoạt tính kháng khuẩn của cỏ mực và lá ổi lên nhóm vi khuẩn *Aeromonas* trên cá tra với đường kính vòng kháng khuẩn là 11 mm và 17 mm.

morin-3-Olyxoside, morin-3-O-arabinoside, quercetin, quercetin-3-O-arabinoside) có khả năng đề kháng lại một số vi khuẩn gây bệnh phổ biến trên cá nước ngọt như *A. hydrophila*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Flavobacterium columnare*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus agalactiae* và *Vibrio salmonicida* (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2007).



Hình 1: Vòng kháng khuẩn của dịch chiết củ mực (A) và lá ổi (B) ở nồng độ 100%, 50% và 25% với vi khuẩn *A. schubertii*

3.2 Ảnh hưởng chiết xuất củ mực và lá ổi lên tỉ lệ sống và tăng trưởng cá lóc

Ảnh hưởng của củ mực

Nghiên cứu cho thấy sau 45 ngày thí nghiệm bổ sung thảo dược vào thức ăn của cá lóc, TLS của cá ở tất cả các nghiệm thức khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) và thấp nhất là 70,67% ở nghiệm thức đối chứng NT0, cao nhất là 84% ở NT10. Bảng

3 cho thấy các nghiệm thức cho ăn củ mực có tốc độ tăng trưởng, tăng trọng cao hơn so với đối chứng và khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$), ngoại trừ NT10. Nghiệm thức cho ăn củ mực cá tăng trọng và tăng trưởng cao nhất ở NT5, khác biệt có ý nghĩa so với 2 nghiệm thức còn lại. FCR cao nhất ở NT10 khác biệt có ý nghĩa so với NT5 và NT1. Trong nghiên cứu này, chế độ ăn có chứa chiết xuất củ mực 5g/kg thức ăn có tốc độ tăng trưởng, tăng trọng tốt nhất.

Bảng 3: Sự tăng trưởng sau 45 ngày cho ăn thức ăn có bổ sung chiết xuất củ mực

NT	W ₀ (g)	W _t (g)	WG (g/cá)	FCR	TLS (%)
NT0	8,22±1,47 ^a	22,32±0,59 ^a	14,10±0,33 ^a	2,13±0,04 ^c	70,67±3,06 ^a
NT1	8,39±1,24 ^a	23,81±0,16 ^b	15,29±0,98 ^b	1,59±0,03 ^a	80,67±11,02 ^a
NT5	8,38±1,30 ^a	24,21±0,83 ^b	15,83±0,29 ^b	1,63±0,04 ^a	77,33±6,11 ^a
NT10	8,52±1,10 ^a	21,76±0,69 ^a	13,24±0,49 ^a	1,91±0,08 ^b	84,00±3,46 ^a

Ghi chú: Giá trị thể hiện là số trung bình ± độ lệch chuẩn. Các giá trị trên cùng một cột có các chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). W₀ = Khối lượng đầu; W_t = Khối lượng sau; WG = tăng trọng.

Ảnh hưởng của lá ổi

Sau 45 ngày thí nghiệm, TLS của tất cả các nghiệm thức khác biệt không có ý nghĩa thống kê và thấp nhất là 70,67% ở nghiệm thức đối chứng. Nghiệm thức cho ăn lá ổi TLS cao nhất là 78,67% ở NT5, kế đến là NT10 (76%) và thấp nhất là 72% ở NT1. Kết quả cho thấy chiết xuất lá ổi ở nồng độ 5 g/kg thức ăn giúp cải thiện TLS tốt hơn. Bảng 4 cho thấy các nghiệm thức cho ăn chiết xuất lá ổi có tốc

độ tăng trọng, tăng trưởng cao hơn so với đối chứng và khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$), tăng trọng cao nhất là NT1, tiếp theo là NT5, NT10 và 3 nghiệm thức này khác biệt có ý nghĩa thống kê, tốc độ tăng trưởng cao nhất ở NT1 và khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại. Bổ sung chiết xuất lá ổi nồng độ 1 g/kg thức ăn giúp cá tăng trọng, tăng trưởng và chuyên hóa thức ăn tốt nhất so với ở nồng độ cao hơn.

Bảng 4: Tăng trưởng cá lóc sau 45 ngày cho ăn thức ăn có bổ sung chiết xuất lá ổi

NT	W ₀ (g)	W _t (g)	WG (g/cá)	FCR	TLS (%)
NT0	7,91±1,41 ^a	22,10±0,12 ^a	14,18±0,27 ^a	2,13±0,05 ^c	70,67±3,06 ^a
NT1	8,60±1,25 ^a	27,91±1,19 ^c	19,31±0,17 ^c	1,59±0,03 ^a	72,00±4,00 ^a
NT5	8,57±1,64 ^a	24,55±0,80 ^b	15,98±0,44 ^b	1,64±0,09 ^a	78,67±13,32 ^a
NT10	8,08±1,31 ^a	23,22±0,71 ^b	15,14±0,59 ^b	1,92±0,07 ^b	76,00±7,21 ^a

Ghi chú: Giá trị thể hiện là số trung bình ± độ lệch chuẩn. Các giá trị trên cùng một cột có các chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). W₀ = Khối lượng đầu; W_t = Khối lượng sau; WG = tăng trọng.

TLS ở cả hai nghiệm thức cho ăn chiết xuất từ lá ổi và củ mực gần tương đương với nhau (từ 70 – 80%). Yếu tố môi trường tác động, chất lượng nước

nuôi và chất lượng cá giống là các yếu tố ảnh hưởng nhiều nhất đến TLS của cá. Tuy nhiên, tỉ lệ này tương tự với các điều tra TLS của cá lóc ở ngoài ao

nuôi thương phẩm. Theo Huỳnh Văn Hiền và *ctv.* (2012) TLS giữa cá lóc nuôi bằng thức ăn viên và cá tạp có giá trị ghi nhận lần lượt là 75,6% và 74,8%. Nghiên cứu của Ngô Thị Minh Thúy và Lê Xuân Sinh (2015), cũng chỉ ra sự khác biệt lớn giữa TLS ở cá lóc nuôi trong ao (74,4%) và nuôi trong lồng bè (50,8%). Do đó có thể thấy các chiết xuất thảo dược không ảnh hưởng nhiều đến TLS của cá lóc nuôi nhưng lại tác động lớn đến khả năng tăng trưởng của cá thông qua chỉ số FCR và tăng trọng của cá khi so sánh giữa các nghiệm thức. Nhiều nghiên cứu khác cũng tương tự chứng minh nhiều loài cá tăng trưởng tốt hơn khi cho ăn thảo dược, khi bổ sung 0,5% dịch chiết lá ôi vào khẩu phần ăn của cá trôi giúp kích thích miễn dịch và tăng trưởng cao hơn so với đối chứng (Giri *et al.*, 2015). Nghiên cứu của Ferdous *et al.* (2017) bổ sung dịch chiết từ lá ôi với nồng độ 8% cho thấy tốc độ tăng trưởng trên cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) cao hơn so với bổ sung nồng độ 0%, 2%, 4%, và 6%.

3.3 Ảnh hưởng của chiết xuất cỏ mực và lá ôi lên hồng cầu của cá lóc

3.3.1 Ảnh hưởng của chiết xuất cỏ mực và lá ôi lên hồng cầu cá lóc sau 45 ngày cho ăn thảo dược

Hồng cầu có chức năng tham gia vào quá trình vận chuyển oxy và các thành phần trong tế bào máu

Bảng 5: Sự biến động của hồng cầu cá lóc cho ăn thảo dược trước và sau cảm nhiễm

Nghiệm thức	Cỏ mực (đv: x10 ⁶ tế bào/μl)			Lá ôi (đv: x10 ⁶ tế bào/μl)		
	45 ngày*	2 ngày**	7 ngày**	45*	2 ngày**	7 ngày**
NT0	3,35±0,04 ^a	2,44±0,03 ^a	3,30±0,02 ^a	3,43±0,06 ^a	2,64±0,07 ^a	3,30±0,02 ^a
NT1	3,46±0,01 ^b	2,74±0,04 ^b	3,43±0,04 ^b	3,93±0,06 ^b	3,41±0,06 ^b	3,50±0,01 ^b
NT5	3,68±0,03 ^c	2,95±0,03 ^c	3,54±0,03 ^c	3,97±0,06 ^b	3,50±0,06 ^b	3,60±0,02 ^c
NT10	3,67±0,04 ^c	2,96±0,02 ^c	3,48±0,02 ^b	4,10±0,10 ^c	3,64±0,03 ^c	3,64±0,03 ^c

Ghi chú: *: trước cảm nhiễm; **: sau cảm nhiễm; giá trị thể hiện là số trung bình ± độ lệch chuẩn. Các giá trị trên cùng một cột có các chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p<0,05)

3.3.2 Ảnh hưởng của chiết xuất cỏ mực và lá ôi lên hồng cầu cá lóc sau 2 và 7 cảm nhiễm

Bảng 5 cho thấy sau 2 ngày cảm nhiễm mật độ hồng cầu ở các nghiệm thức cho ăn cỏ mực cao hơn nghiệm thức đối chứng nhưng giảm so với trước cảm nhiễm, tỉ lệ giảm cao nhất ở NT0 (27,16%), thấp nhất ở NT10 (19,39%) khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại. Đối với nghiệm thức cho ăn chiết xuất từ lá ôi, sau 2 ngày cảm nhiễm, mật độ hồng cầu ở các nghiệm thức giảm so với trước khi cảm nhiễm, tương tự như với nghiệm thức cho ăn chiết xuất cỏ mực, tỉ lệ giảm cao nhất là 24,28% ở NT0 và tỉ lệ giảm thấp nhất ở NT10 (11,22%), khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại.

Ở cả hai nghiệm thức cho ăn thảo dược, sau 7 ngày cảm nhiễm, tế bào hồng cầu có dấu hiệu hồi

đến các cơ quan và các tế bào, tuy không tham gia vào quá trình đáp ứng miễn dịch nhưng cũng góp phần gián tiếp ảnh hưởng đến hệ miễn dịch của tôm, cá. Kết quả định lượng hồng cầu ở Bảng 5 cho thấy mật độ hồng cầu sau 45 ngày ở nghiệm thức cho ăn chiết xuất cỏ mực đều tăng cao so với nghiệm thức đối chứng, ở các nghiệm thức cho ăn cỏ mực cao nhất ở NT5 khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại (p<0,05). Việc ảnh hưởng của thảo dược đến hồng cầu cá đã được ghi nhận trước đây qua nghiên cứu của Farahi *et al.* (2010), hồng cầu của cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*) tăng cao khi cá ăn thức ăn bổ sung tới 30 g/kg trong 2 tháng và khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng (p<0,05).

Sau 45 ngày thí nghiệm, số lượng hồng cầu ở các nghiệm thức cho ăn chiết xuất lá ôi cao hơn so với không cho ăn và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Khác với cỏ mực, ở nghiệm thức NT10 cho ăn lá ôi, số lượng hồng cầu cao nhất, tuy nhiên sự khác biệt không lớn so với hai nghiệm thức cho ăn lá ôi còn lại. Kết quả này tương tự với nghiên cứu Fawole *et al.* (2015), khi bổ sung chiết xuất lá ôi với nồng độ 0,5%, 1% vào khẩu phần ăn của *Labeo rohita* sau 35 ngày thì mật độ hồng cầu cao hơn so với đối chứng và khác biệt có ý nghĩa.

phục và tăng lên đáng kể so với sau 2 ngày cảm nhiễm nhưng vẫn còn thấp hơn so với trước khi cảm nhiễm, thấp nhất là NT0 và so với các nghiệm thức cho ăn các nghiệm thức này khác biệt có ý nghĩa. Sự giảm của hồng cầu sau khi cảm nhiễm là điều hiển nhiên do sự tác động của vi khuẩn *A. Schubertii* có khả năng gây tan huyết. Trần Thị Yến Nhi và Đặng Thị Hoàng Oanh (2010) cũng ghi nhận có sự giảm đáng kể số lượng hồng cầu sau cảm nhiễm *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh mũ gan trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*), ở nghiệm thức không cho ăn hoàng kỳ (*Astragalus radix*) giảm 22,8% còn ở nghiệm thức cho ăn hoàng kỳ chỉ giảm 12,4%.

Kết quả nghiên cứu cho thấy việc bổ sung cỏ mực 5g/kg thức ăn và 10g/kg thức ăn có tác dụng tương tự nhau, kích thích và làm tăng số lượng tế bào hồng cầu. Đối với chiết xuất lá ôi, bổ sung ở

mức 10g/kg thức ăn cho kết quả tốt nhất đối với chỉ tiêu hồng cầu.

3.4 Ảnh hưởng của chiết xuất cỏ mực và lá ổi lên bạch cầu cá lóc

3.4.1 Ảnh hưởng của chiết xuất cỏ mực và lá ổi lên bạch cầu cá lóc sau 45 ngày cho ăn thảo dược

Kết quả phân tích bạch cầu sau 45 ngày, ở cả hai loại chiết xuất thảo dược cỏ mực và lá ổi mật độ TBC, tế bào bạch cầu đơn nhân (BCĐN), bạch cầu trung tính (BCTT), lympho, tiểu cầu của cá cho ăn cỏ mực đều tăng có ý nghĩa thống kê so với cá không cho ăn ($p < 0,05$).

Bảng 6: Sự biến đổi số lượng các loại bạch cầu sau 45 ngày thí nghiệm ở nghiệm thức cho ăn chiết xuất cỏ mực

NT	Mật độ bạch cầu x 10 ³ tế bào/ μ L				
	Tổng bạch cầu	Bạch cầu đơn nhân	Bạch cầu trung tính	Lympho	Tiểu cầu
NT0	68,58±0,11 ^a	0,82±0,01 ^a	35,02±0,07 ^a	11,78±0,02 ^a	20,93±0,01 ^a
NT1	87,27±0,08 ^b	0,97±0,05 ^a	37,15±0,03 ^b	24,03±0,20 ^d	26,18±0,01 ^c
NT5	89,47±0,05 ^c	2,01±0,25 ^b	43,08±0,03 ^c	14,38±0,05 ^b	30,03±0,03 ^d
NT10	102,83±0,16 ^d	2,65±0,03 ^c	58,50±0,08 ^d	17,35±0,07 ^c	25,08±0,04 ^b

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

Ảnh hưởng của cỏ mực

Theo Bảng 6, mật độ tổng bạch cầu cao nhất ở NT10, khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức cho ăn khác ($p < 0,05$). Các nghiệm thức NT1 và NT5 cũng có sự tăng đáng kể về mật độ bạch cầu so với NT0. Tại Ấn Độ, nghiên cứu của Mishra and Gupta (2017) đã cho thấy khi bổ sung chiết xuất cỏ mực vào thức ăn với nồng độ 10 ppm và 20 ppm trong 28 ngày thì số lượng tổng bạch cầu của cá trê (*Clarias batrachus*) cao hơn so với đối chứng.

Ở nghiệm thức cho ăn cỏ mực, mật độ BCĐN

tăng cao hơn so với nghiệm thức đối chứng, trong đó cao nhất ở NT10, khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức khác ($p < 0,05$). Mật độ BCTT cũng tăng cao nhất ở NT10, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). BCTT có chức năng thực bào các vật thể lạ. Ở những nơi bị viêm, BCTT tập trung rất nhiều, tại đó chúng sẽ tiêu diệt vi trùng và các mảnh vụn tế bào (Hrubec, 2000). Nghiệm thức cho ăn cỏ mực mật độ lympho tăng so với nghiệm thức đối chứng, trong đó mật độ tế bào lympho cao nhất ở NT1. Ở nghiệm thức cho ăn cỏ mực, mật độ tiểu cầu cao nhất ở NT5, khác biệt có ý nghĩa với các nghiệm thức khác sau 45 ngày cho ăn.

Bảng 7: Sự biến động số lượng các loại bạch cầu sau 45 ngày thí nghiệm ở nghiệm thức cho ăn chiết xuất lá ổi

NT	Mật độ bạch cầu x 10 ³ tế bào/ μ L				
	Tổng bạch cầu	Bạch cầu đơn nhân	Bạch cầu trung tính	Lympho	Tiểu cầu
NT0	65,27±0,02 ^a	0,62±0,03 ^a	24,23±0,03 ^a	15,76±0,01 ^a	24,63±0,03 ^a
NT1	78,57±0,04 ^b	0,75±0,01 ^a	28,93±0,01 ^c	21,00±0,01 ^b	27,93±0,03 ^c
NT5	82,13±0,04 ^c	0,83±0,21 ^a	30,27±0,04 ^d	21,43±0,01 ^c	29,53±0,01 ^d
NT10	83,83±0,04 ^d	0,76±0,01 ^a	27,63±0,03 ^b	30,17±0,01 ^d	25,23±0,03 ^b

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

Ảnh hưởng của lá ổi

Ở nghiệm thức cho ăn lá ổi, mật độ TBC cao nhất ở NT10, kể đến NT5, NT1 và 3 nghiệm thức này khác biệt có ý nghĩa với nhau (Bảng 7), tuy nhiên giá trị giữa các nghiệm thức cho ăn chênh lệch không cao. So sánh giữa các nghiệm thức cho ăn với NT0, mật độ bạch cầu chênh lệch ở tất cả các chỉ tiêu. Qua đó cho thấy, thức ăn có bổ sung chiết xuất lá ổi giúp ức chế vi khuẩn gây bệnh và tăng sức đề kháng cho cá. Kết quả cho thấy bổ sung chiết xuất lá ổi ở cả 3 nồng độ đều kích thích và làm gia tăng hoạt động của BCĐN nhưng không nhiều và không

có sự khác biệt khi so sánh. Đối với mật độ BCTT cao nhất là NT5, tiếp theo là NT1, NT10 và 3 nghiệm thức khác biệt có ý nghĩa thống kê. Mật độ lympho cao nhất ở NT10, khác biệt có ý nghĩa so với NT5, NT1 và 3 nghiệm thức này khác biệt có ý nghĩa thống kê. Mật độ tiểu cầu ở nghiệm thức cho ăn chiết xuất lá ổi cao nhất là NT5, kế tiếp NT1, NT10 và các nghiệm thức này khác biệt có ý nghĩa.

Nhìn chung, cả hai loại thảo dược được bổ sung vào thức ăn của cá đều giúp cá tăng mạnh về mật độ TBC và các loại tế bào bạch cầu so với nghiệm thức không có bổ sung thảo dược. Kết quả này phù hợp

với nghiên cứu của Christyapita *et al.* (2007) khi bổ sung chiết xuất từ cỏ mực với nồng độ 0,01, 0,1, và 1% trong 1, 2 và 3 tuần giúp tăng các thông số miễn dịch không đặc hiệu trên cá rô phi đen (*Oreochromis mossambicus*). Đối với nghiên cứu của Nobahar *et al.* (2014), khi bổ sung 1% tỏi vào thức ăn cho cá tầm Beluga (*Huso huso*), sau 20 ngày, số lượng tế bào lympho tăng cao hơn so với nghiệm thức đối chứng và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Như vậy, khi bổ sung chiết xuất cỏ mực ở nồng độ 10 g/kg, thức ăn có tác dụng tốt nhất để duy

trì lượng bạch cầu trong cơ thể cá. Nghiệm thức cho ăn chiết xuất lá ôi ở cả ba nồng độ 1, 5 và 10 g/kg đều giúp kích thích và làm gia tăng hoạt động của TBC, BCTT, BCĐN, lympho và tiểu cầu.

3.4.2 Ảnh hưởng của chiết xuất cỏ mực và lá ôi lên bạch cầu cá lóc sau cảm nhiễm

Mật số của bạch cầu thể hiện cho khả năng bảo vệ của hệ miễn dịch ở cơ thể cá. Khả năng đề kháng bệnh của các chiết xuất thảo dược đều thể hiện rõ nhất khi có mầm bệnh lây nhiễm đến cá. Cụ thể:

Bảng 8: Biến động của tổng bạch cầu cá lóc cho ăn thảo dược sau khi gây cảm nhiễm

Nghiệm thức	Cỏ mực (đv: $\times 10^3$ tế bào/ μ l)			Lá ôi (đv: $\times 10^3$ tế bào/ μ l)		
	45 ngày*	2 ngày**	7 ngày**	45**	2 ngày**	7 ngày**
NT0	68,58 \pm 0,11 ^a	57,90 \pm 0,14 ^a	46,13 \pm 0,1 ^a	65,27 \pm 0,02 ^a	51,80 \pm 0,10 ^a	54,00 \pm 0,12 ^a
NT1	87,27 \pm 0,08 ^b	71,43 \pm 0,08 ^b	60,93 \pm 0,03 ^b	78,57 \pm 0,04 ^b	92,03 \pm 0,07 ^d	91,83 \pm 0,07 ^b
NT5	89,47 \pm 0,05 ^c	80,60 \pm 0,08 ^c	67,40 \pm 0,12 ^c	82,13 \pm 0,04 ^c	77,20 \pm 0,04 ^c	94,37 \pm 0,15 ^b
NT10	102,83 \pm 0,16 ^d	81,27 \pm 0,12 ^c	67,67 \pm 0,2 ^c	83,83 \pm 0,04 ^d	70,03 \pm 0,01 ^b	94,90 \pm 0,27 ^b

Ghi chú: *: trước cảm nhiễm; **: sau cảm nhiễm; giá trị thể hiện là số trung bình \pm độ lệch chuẩn. Các giá trị trên cùng một cột có các chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Ảnh hưởng của cỏ mực

Chỉ tiêu TBC quan sát Bảng 8 ở thời điểm 2 và 7 ngày cảm nhiễm mật độ TBC ở các nghiệm thức giảm đáng kể so với trước khi cảm nhiễm và các nghiệm thức cho ăn cỏ mực cao hơn có ý nghĩa so với không cho ăn (NT0). Tương tự với các chỉ tiêu BCĐN, BCTT, lympho, tiểu cầu, sau 2 ngày cảm nhiễm, mật độ của các nghiệm thức cho ăn chiết xuất cỏ mực (NT1, NT5, NT10) đều khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng (Bảng 9). Mật độ BCĐN cao nhất ở NT1, tiểu cầu cao nhất ở NT10. Đặc biệt, BCTT, lympho tăng cao nhất ở NT5. Sau 7 ngày cảm nhiễm thì mật độ BCĐN, BCTT, lympho, tiểu cầu ở các nghiệm thức bổ sung cỏ mực

tăng cao và khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng (NT0). Mật độ BCĐN ở NT1 tăng cao nhất so với các nghiệm thức khác và khác biệt có ý nghĩa thống kê. Kết quả cho thấy mật độ BCTT ở NT1 tăng cao nhất và khác biệt với các nghiệm thức còn lại. Mật độ tế bào lympho ở NT5 cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức khác. Ở nghiệm thức cho ăn cỏ mực, tiểu cầu cao nhất ở NT10, khác biệt so với các nghiệm thức cho ăn khác. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Aly and Mahamed (2010) khi cho cá rô phi ăn thức ăn chứa 3% tỏi và 1 ppt *Echinacea*, mật độ bạch cầu trung tính và tế bào lympho tăng lên và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng.

Bảng 9: Ảnh hưởng của cỏ mực lên các loại bạch cầu sau cảm nhiễm

NT	Mật độ bạch cầu $\times 10^3$ tế bào/ μ l							
	Bạch cầu đơn nhân		Bạch cầu trung tính		Lympho		Tiểu cầu	
	Ngày 2	Ngày 7	Ngày 2	Ngày 7	Ngày 2	Ngày 7	Ngày 2	Ngày 7
NT0	5,31 \pm 0,44 ^a	3,18 \pm 0,04 ^a	14,57 \pm 0,36 ^a	11,87 \pm 0,72 ^a	19,63 \pm 0,53 ^a	12,33 \pm 0,05 ^a	14,43 \pm 0,01 ^a	12,97 \pm 0,06 ^a
NT1	9,18 \pm 0,15 ^b	5,58 \pm 0,08 ^c	16,17 \pm 0,11 ^b	19,1 \pm 0,92 ^d	23,53 \pm 0,1 ^a	23,87 \pm 0,07 ^c	17 \pm 0,26 ^a	19 \pm 0,21 ^b
NT5	5,84 \pm 0,31 ^a	4 \pm 0,04 ^b	21,3 \pm 0,26 ^c	15 \pm 0,85 ^b	33,3 \pm 0,69 ^b	26,83 \pm 0,06 ^d	14,2 \pm 0,16 ^a	28,1 \pm 0,23 ^c
NT10	8,51 \pm 0,15 ^b	3,85 \pm 0,16 ^b	15,37 \pm 0,07 ^{ab}	18,4 \pm 0,3 ^c	30,97 \pm 0,08 ^b	20,43 \pm 0,2 ^b	21,73 \pm 0,23 ^b	32,17 \pm 0,1 ^d

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

Ảnh hưởng của lá ôi

Sau 2 ngày cảm nhiễm, mật độ TBC ở các nghiệm thức giảm so với trước khi cảm nhiễm, ngoại trừ NT1 có xu hướng tăng. Ở các nghiệm thức cho ăn lá ôi, mật độ TBC cao hơn có ý nghĩa so với không cho ăn, mật độ TBC cao nhất là NT1, khác biệt có ý nghĩa so với NT5, NT10. Sau 7 ngày cảm nhiễm, mật độ TBC có xu hướng tăng so với 2 ngày

cảm nhiễm trừ NT1 và trước khi cảm nhiễm trừ NT0, mật độ TBC cao nhất ở NT10, kể đến NT5, NT1 và các nghiệm thức này khác biệt có ý nghĩa so với NT0 (Bảng 8). Kết quả này tương tự kết quả của Trần Thị Yến Nhi và Đặng Thị Hoàng Oanh (2010), số lượng TBC ở các nghiệm thức gây cảm nhiễm đều giảm so với các nghiệm thức không gây cảm nhiễm. Mật độ bạch cầu trong máu tăng trở lại là do cơ chế chống lại mầm bệnh xâm nhập của vật chủ.

Bảng 10: Ảnh hưởng của lá ổi lên các loại bạch cầu sau cảm nhiễm

NT	Mật độ bạch cầu x 10 ³ tế bào/ μ l							
	Bạch cầu đơn nhân		Bạch cầu trung tính		Lympho		Tiểu cầu	
	Ngày 2	Ngày 7	Ngày 2	Ngày 7	Ngày 2	Ngày 7	Ngày 2	Ngày 7
NT0	2,54±0,05 ^a	0,52±0,01 ^a	14,80±0,02 ^a	18,70±0,07 ^a	15,23±0,03 ^a	17,40±0,05 ^a	19,27±0,04 ^a	17,33±0,03 ^a
NT1	3,99±0,07 ^c	1,74±0,23 ^b	18,63±0,04 ^b	19,90±0,08 ^b	36,20±0,04 ^c	44,50±0,04 ^d	33,27±0,03 ^b	25,67±0,01 ^b
NT5	4,86±0,14 ^d	1,67±0,28 ^b	16,23±0,02 ^a	25,00±0,03 ^d	35,00±0,01 ^c	27,73±0,04 ^b	20,97±0,03 ^a	40,00±0,06 ^c
NT10	2,95±0,06 ^b	2,87±0,34 ^c	20,27±0,16 ^c	21,47±0,07 ^c	27,10±0,19 ^b	28,87±0,08 ^c	19,70±0,36 ^a	41,70±0,11 ^d

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

Nhìn chung, các nghiệm thức cho ăn lá ổi ở các nồng độ khác nhau đều có mật độ bạch cầu cao hơn so với nghiệm thức đối chứng ở tất cả các giai đoạn (Bảng 10). Sau 2 ngày cảm nhiễm, mật độ BCTT, tiểu cầu lympho đều giảm so với trước khi cảm nhiễm trong khi đó BCĐN tăng lên đáng kể, cao nhất ở NT5. Tuy nhiên, mật độ BCĐN giảm sau 7 ngày cảm nhiễm ở tất cả nghiệm thức.

Kết quả huyết học giữa hai nghiệm thức cho ăn thảo dược khá giống nhau khi đều có sự tăng mạnh của BCĐN ở ngày thứ hai và giảm sau ngày thứ 7. Vì vậy, sự gia tăng số lượng BCĐN trong 24 giờ và đại thực bào trong vòng 3 ngày có vai trò quan trọng trong việc hình thành hàng rào bảo vệ chống lại các tác nhân gây bệnh. Theo Hibiya (1982), khi thân bị hoại tử, đồng thời mô tạo máu bị phá hủy, lượng máu trong cơ thể giảm do không có máu thay thế. Sự hoại tử ở tỷ tạng cũng làm mất chức năng tạo hồng cầu mới và phá hủy hồng cầu già cũng như không thể sản xuất các tế bào lympho và bạch cầu để bảo vệ cơ thể chống lại vi khuẩn. Do đó, đây chính là nguyên nhân làm cho số lượng hồng cầu, bạch cầu của cá sau 2 ngày cảm nhiễm giảm.

Hiện tượng giảm hồng cầu, bạch cầu chỉ tồn tại một thời gian, nếu hệ thống miễn dịch của cá chống lại được với mầm bệnh thì cơ thể sẽ dần phục hồi, điều này giải thích cho số lượng hồng cầu, bạch cầu tăng sau 7 ngày cảm nhiễm. Sau 7 ngày cảm nhiễm, mật độ hồng cầu, BCTT, lympho có xu hướng tăng so với sau 2 ngày cảm nhiễm nhưng có dấu hiệu tăng chậm hơn so với nghiệm thức cho ăn cỏ mực. Theo Giri *et al.* (2015), bổ sung chiết xuất lá ổi ở nồng độ 0,5% làm tăng hoạt động thực bào, trong khi nồng độ cao hơn giảm lysozyme, ACP và hoạt động thực bào, kết quả này cho thấy chiết xuất lá ổi sử dụng nồng độ cao trong thời gian dài có thể ức chế miễn dịch của cá. Do vậy, khi bổ sung lá ổi, không được

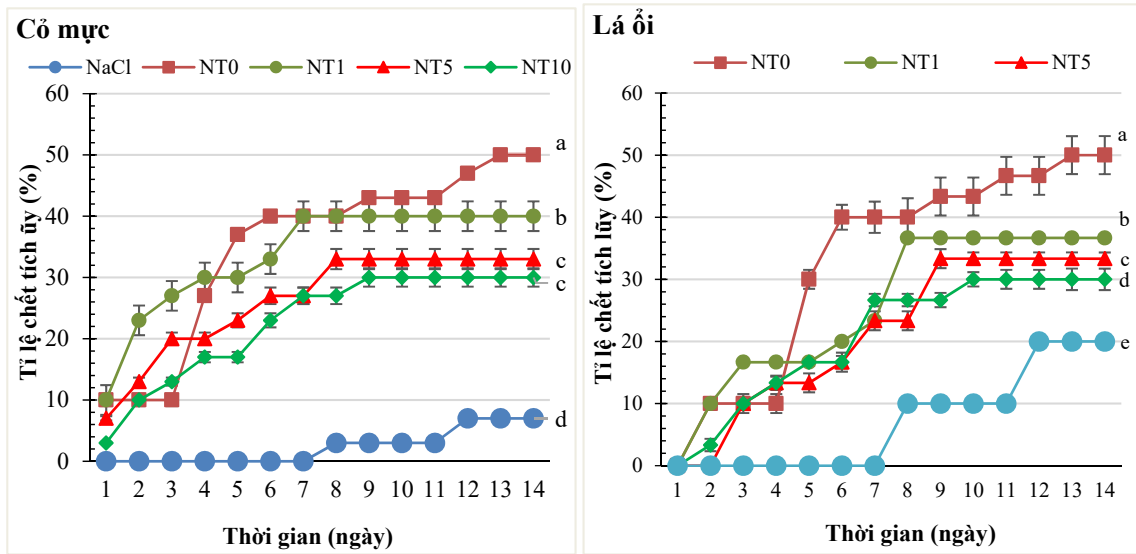
sử dụng liều quá cao dẫn đến lượng bạch cầu trong hệ miễn dịch của cá bị suy giảm.

Có thể kết luận, chỉ số bạch cầu tổng sau cảm nhiễm ở nghiệm thức cho ăn cỏ mực không có sự khác biệt lớn giữa các giá trị cho ăn 1, 5 hay 10 g/kg thức ăn, nhưng đối với chỉ số của BCTT và lympho thì có sự vượt trội ở nghiệm thức 5 g/kg thức ăn. Ở nghiệm thức cho ăn chiết xuất lá ổi, mật độ TBC, BCTT và lympho có sự khác biệt lớn ở NT1 (bổ sung 1 g/kg thức ăn).

3.5 Tỷ lệ cá chết sau khi gây cảm nhiễm

Ảnh hưởng của cỏ mực

Cá lóc giống được cho ăn thức ăn có bổ sung chất chiết xuất cỏ mực với hàm lượng khác nhau, đem gây cảm nhiễm *A. schubertii* trong 14 ngày, các nghiệm thức tiêm vi khuẩn đều có cá chết, ở nghiệm thức tiêm NaCl 0,85%, tỉ lệ chết (TLC) là 7% nhưng thời gian cá bắt đầu chết vào ngày thứ 7 không phải do thao tác tiêm. Ở nghiệm thức không cho ăn chiết xuất cỏ mực cá chết với tỉ lệ cao 50%. Tỉ lệ chết giảm dần với cá sử dụng chiết xuất cỏ mực tăng dần. Ở nghiệm thức cho ăn cỏ mực TLC cao nhất là 40% ở NT1, kế tiếp NT5 là 33%, thấp nhất 30% ở NT10, các nghiệm thức này khác biệt đều có ý nghĩa ($p < 0,05$). Nhìn chung, ở các nghiệm thức cá chết từ ngày thứ 2 đến ngày thứ 9, sau ngày thứ 9, hầu như cá không còn chết. Kết quả tương tự với nghiên cứu của Christyapita *et al.* (2007), khi gây cảm nhiễm, cá rô phi đen (*Oreochromis mossambicus*) được bổ sung chiết xuất cỏ mực với *A. Hydrophila*, ở nồng độ 1%, có TLS 64, 75 và 32% tương ứng với 1, 2 và 3 tuần cao hơn so với các liều khác. Nya and Austin (2010) nghiên cứu sự đề kháng của cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*) khi cảm nhiễm với vi khuẩn *A. hydrophila*, kết quả cho thấy ở hai nghiệm thức bổ sung và không bổ sung tỏi vào thức ăn trong 14 ngày tỉ lệ sống của cá lần lượt là 88% so với 16%.



Hình 2: Tỷ lệ chết của cá lóc cho ăn cỏ mực và lá ổi sau khi gây cảm nhiễm

Các chữ cái (a, b, c, d, e) trên hình thể hiện cho các giá trị khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Ảnh hưởng của lá ổi

Qua quá trình cảm nhiễm *A. Schubertii*, các nghiệm thức tiêm vi khuẩn đều có cá chết, nghiệm thức tiêm NaCl 0,85% có tỉ lệ chết 20% nhưng thời gian cá bắt đầu chết vào ngày thứ 7 chứng tỏ do ảnh hưởng từ môi trường không phải do thao tác tiêm. Tỉ lệ chết cao nhất là 50% ở nghiệm thức không cho ăn thảo dược và giảm dần ở các nghiệm thức cho ăn lá ổi theo nồng độ tăng dần, TLC thấp nhất là 30% ở NT10, tiếp theo NT5 (33,33%) và NT1 (36,67%), các nghiệm thức này khác biệt đều có ý nghĩa với nhau ($p < 0,05$). Theo Giri *et al.* (2015) khi bổ sung chiết xuất lá ổi ở nồng độ 5%, TLS cao nhất của *Labeo rohita* là 66,66% sau khi cảm nhiễm *A. hydrophila*. Như vậy, thức ăn có bổ sung chiết xuất cỏ mực và lá ổi đều giúp tăng các thông số miễn dịch không đặc hiệu của cá lóc làm giảm tỉ lệ tử vong do *A. schubertii* gây ra.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất cỏ mực và lá ổi mạnh nhất là ở nồng độ 250 mg/mL với đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt là $20,83 \pm 0,76$ mm và $23,17 \pm 0,29$ mm.

Bổ sung chiết xuất cỏ mực ở mức 5 g/kg và lá ổi 1 g/kg thức ăn, giúp kích thích sự tăng trưởng, gia tăng mật độ hồng cầu và bạch cầu, khả năng đề kháng bệnh của cá được nâng cao làm giảm tỉ lệ tử vong của cá lóc khi nhiễm vi khuẩn *A. schubertii*.

4.2 Đề xuất

Nghiên cứu xác định thành phần hoạt chất trong các hợp chất chiết xuất lá ổi và cỏ mực

Nghiên cứu xác định nồng độ ức chế tối thiểu của các hợp chất chiết từ lá ổi và cỏ mực đối với vi khuẩn *A. schubertii* gây bệnh trên cá lóc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aly, S.M. and Mahamed, 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.

Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for environment. *Environment of Microbiology*. 8(7): 1137-1144.

Christyapita, D., Divyagnaneswari, M. and Michael, R.D., 2007. Oral administration of Eclipta alba leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and diseases of *Oreochromis mossambicus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 23(4): 840-852.

DePaola, A., Peeler, J.T. and Rodrick, G.E., 1995. Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of gram-negative bacteria in catfish ponds. *Applied Environmental Microbiology*. 61(6): 2335- 2340.

Đỗ Thị Thanh Hương và Ngô Tú Trinh, 2013. Ảnh hưởng của độ mặn lên điều hòa áp suất thẩm thấu và tăng trưởng của cá lóc (*Channa striata*). *Tạp chí khoa học Đại học Cần thơ*. 25b: 247-254.

Dung, T.T., Heasebrouck, F., Tuan, N.A., Sorgeloos, P., Baele, M. and Decostere, A., 2008. Antimicrobial susceptibility pattenrn of

- Edwardsiella ictaluri isolates from natural outbreaks of Bacillary Necrosis of Pangasianodon hypophthalmus in Vietnam. *Microbial Drug Resistance*. 14(4): 311-316.
- Dung, T.T., Trung, N.B., Khoi, L.M., Chau, D.T.M., Cheng, C.J., Quach, B.L. and Hu, H., 2018. Identification and characteristics of agent causing internal white spot disease in snakehead fish *Channa striata* in commercial farm at the Mekong Delta, Vietnam. *Asian-Pacific Aquaculture*. 24-26.
- Farahi, A., Kasiri, M., Sudagar, M., Iraei, M.S. and Shahkolaei, M.D., 2010. Effect of garlic (*Allium sativum*) on growth factors, some hematological parameters and body compositions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of the Bioflux Society*. 3(4): 317-323.
- Fawole, J.F., Sahu, P.N., Pal, K. A. and Ravindran, A., 2015. Haemato-immunological response of *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings fed leaf extracts and challenged by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*. 47(12): 3788-3799.
- 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.C. and Sukumaran, V., 2015. Effect of guava leaves on the growth performance and cytokine gene expression of *Labeo rohita* and its susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish Shellfish Immunol*. 46(2): 217-224.
- Hibiya, T., 1982. An atlas of fish histology: normal and pathological features. Kodansha. Michigan. 195 pages.
- Hrubec, T.C., Cardinale, J.L. and Smith, S.A., 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Vet Clin Pathol*. 29(1): 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 Trường Đại học Cần Thơ*. 15b: 222-229.
- Huỳnh Văn Hiền, Nguyễn Hoàng Huy và Nguyễn Thị Minh Thúy, 2012. So sánh hiệu quả kinh tế - kỹ thuật giữa sử dụng thức ăn cá tạp và thức ăn viên cho nuôi cá lóc (*Channa striata*) thương phẩm trong ao tại An Giang và Đồng Tháp. *Kỷ yếu Hội nghị khoa học thủy sản*. 480-487.
- Sinh, L.X., Navy, H. and Pomeroy, R.S., 2014. Value chain of snakehead fish in the Lower Mekong Basin of Cambodia and Vietnam. *Aquaculture Economics & Management*. 18(1): 76-96.
- Mishra, P. and Gupta, S., 2017. Comparative effect of *Eclipta alba* on hematological parameters of catfish, *Clarias batrachus*. *Indian J.Sci.Res*. 12(2): 99-106.
- Natt, M.P. and Herrick, C.A., 1952. A New Blood Diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. 31(4): 735-738.
- Ngô Thị Minh Thúy và Lê Xuân Sinh, 2015. So sánh kết quả sử dụng thức ăn cho nuôi cá lóc (*Channa striatus*) và sự chấp nhận của người nuôi ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 38(1): 66-72.
- Nguyễn Văn Đàn và Nguyễn Việt Tựu, 1985. *Phương pháp nghiên cứu hóa học cây thuốc*. NXB Y học. Hồ Chí Minh. 461 trang.
- Nobahar, Z., Gholipour-Kanani, H., Kakoolaki, S. and Jafaryan, H., 2014. Effect of garlic (*Allium sativum*) and nettle (*Urtica dioica*) on growth performance and hematological parameters of beluga (*Huso huso*). *Iranian Journal of Aquatic Animal Health*. 1(1): 63-69.
- Nya, E. J., Dawood, Z. and Austin, B., 2010. The garlic component, allicin, prevents disease caused by *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*. 33(4): 293-300.
- Phạm Thanh Hương, Nguyễn Thiện Nam, Từ Thanh Dung và Nguyễn Anh Tuấn, 2011. Sự kháng kháng sinh của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila* gây bệnh trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Kỷ yếu Hội nghị khoa học thủy sản, ngày 26 tháng 1 năm 2011, Cần Thơ*. Nhà xuất bản Nông nghiệp. Hồ Chí Minh. 250-261.
- Prasad, G. and Priyanka, G.L., 2011. Effect of fruit rind extract of *Garcinia gummi-gatta* on haematology and plasma biochemistry of catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. *Asian Journal of Biochemistry*. 6(3): 240-251.
- Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P., 2007. Bacteriostatic effect of flavonoids isolated from leaves of *Psidium guajava* on fish pathogens. *Fitotrapia*. 78(6): 434-436.
- Trần Thị Yến Nhi và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2010. Ảnh hưởng của chiết xuất từ cây hoàng kỳ (*Astragalus radix*) lên một số chỉ tiêu miễn dịch không đặc hiệu của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí khoa học Đại học Cần thơ*. 4: 278-288.
- Yin, G., Jeney, G., Racz, T., Pao, X., Xie, J. and Jeney, Z., 2006. Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-sp. ecific immune resp. onse of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*. 2539(1-4): 39-47.