

DOI:10.22144/ctu.jsi.2018.050

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 ĐIỀU HỒNG (*Oreochromis* SP.)

Mai Thanh Thanh và Bùi Thị Bích Hằng*

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

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

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 17/05/2018

Ngày nhận bài sửa: 11/06/2018

Ngày duyệt đăng: 30/07/2018

Title:

The effect of garlic (*Allium sativum*) on immune parameters and bacterial resistance of red tilapia (*Oreochromis* sp.)

Từ khóa:

Cá điều hồng, đáp ứng miễn dịch, tỏi

Keywords:

Allium sativum, immunostimulants, *Oreochromis* sp.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of supplemented garlic on the immune system and disease resistance of Red tilapia (*Oreochromis* sp.). Experiment was randomly designed with 5 treatments and triplications for each treatment. The treatments were 0.5 and 1% garlic; 0.25 and 0.5% garlic powder and control treatment. After 14 days of feeding garlic, fish were challenged with bacteria (*Streptococcus agalactiae*). Sampling was conducted after the fish were fed feed containing garlic for 7 days, 14 days and after 3 days of infection with *Streptococcus agalactiae*. Several immune parameters including the total erythrocyte cells, leukocyte cells, each type of leukocyte and lysozyme activity were observed. The results showed that hematology parameters and lysozyme activity in garlic supplemented treatments were significantly higher than those of control treatment ($p < 0.05$). Treatment of 0.25% garlic powder reported the highest value in total of erythrocyte, leukocyte, monocyte, neutrophil, lymphocyte, thrombocyte and lysozyme activity showed significant difference with others ($p < 0.05$). After challenge with *S. agalactiae*, the mortality of supplemented treatments was lower than control treatment. The treatment of 0.25% garlic powder showed the lowest mortality and significant difference with others.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá sự ảnh hưởng của việc bổ sung tỏi vào thức ăn lên hệ thống miễn dịch và khả năng kháng bệnh của cá điều hồng (*Oreochromis* sp.). Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 nghiệm thức, 3 lần lặp lại. Các nghiệm thức bao gồm bổ sung 0,5; 1% tỏi tươi; 0,25; 0,5% bột tỏi và đối chứng (không bổ sung tỏi). Sau 14 ngày sử dụng thức ăn có bổ sung tỏi, cá được cảm nhiễm với vi khuẩn gây bệnh (*Streptococcus agalactiae*). Mẫu được tiến hành thu sau 7 ngày, 14 ngày cá được bổ sung tỏi và 3 ngày sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*. Các chỉ tiêu miễn dịch được theo dõi bao gồm mật độ tổng hồng cầu, tổng bạch cầu, các loại bạch cầu như tế bào lympho, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính, tiểu cầu và hoạt tính lysozyme. Kết quả cho thấy, các chỉ tiêu huyết học và hoạt tính lysozyme của cá ở các nghiệm thức có bổ sung tỏi đều tăng cao và khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Nghiệm thức bổ sung 0,25% bột tỏi cho kết quả mật độ tổng hồng cầu, bạch cầu, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính, tiểu cầu, hoạt tính lysozyme tăng cao nhất và có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức khác ($p < 0,05$). Sau khi gây cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*, tỉ lệ chết ở các nghiệm thức bổ sung tỏi thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng. Trong đó, nghiệm thức bổ sung 0,25% bột tỏi có tỉ lệ chết thấp nhất (36,7%) và khác biệt so với các nghiệm thức còn lại.

Trích dẫn: 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 điều hồng (*Oreochromis* sp.). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(Số chuyên đề: Thủy sản)(2): 168-176.

1 GIỚI THIỆU

Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) có điều kiện thuận lợi phát triển nuôi trồng thủy sản. Bên cạnh đối tượng nuôi cá tra với nhiều tiềm năng phát triển thì cá điêu hồng đã và đang trở thành một trong những đối tượng nuôi chủ lực ở các vùng nước ngọt, do đây là loài cá dễ nuôi, chất lượng thịt ngon và dễ thích ứng với điều kiện môi trường. Những năm gần đây, mô hình nuôi cá điêu hồng lồng bè phát triển mạnh, mức độ thâm canh cao hơn. Tuy nhiên, chất lượng cá giống giảm cùng với môi trường nước xấu đã khiến cho dịch bệnh trên cá điêu hồng nuôi bè xảy ra trầm trọng và giá trị thiệt hại tăng (Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012). Trong đó, bệnh truyền nhiễm mà nhất là bệnh do vi khuẩn đã và đang gây thiệt hại nghiêm trọng đến năng suất và sản lượng cá nuôi, nổi bật là bệnh xuất huyết do vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* (Đặng Thụy Mai Thy và ctv., 2012), bệnh phù mắt do vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* (Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012). Hiện nay, để hạn chế thiệt hại các bệnh do vi khuẩn, người nuôi thường sử dụng nhiều loại thuốc kháng sinh và hóa chất. Tuy nhiên, việc sử dụng thuốc không đúng quy định thường dẫn đến nhiều tác hại như tạo ra các chủng vi khuẩn kháng kháng sinh, tồn lưu lượng kháng sinh trong thịt cá sau thu hoạch, làm ảnh hưởng gián tiếp đến sức khỏe người tiêu dùng, ô nhiễm môi trường, ... (Sarter *et al.*, 2007; Dung *et al.*, 2009). Việc tìm phương pháp mới thay thế cho việc sử dụng kháng sinh là một trong những vấn đề cần thiết hiện nay. Một trong những lựa chọn hợp lý để thay thế thuốc kháng sinh là sử dụng thảo dược để kiểm soát dịch bệnh thủy sản, trong đó tỏi là một trong những loại thảo dược tiềm năng. Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện và cho thấy tỏi có thể sử dụng trong việc phòng trị bệnh trên một số động vật thủy sản (Garbor *et al.*, 2010; Kanani *et al.*, 2014; Ghehdarijani *et al.*, 2016). Ngoài ra, Lee *et al.* (2012) cũng ghi nhận tỏi có thể kháng các loài vi khuẩn nước ngọt như *Pseudomonas fluorescens*, *Myxococcus piscicola*, *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas punctata*, *Flexibacter intestinalis* và *Yersinia ruckeri*. Trần Hồng Thủy và ctv. (2013) đã nghiên cứu tác dụng diệt khuẩn của tỏi trong việc điều trị bệnh do *A. hydrophila* gây ra trên ếch Thái Lan cho kết quả rất tốt. Tuy nhiên, những nghiên cứu về khả năng tăng cường đáp ứng miễn dịch và kháng khuẩn của tỏi trên cá điêu hồng hiện nay vẫn chưa có nhiều. Do đó đề tài nghiên cứu “Ảnh hưởng của việc bổ sung tỏi (*Allium sativum*) vào thức ăn lên một số chỉ tiêu miễn dịch và khả năng kháng vi khuẩn của cá điêu hồng (*Oreochromis sp.*)” được thực hiện nhằm cung

cấp thông tin làm cơ sở đề xuất biện pháp phòng trị bệnh cho cá điêu hồng.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Cá điêu hồng giống có khối lượng 10-15 g/con được mua ở trại sản xuất giống Phú (Long Hồ - Vĩnh Long) chuyển về phòng thí nghiệm Bộ môn Bệnh học Thủy sản và thuần dưỡng trong 2 tuần trước khi bố trí thí nghiệm. Tỏi tươi Lý Sơn và bột tỏi Vianco được sử dụng làm nguyên liệu thí nghiệm. Vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* nhận từ bộ sưu tập vi khuẩn của Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm bổ sung tỏi vào thức ăn cho cá được thiết kế với 5 nghiệm thức (NT), NT1: 0,5% tỏi tươi, NT2: 1% tỏi tươi, NT3: 0,25% bột tỏi, NT4: 0,5% bột tỏi và NT5: đối chứng (không bổ sung tỏi). Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần với 35 cá/bể. Cá được cho ăn thức ăn bổ sung tỏi trong 14 ngày. Định kỳ thu mẫu vào ngày 7 và ngày 14 sau khi cho cá ăn thức ăn có bổ sung tỏi, thu mẫu máu của 3 cá/bể để thực hiện các chỉ tiêu huyết học và hoạt tính lysozyme.

Thí nghiệm cảm nhiễm cá điêu hồng với vi khuẩn *S. agalactiae*: sau 14 ngày cho ăn thức ăn bổ sung tỏi, việc gây cảm nhiễm cá được tiến hành. Thí nghiệm được bố trí 6 nghiệm thức bao gồm NT1: 0,5% tỏi tươi + 0.1 mL *S. agalactiae*, NT2: 1% tỏi tươi + 0.1 mL *S. agalactiae*, NT3: 0,25% bột tỏi + 0.1 mL *S. agalactiae*, NT4: 0,5% bột tỏi + 0.1 mL *S. agalactiae*, NT5: không bổ sung tỏi + 0.1 mL *S. agalactiae* và NT6: không bổ sung tỏi + 0.1 mL NaCl. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, 13 cá/bể, mỗi cá được tiêm 0,1 mL vi khuẩn *S. agalactiae* với liều 10^5 CFU/mL, tham khảo giá trị LD50 của vi khuẩn *S. agalactiae* là $4,89 \times 10^4$ CFU/mL (Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012). Sau 3 ngày cảm nhiễm, 3 cá/bể được tiến hành thu mẫu để thực hiện các chỉ tiêu huyết học và hoạt tính lysozyme, hàng ngày quan sát dấu hiệu bệnh lý và ghi nhận số cá chết trong suốt 14 ngày sau cảm nhiễm.

2.3 Phương pháp phân tích

– **Định lượng hồng cầu** (Natt và 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)

– **Định lượng tổng bạch cầu và từng loại bạch cầu** (Hrubec *et al.*, 2000). Trải 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. Mẫu được để khô tự nhiên và nhuộm Wright & Giemsa. Tổng số lượng bạch cầu được tính theo công thức:

$$\text{TBC (tb/mm}^3\text{)} = (\text{số BC trong 1.500 tế bào x R})/\text{số HC trong 1.500 tế bào}$$

(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:

$$\text{Mật độ loại bạch cầu (tb/mm}^3\text{)} = (\text{số lượng mỗi loại bạch cầu x TBC})/200$$

– **Xác định hoạt tính lysozyme** (Ellis *et al.*, 1990). Đường chuẩn lysozyme được dựng với các nồng độ 0, 2, 4, 8 và 16 µg/mL. 10 µL dung dịch từ các nồng độ pha loãng được cho vào đĩa 96 giếng, tiếp theo cho 200 µL/giếng dịch huyền phù *Micrococcus luteus* (Sigma). Đối với mẫu huyết thanh của cá, cho 10 µL vào đĩa 96 giếng, thêm 200 µL/giếng vi khuẩn *Micrococcus 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.

– **Phương pháp PCR tái định danh vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*** (Trần Thị Tuyết Hoa, 2014). Phản ứng PCR được thực hiện với trình tự 2 đoạn mồi dùng khuếch đại *S. agalactiae* bao gồm: F1 (5' GAG TTT GAT CAT GGG TCA G 3') VÀ IMOD (5' ACC AAC ATG TGT TAA TTA CTC 3') (Channarong *et al.*, 2012). Thành phần phản ứng PCR bao gồm 1X PCR buffer, 2 mM MgCl₂; 200 µM dNTPs; 1U Taq DNA polymerase; 10 pmol mồi F1; 10 pmol mồi IMOD; 1 khuẩn lạc cần xác định là *S. agalactiae*. Tổng thể tích là 25 µL. Điều kiện phản ứng: 95°C trong 5 phút, tiếp theo 95°C trong 1 phút, 58°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút, lặp lại 35 lần, cuối cùng 72°C trong 7 phút. Căn cứ vào thang DNA 1kb plus (Invitrogen) để xác định trọng

lượng phân tử, sản phẩm khuếch đại đặc hiệu hiện vạch ở vị trí 220 bp.

2.4 Phương pháp phân tích số liệu

Các số liệu được nhập dữ liệu và xử lý bằng phần mềm Excel. Chương trình SPSS 13.0 được sử dụng phân tích ANOVA 1 nhân tố ở mức ý nghĩa $p < 0,05$.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của tảo lên một số chỉ tiêu miễn dịch của cá điêu hồng

3.1.1 Chỉ tiêu huyết học

Mật độ tổng hồng cầu. Kết quả định lượng hồng cầu (Bảng 1) cho thấy, mật độ hồng cầu ở các nghiệm thức trong 2 đợt thu mẫu dao động từ 1,71-2,91x10⁶ tb/mm³. Sau 7 ngày, các nghiệm thức cho ăn thức ăn bổ sung tảo có mật độ hồng cầu cao hơn nghiệm thức đối chứng, trong đó NT3 có mật độ hồng cầu cao nhất (2,52x10⁶ tb/mm³) khác biệt có ý nghĩa thống kê với nghiệm thức đối chứng (1,71x10⁶ tb/mm³) ($p < 0,05$), nhưng không có sự khác biệt với các nghiệm thức bổ sung tảo khác. Sau 14 ngày, mật độ hồng cầu ở các nghiệm thức đều tăng cao đáng kể so với đợt thu mẫu đầu tiên, nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Mật độ hồng cầu ở NT3 vẫn cao nhất (2,91x10⁶ tb/mm³) khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức khác ($p < 0,05$), ngoại trừ NT4.

Tương tự với kết quả của thí nghiệm trên, nghiên cứu của Glomski and Pica (2006) cũng ghi nhận sự biến động hồng cầu ở cá nước ngọt trong khoảng 1 - 3,5x10⁶ tb/mm³. Theo Farahi *et al.* (2010), hồng cầu của cá hồi vẫn tăng cao khi cá ăn thức ăn bổ sung tảo 30g/kg thức ăn trong 2 tháng và khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Tương tự, nghiên cứu bổ sung tảo (0; 0,5; 1 và 1,5%) vào thức ăn cho cá trê phi trong 20 ngày cũng cho thấy mật độ hồng cầu của cá được bổ sung tảo cao hơn so với cá ở nghiệm thức đối chứng (Thanikachalam *et al.*, 2010). Tuy nhiên, nghiên cứu của Saleh *et al.* (2015) đã ghi nhận việc bổ sung tảo (10, 20 và 30g/kg thức ăn) cho cá chêm trong 8 tuần không ảnh hưởng đến mật độ hồng cầu của cá.

Bảng 1 : Mật độ hồng cầu (x10⁶ tb/mm³) và bạch cầu (x10⁵ tb/mm³) ở cá điêu hồng sau khi cho ăn thức ăn bổ sung tảo

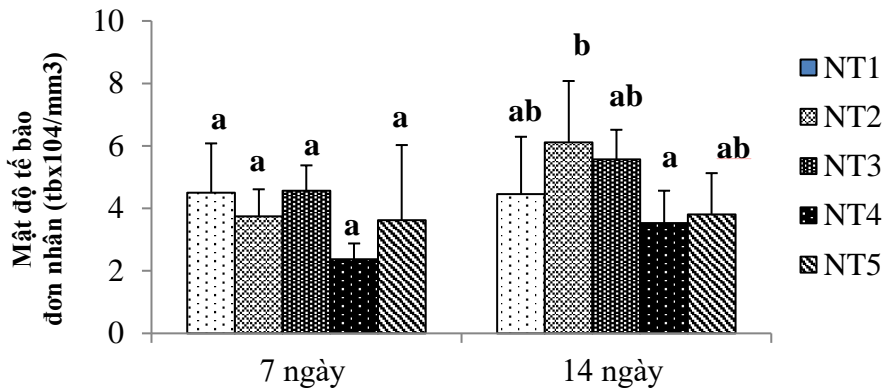
Nghiệm thức	Hồng cầu (x10 ⁶ tb/mm ³)		Bạch cầu (x10 ³ tb/mm ³)	
	7 ngày	14 ngày	7 ngày	14 ngày
NT1	2,12 ± 0,24 ^{AB}	2,14 ± 0,42 ^A	1,58 ± 0,56 ^A	1,59 ± 0,27 ^A
NT2	1,85 ± 0,46 ^{AB}	2,05 ± 0,42 ^A	1,41 ± 0,36 ^A	1,78 ± 0,26 ^A
NT3	2,52 ± 0,28 ^B	2,91 ± 0,63 ^B	1,86 ± 0,35 ^A	2,54 ± 0,14 ^B
NT4	2,04 ± 0,49 ^{AB}	2,41 ± 0,45 ^{AB}	1,53 ± 0,30 ^A	1,66 ± 0,48 ^A
NT5	1,71 ± 0,52 ^A	2,02 ± 0,27 ^A	1,31 ± 0,73 ^A	1,39 ± 0,19 ^A

Ghi chú: các giá trị có ký tự giống nhau trong một cột (A, B) thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)

Mật độ tổng bạch cầu. Sau 2 tuần bổ sung tòi vào thức ăn, mật độ tổng bạch cầu của cá ở các nghiệm thức bổ sung tòi đều cao hơn nghiệm thức đối chứng ở 2 đợt thu mẫu (Bảng 1). Tổng bạch cầu ở đợt thu mẫu 2 cao hơn đợt 1, tuy nhiên không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Sau 7 ngày bổ sung tòi, mật độ bạch cầu ở NT3 ($1,86 \times 10^5$ tb/mm³) cao hơn các nghiệm thức khác nhưng không có ý nghĩa thống kê. Sau 14 ngày bổ sung tòi, mật độ bạch cầu tăng cao nhất ở NT3, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ($p<0,05$).

Mật độ các loại tế bào bạch cầu. Sau 2 đợt thu mẫu, mật độ tế bào lympho ở các nghiệm thức được bổ sung tòi tăng cao hơn nghiệm thức đối chứng. Mật độ tế bào lympho ở đợt thu mẫu lần 2 cao hơn đợt 1. Trong cả 2 đợt thu mẫu, NT4 có mật độ tế bào lympho cao nhất nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức khác ($p>0,05$). Tương tự, ở đợt thu mẫu 1 mật độ tế bào đơn nhân ở NT1, NT2, NT3 tăng cao hơn NT4 và NT5, nhưng

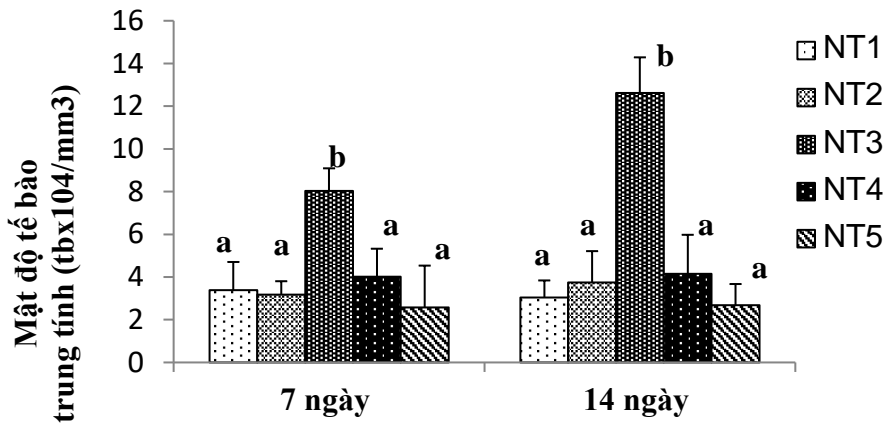
không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$) (Hình 1). Mật độ tế bào đơn nhân tăng dần theo thời gian cho cá ăn thức ăn bổ sung tòi. Sau 14 ngày, mật độ bạch cầu đơn nhân ở NT2 tăng cao nhất ($6,11 \times 10^4$ tb/mm³) so với các nghiệm thức khác và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) so với NT4 ($3,53 \times 10^4$ tb/mm³). Kết quả mật độ bạch cầu trung tính ở các nghiệm thức bổ sung tòi đều tăng cao so với đối chứng, trong đó mật độ bạch cầu trung tính ở NT3 tăng cao nhất và có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) so với các nghiệm thức còn lại (Hình 2). Mật độ bạch cầu trung tính ở NT3 tiếp tục tăng cao ở đợt thu mẫu 2 và tăng cao gấp 3 lần so với các nghiệm thức còn lại, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) so với các nghiệm thức khác. Mật độ tế bào tiểu cầu của cá cũng tăng dần theo thời gian bổ sung tòi. Trong hai đợt thu mẫu, mật độ tiểu cầu của NT3 đều tăng cao so với các nghiệm thức khác và thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) với nghiệm thức đối chứng.



Hình 1: Mật độ bạch cầu đơn nhân của cá điều hồng sau 7 và 14 ngày bổ sung tòi

Nghiên cứu trước đây của Dadvaran *et al.* (2014) bổ sung chất chiết xuất của tòi vào thức ăn (0,15 g/kg thức ăn) cho cá hồi vân làm tăng mật độ bạch cầu của cá. Điều này cho thấy việc bổ sung tòi có tác dụng kích thích và làm gia tăng tế bào bạch cầu. Khi nghiên cứu bổ sung bột tòi (10, 20 và 30 g/kg thức ăn) và bột hành (5, 10 và 20 g/kg thức ăn) vào thức ăn cá chêm trong 8 tuần, kết quả cho thấy tổng bạch cầu của cá ở nghiệm thức bổ sung 30 g bột tòi, 5 và 10 g bột hành tăng cao có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại (Saleh *et al.*, 2015). Ndong và Fall (2011) đã nghiên cứu việc bổ sung tòi (0; 0,5 và 1 g/kg thức ăn) cho cá rô phi lai, kết quả ghi nhận mật độ tổng bạch cầu tăng cao có ý nghĩa thống kê của cá ở nghiệm thức bổ sung 0,5 g tòi/kg thức ăn. Theo Chinabut *et al.*, (1991), tế bào lympho có vai trò quan trọng trong hệ miễn dịch đặc hiệu sau khi liên kết với thụ thể của kháng nguyên hay các mô

của cơ quan đích. Nghiên cứu của Nobahar *et al.* (2014) khi bổ sung 1% tòi vào thức ăn cho cá tầm Beluga (*Huso huso*) sau 20 ngày đã cho kết quả mật độ tế bào lympho tăng cao hơn so với nghiệm thức đối chứng và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<p<0,05$). Tương tự, Fazlolahzadeh *et al.* (2011) cũng cho biết, mật độ tế bào lympho của cá hồi vân tăng cao ở các nghiệm thức sử dụng thức ăn có bổ sung 0,45 g và 0,6 g bột tòi/kg thức ăn so với nghiệm thức đối chứng. Bên cạnh đó, bạch cầu trung tính có chức năng thực bào các vật thể lạ, ở những nơi bị viêm bạch cầu trung tính tập trung rất nhiều, tại đó chúng sẽ tiêu diệt vi trùng và các mảnh vụn tế bào (Smith, 2000). Theo Lê Thị Hoàng Mỹ (2007) bạch cầu trung tính đóng vai trò quan trọng trong việc kháng viêm, đảm nhận vai trò thực bào trước khi một lượng lớn đại thực bào được huy động tới nơi bị tổn thương.

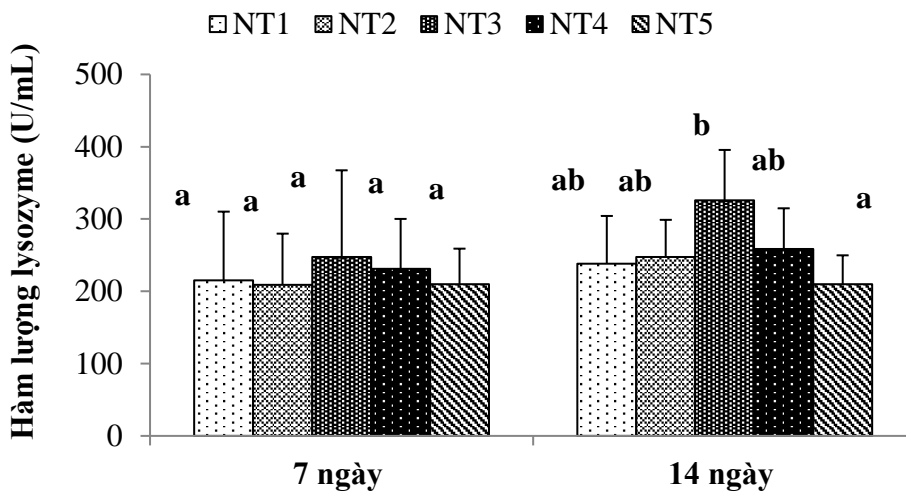


Hình 2: Mật độ bạch cầu trung tính của cá điêu hồng sau 7 và 14 ngày bổ sung tảo

3.1.2 Kết quả phân tích hoạt tính lysozyme

Sau 7 ngày cho ăn thức ăn bổ sung tảo, hoạt tính lysozyme ở nghiệm thức bổ sung và không bổ sung tảo thể hiện khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) (Hình 3). Sau 14 ngày, hoạt tính lysozyme ở tất cả các nghiệm thức bổ sung tảo đều tăng hơn so với nghiệm thức đối chứng, trong đó NT3 tăng cao nhất và khác biệt có ý nghĩa với nghiệm thức đối chứng. Các yếu tố miễn dịch không đặc hiệu như hoạt tính lysozyme được báo cáo tăng cao hơn ở các nghiệm thức bổ sung tảo so với nghiệm thức đối chứng (Sahu *et al.*, 2006). Tương tự, nghiên cứu của

Ndong and Fall (2011) cũng chỉ ra rằng, hoạt tính lysozyme của cá rô phi lai được bổ sung tảo ở mức 0,5 g/kg sẽ tăng cao sau 2 và 4 tuần thí nghiệm, trong khi nghiệm thức bổ sung tảo 1 g/kg thức ăn lại không khác biệt thống kê so với nghiệm thức đối chứng. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Asadi *et al.* (2012) khi bổ sung 1% cải xoong cho cá hồi vân trong 21 ngày đã làm tăng hoạt tính lysozyme của cá và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức bổ sung 0,1% cải xoong.



Hình 3: Hoạt tính lysozyme của cá điêu hồng sau khi cho ăn thức ăn bổ sung tảo

3.2 Ảnh hưởng của tảo lên hệ miễn dịch của cá điêu hồng sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae*

3.2.1 Chỉ tiêu huyết học.

Sau 3 ngày cảm nhiễm cá với vi khuẩn *S. agalactiae*, mật độ hồng cầu ở các nghiệm thức bổ sung tảo cao hơn nghiệm thức đối chứng nhưng khác

biệt không có ý nghĩa thống kê. Khác với hồng cầu, mật độ tổng bạch cầu của cá tăng cao sau khi cảm nhiễm với *S. agalactiae*, mật độ bạch cầu của cá ở tất cả các nghiệm thức tiêm vi khuẩn đều tăng cao so với cá trước khi cảm nhiễm. Bên cạnh đó, mật độ bạch cầu ở các nghiệm thức bổ sung tảo tăng cao có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$) (Bảng 2).

Bảng 2: Mật độ hồng cầu ($\times 10^6$ tb/mm³), bạch cầu ($\times 10^5$ tb/mm³) và tế bào lympho, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính, tiểu cầu ($\times 10^4$ tb/mm³) sau cảm nhiễm 3 ngày

	NT1	NT2	NT3	NT4	NT5
Hồng cầu	2,17 ± 0,37 ^a	2,49 ± 0,56 ^a	2,39 ± 0,42 ^a	2,46 ± 0,40 ^a	1,74 ± 0,27 ^a
Bạch cầu	3,25 ± 0,32 ^{ab}	4,15 ± 0,19 ^b	4,41 ± 0,48 ^b	3,99 ± 0,61 ^b	2,63 ± 0,31 ^a
Lympho	7,88 ± 1,12 ^a	11,57 ± 1,37 ^b	9,30 ± 2,27 ^{ab}	11,28 ± 1,98 ^b	8,02 ± 0,64 ^a
Bc đơn nhân	13,46 ± 2,36 ^{ab}	17,74 ± 2,85 ^b	21,74 ± 1,85 ^b	18,12 ± 2,13 ^b	11,15 ± 2,05 ^a
Bc trung tính	9,05 ± 1,78 ^{ab}	10,68 ± 3,70 ^{ab}	11,34 ± 1,99 ^b	8,72 ± 2,26 ^{ab}	6,07 ± 0,84 ^a
Tiểu cầu	1,66 ± 0,39 ^b	1,51 ± 0,24 ^{ab}	1,70 ± 0,29 ^b	1,80 ± 0,23 ^b	1,03 ± 0,16 ^a

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

Mật độ tế bào lympho, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính và tiểu cầu của các nghiệm thức bổ sung tòi đều cao hơn so với nghiệm thức đối chứng. Mật độ tế bào lympho của NT2 ($11,57 \times 10^4$ tb/mm³) và NT4 ($11,28 \times 10^4$ tb/mm³) đạt cao nhất và có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($8,02 \times 10^4$ tb/mm³) ($p < 0,05$). Đặc biệt, NT3 có mật độ bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính và tiểu cầu tăng rất cao và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$).

Bạch cầu đóng vai trò quan trọng trong quá trình điều hòa chức năng miễn dịch, do đó đây cũng là một trong những chỉ tiêu cơ bản để đánh giá sức khỏe của cá (Harikrishnan *et al.*, 2003). Theo Shalaby *et al.* (2005), việc bổ sung tòi vào thức ăn (40 g/kg thức ăn) cho cá rô phi đã làm tăng mật độ hồng cầu và bạch cầu, có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng. Một thí nghiệm khác, khi bổ sung tòi chiết xuất vào thức ăn (0,15 g/kg) cho cá hồi vân thì lượng hồng cầu, hệ số hematocrite và khả năng miễn dịch của cá đều tăng (Dadvaran *et al.*, 2014). Theo Aly *et al.* (2010), khi cho cá rô phi ăn thức ăn chứa 3% tòi và 1 ppt Echinacea thì mật độ bạch cầu trung tính và tế bào lympho tăng lên và

khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng.

3.2.2 Hoạt tính lysozyme

Sau 3 ngày cảm nhiễm, hoạt tính lysozyme ở tất cả các nghiệm thức đều tăng cao hơn so với nghiệm thức tiêm nước muối sinh lý, tuy nhiên không có ý nghĩa thống kê ngoại trừ NT3. Hoạt tính lysozyme ở các nghiệm thức bổ sung tòi đều cao hơn so với nghiệm thức đối chứng. Tương tự, Nya and Austin (2009) cũng đã thực hiện thí nghiệm bổ sung tòi trên cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*) với nhiều nồng độ khác nhau (0; 0,05; 0,1; 0,5 và 1%) trong 14 ngày. Kết quả cho thấy, nghiệm thức bổ sung 0,05; 0,1; 0,5 và 1% tòi cho hoạt tính lysozyme của cá tăng cao và khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng. Một thí nghiệm khác, khi bổ sung tinh chất Alicin của tòi với nồng độ (0; 0,5 và 1 mL/100 g thức ăn) cho cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*) thì mật độ bạch cầu giảm nhưng lại kích hoạt hoạt động đại thực bào, đạt 39,3% ở nghiệm thức bổ sung allicin trong khi nghiệm thức đối chứng chỉ đạt 13,6%. Mặt khác, việc cá được bổ sung allicin cũng đã thể hiện hoạt tính lysozyme cao hơn nghiệm thức đối chứng (Nya *et al.*, 2010)

Bảng 3: Hoạt tính lysozyme của cá điêu hồng sau cảm nhiễm

	NT1	NT2	NT3	NT4	NT5
Tiêm NaCl	245,8±35,8 ^{Aa}	244,3±61,9 ^{Aa}	365,4±40,1 ^{Ab}	251,8±51,3 ^{Aa}	205,7±73,7 ^{Aa}
Tiêm vi khuẩn	284,1±60,0 ^{Aa}	287,4±69,4 ^{Aa}	446,3±27,4 ^{Bb}	294,2±13,3 ^{Aa}	265,8±169,5 ^{Aa}

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

3.2.3 Khả năng bảo vệ của tòi đối với cá điêu hồng khi cảm nhiễm vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*

Sau 3 ngày tiêm vi khuẩn, cá có dấu hiệu bơi lơ đờ, mất phương hướng, mất lồi và đục, trên thân có những đốm xuất huyết ở vây ngực và vây bụng,

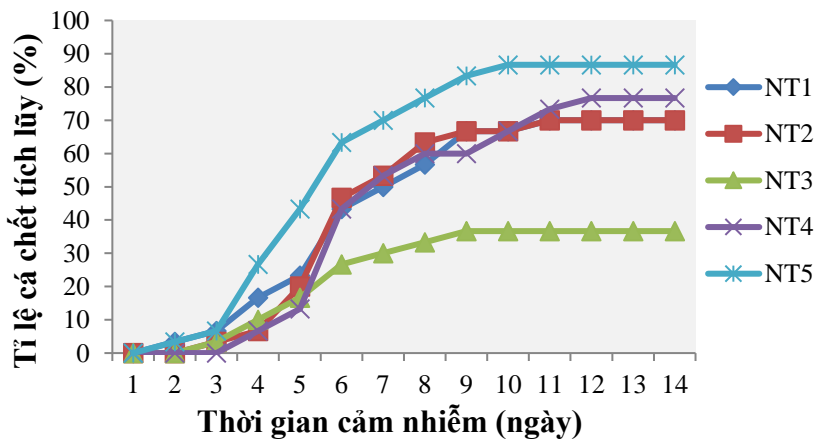
mang tái nhạt, bụng trương to, xoang bụng có chứa dịch màu vàng, nội tạng bị xuất huyết và hoại tử. Các dấu hiệu nêu trên giống với kết quả đã được ghi nhận trên cá điêu hồng (*Oreochromis sp.*) nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* (Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012).



Hình 4: Dấu hiệu bệnh lí của cá. A. Bụng trương to. B. Mắt bị lồi. C. Gan bị xuất huyết (mũi tên trắng) và hoại tử (mũi tên đen)

Kết quả quan sát ở Hình 5 cho thấy, cá cảm nhiễm bắt đầu chết ở ngày thứ 2 sau khi tiêm vi khuẩn và chết nhiều từ ngày thứ 3 trở về sau. Kết quả, NT5 có tỉ lệ chết cao nhất là 86,7%, NT1 và 2

có tỉ lệ chết 70% và NT3 cho kết quả tỉ lệ chết thấp nhất 36,7%. Nhìn chung, ở các nghiệm thức cá chết nhiều từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 10, sau ngày thứ 10 hầu như cá không còn chết.



Hình 5: Tỉ lệ cá chết được theo dõi qua các ngày sau khi tiêm vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*

Arinee (2008) khi nghiên cứu về tác dụng kháng khuẩn của tỏi và lá ổi với *Aeromonas hydrophila* và *Streptococcus* spp. phân lập trên cá đã cho kết quả MIC lần lượt 2,64; 13,24 mg/mL đối với *Aeromonas hydrophila* và 17,58; 73,67 mg/mL cho *Streptococcus* spp. Nghiên cứu này cho thấy tỏi có

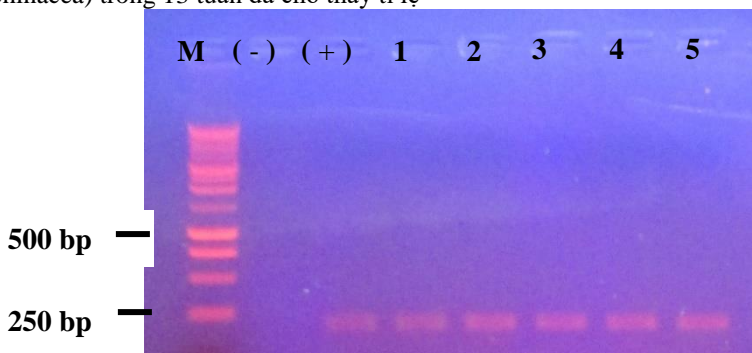
tính kháng khuẩn cao hơn so với lá ổi. Năm 2009, Nya and Austin thực hiện thí nghiệm trên cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*) cho kết quả tỉ lệ chết là 4% ở liều bổ sung 0,5 và 1% tỏi vào thức ăn. Một nghiên cứu khác của Nya *et al.* (2010) về khả năng đáp ứng miễn dịch của cá hồi vân sau khi cho ăn thức ăn bổ sung Allacin trong 14 ngày và cảm nhiễm với

Aeromonas hydrophila đã cho kết quả: cá được bổ sung allacin có tỉ lệ sống cao nhất là 88% so với 16% ở cá đối chứng sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn. Cá rô phi khi được cho ăn thức ăn bổ sung tỏi (*Allium sativum*) và *Echinacea purpurea* thì có tỉ lệ sống và sức đề kháng cao với mầm bệnh *A. hydrophila* (Aly *et al.*, 2010). Tương tự ở một nghiên cứu khác, việc cho cá ăn thức ăn trộn với tổ hợp các chất chiết xuất thực vật (nhóm 1: gồm tỏi+gừng, nhóm 2: gồm Oregano+Echinacea) trong 13 tuần đã cho thấy tỉ lệ

sống, tốc độ tăng trưởng của cá và khả năng chống lại vi khuẩn *A. hydrophila* ở cá chép (*Cyprinus carpio*) được bổ sung chiết xuất thực vật đều tăng cao so với đối chứng (Gabor *et al.*, 2012).

3.2.4 Kết quả PCR tái định danh vi khuẩn *S. agalactiae*

Kết quả PCR cho thấy, cả 5 mẫu cá cảm nhiễm với vi khuẩn đều xuất hiện vạch 220 bp, vạch đặc hiệu của vi khuẩn *S. agalactiae* (Hình 6).



Hình 6: Kết quả điện di sản phẩm PCR tái định danh vi khuẩn *S. agalactiae*

4 KẾT LUẬN

Sau 14 ngày cho cá ăn thức ăn bổ sung tỏi, các chỉ tiêu huyết học bao gồm tổng hồng cầu, bạch cầu và các loại bạch cầu đều tăng cao so với đối chứng, hoạt tính lysozyme cũng gia tăng ở nhóm cá được bổ sung tỏi. Sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*, tỉ lệ chết của cá ở nghiệm thức bổ sung tỏi giảm so với cá ở nghiệm thức đối chứng. Việc bổ sung 0,25% bột tỏi cho kết quả huyết học, hoạt tính lysozyme tăng tốt nhất và tỉ lệ sống của cá cao nhất sau cảm nhiễm.

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.

Chatchawanchontea, A., Wangboonskul, J., Trongwanishnam, K., Buttasri, A., Borisutpeth, P., Sriyamat, M., Nampakdee, N. and Laohawat, W., 2011. Antimicrobial activity of guava leaf and garlic extracts against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus* spp. isolated from infected fish. *KKU Veterinary Journal*, 18(1): 46-53.

Asadi, M.S., Mirvaghefi, A.R., Nematollahi, M.A., Banaee, M. and Ahmadi, K., 2012. Effects of watercress extract on selected immunological parameters of rainbow trout. *Journal of Opan Veterinary*, 2: 32-39.

Channarong, R., K. Pattanapon, P. Nopadon and W. Janenuj, 2012. Duplex PCR for simultaneous and

unambiguous detection of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* associated with *Streptococcosis* of culture Tilapia in Thailand. *Thai Journal Vet Medicine*, 42 (2): 153-158.

Chinabut, S., Kisawat, P. and Limsuwan, C., 1991. Histology of the walking catfish, *Clarias batrachus*, International development research center, Canada, 96 pages.

Dadvaran, S. P., Mansureh, G., Abolfazl, A. S., 2014. Effect of garlic (*Allium sativum* L.) extract on some hematological parameters and immune response of rainbow trout fingerlings. *Journal of Herbal Drugs*, 4:162-169.

Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012. Phân lập và xác định đặc điểm của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* từ cá điêu hồng (*Oreochromis* sp.). *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 22c: 203-212 .

Đặng Thụy Mai Thy, Trần Thị Thủy Cúc, Nguyễn Châu Phương Lam, Nguyễn Đức Hiền và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2012. Đặc điểm mô bệnh học cá rô (*Anabas testudineus*) nhiễm vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* và *Streptococcus* sp. trong điều kiện thực nghiệm. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 22c: 203-212 .

Dung, T.T., F. Haesebrouck, P. Sorgeloos, N.A. Tuan, M. Baelem, A. Smet, A. Descostere, 2009. Inc plasmidmediated tetracycline resistance in *Edwardsiella ictaluri* isolates from diseased freshwater catfish in Vietnam. *Aquaculture* 295:157-159.

Ellis, A.E., 1990. Lysozyme Assays. *Techniques in Fish Immunology*, 101-103.

- 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.
- Fazlollahzadeh, F., Keramati, K., Nazifi, S., Shirian, S. and Seifi, S., 2011. Effect of garlic (*Allium sativum*) on hematological parameters and plasma activities of ALT and AST of rainbow trout in temperature stress. *Aust J Basic Appl Sci*, 5(9), 84-90
- Gabor, E.F., Aurel, S., Bentea, M., Calina, C., Anca, B., 2012. The effect of phytoadditive combinations on growth and consumption indices and resistance to *Aeromonas hydrophila* in common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Iranian Journal of Aquatic Animal Health* 2(1): 24-36
- Ghehdarijani, M.S., Hajimoradloo, A., Ghorbani, R., Roohi, Z., 2016. The effects of garlic-supplemented diets on skin mucosal immune responses, stress resistance and growth performance of the Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish Shellfish Immunol.* 49:79-83.
- Glomski, C.A. and Pica, A., 2006. Erythrocyte of the poikilotherms: A phylogenesis odyssey. ISSN: 1-905868. Scientific pubsher.
- Harikrishnan R, Nisha Rani M, Balasundaram C., 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture* 221: 41-50
- Hrubec, T.C., J. L. Cardinale, S. A. Smith, 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Veterinary Clinical Pathology* 29:7-12.
- Kanani, H.G., Nobahar, Z., Kakoolaki, S., Jafarian, H., 2014. Effect of ginger- and garlic-supplemented diet on growth performance, some hematological parameters and immune responses in juvenile *Huso huso*. *Fish Physiol Biochem* 40(2):481-90.
- Lê Thị Hoàng Mỹ, 2007. Tạo máu và sinh lí hồng cầu. *Giáo trình huyết học và miễn dịch*. Trường Đại học Y dược Cần Thơ. 255 trang.
- Lee, J. Y., 2012. Review of the application of garlic (*Allium sativum* L.) in aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society.*, Vol43, No4., August 2012.
- Natt, M.P., Herrick, C.A., 1952. A new blood diluent for counting erythrocytes and leucocytes 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* x *Oreochromis aureus*). *Journal of Clinical Immunology and Immunopathology Research* 3(1): 1-9.
- Nobahar, Z., Gholipour-Kanani, H., Kakoolaki, S. and Jafarian, H., 2014. Effect of garlic (*Allium sativum*) and nettle (*Urtica dioica*) on growth performance and hematological parameters of beluga (*Huso huso*).
- Nya and Austin, 2009. Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 32:963-970.
- Nya, E.J., Dawood, Z., Austin, B., 2010. The garlic component, allicin, prevents disease caused by *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis.* 33(4):293-300.
- Sahu, S., Das, B.K., Mishra, B.K., Pradhan, J. and Sarangi, N., 2006. Effect of *Allium sativum* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Applied Ichthyology*, 20: 263-273.
- Saleh N.E., Michael F.R., Mohamed M.T., 2015. Evaluation of garlic and onion powder as phyto-additives in the diet of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 41 (2):211-217.
- Sarter, S., N.H.N. Kha, L.T. Hung, J. Lazard and Didier M., 2007. Antibiotic resistance in Gramnegative bacteria isolated from farmed catfish. *Food Control* 18:1391-1396.
- Shalaby, A.M., Khattab, Y.A. and Abdel Rahman, A.M., 2005. Effects of garlic (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).
- Thanikachalam K., Kasi M., Rathinam X., 2010. Effect of garlic peel on growth, hematological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in African catfish *Clarias gariepinus* (Bloch) fingerlings. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3 (8): 614-618.
- Trần Hồng Thủy, Nguyễn Trung Tính, Trần Ngọc Thiên Kim, Nguyễn Thành Nhân, 2013. Bước đầu nghiên cứu tác dụng diệt khuẩn của tỏi (*Allium sativum* L.) trong điều trị bệnh do *Aeromonas hydrophila* trên ếch Thái Lan (*Rana tigerina*). *Tuyên tập Hội nghị Khoa học trẻ Ngành Thủy sản toàn quốc lần thứ IV*. Thành phố Hồ Chí Minh, ngày 6-7/6/2013, 482-488.
- Trần Thị Tuyết Hoa, 2014. Phát hiện vi khuẩn *Vibrio harveyi* và *Streptococcus agalactiae* bằng phương pháp PCR khuẩn lạc. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 2:1-6