

EFFECTS OF EUCALYPTUS LEAF EXTRACT (*Eucalyptus globulus*) ON HEMATOLOGICAL PARAMETERS, SERUM BACTERICIDAL ACTIVITY AND DISEASE RESISTANCE OF CATFISH (*Pangasianodon hypophthalmus*) AGAINST PURULENT LIVER AND KIDNEY DISEASE

Nguyen Thi Truc Linh^{1*}, Hong Mong Huyen²

¹School of Agriculture and Aquaculture - Tra Vinh University

²Faculty of Agriculture and Rural Development - Kien Giang University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 19/02/2024	The study was conducted to evaluate the effects of eucalyptus leaf extract (<i>Eucalyptus globulus</i>) on hematological index, serum antibacterial activity, and disease resistance of catfish (<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>) against purulent liver and kidney disease. The experiment was arranged completely randomly with 3 repetitions at concentrations of 1%, 1.5%, and 2% eucalyptus leaf extract for 30 days. With eucalyptus leaf extract as a supplement, the density of erythrocytes, leukocytes, lymphocytes, monocytes, neutrophils, platelets, and serum antibacterial activity of fish were determined on the day before being infected with the bacterial pathogen <i>Edwardsiella ictaluri</i> , and 3 days after infection. The results showed that supplementing eucalyptus leaf extract increased the density of leukocytes, mononuclear cells, lymphocytes, and serum antibacterial activity in treatments supplemented with eucalyptus leaf extract compared to the control ($p < 0.05$). In addition, it helped catfish improve survival rate when challenged with <i>E. ictaluri</i> , which causes purulent liver and kidney disease. These capabilities of eucalyptus leaf extract are great, so it would be really useful to be supplement for catfish.
Revised: 14/5/2024	
Published: 20/5/2024	
KEYWORDS	
Hematological index	
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	
<i>Eucalyptus globulus</i>	
Serum bactericidal	
Catfish	

TÁC DỤNG CỦA VIỆC BỔ SUNG CHẤT CHIẾT LÁ KHUYNH DIỆP (*Eucalyptus globulus*) TRONG THỨC ĂN ĐẾN CHỈ SỐ HUYẾT HỌC, HOẠT TÍNH KHÁNG HUYẾT THANH VÀ KHÁNG BỆNH CỦA CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*) CHỐNG BỆNH GAN THẬN MỦ

Nguyễn Thị Trúc Linh^{1*}, Hồng Mộng Huyền²

¹Khoa Nông nghiệp Thủy sản - Trường Đại học Trà Vinh

²Khoa Nông nghiệp và Phát triển nông thôn - Trường Đại học Kiên Giang

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 19/02/2024	Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng chất chiết lá khuynh diệp (<i>Eucalyptus globulus</i>) lên chỉ số huyết học, hoạt tính kháng khuẩn huyết thanh và kháng bệnh của cá tra (<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>) chống lại bệnh gan thận mủ. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại ở các nồng độ 1%, 1,5% và 2% chất chiết lá khuynh diệp trong 30 ngày. Sau đó, xác định mật độ hồng cầu, bạch cầu, lympho, bạch cầu đơn nhân, trung tính, tiểu cầu và hoạt tính kháng khuẩn huyết thanh của cá ở ngày đầu trước khi cảm nhiễm mầm bệnh vi khuẩn <i>Edwardsiella ictaluri</i> và 3 ngày sau khi cảm nhiễm vi khuẩn. Kết quả cho thấy việc bổ sung chất chiết lá khuynh diệp có mật độ bạch cầu, tế bào đơn nhân, lympho và hoạt tính kháng khuẩn huyết thanh gia tăng ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết lá khuynh diệp so với đối chứng ($p < 0,05$). Ngoài ra, giúp cá tra cải thiện tỷ lệ sống trong điều kiện cảm nhiễm với <i>E. ictaluri</i> , gây bệnh gan thận mủ. Những khả năng này của chất chiết lá khuynh diệp là rất lớn, nó thật sự có ích để bổ sung vào thức ăn cho cá tra.
Ngày hoàn thiện: 14/5/2024	
Ngày đăng: 20/5/2024	
TỪ KHÓA	
Chỉ số huyết học	
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	
<i>Eucalyptus globulus</i>	
Kháng khuẩn huyết thanh	
Cá tra	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.9730>

* Corresponding author. Email: truclinh@tvu.edu.vn

1. Giới thiệu

Hiện nay thảo dược được sử dụng và có hiệu quả trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản, đặc biệt là trên cá, chúng không chỉ thể hiện khả năng kháng khuẩn mà còn có khả năng giúp cá cải thiện tăng trưởng, tỷ lệ sống và tăng cường hệ miễn dịch chống lại nhiều loại tác nhân gây bệnh [1], [2]. Chất chiết hương nhu (*Ocimum sanctum*), nhân sâm (*Withania somnifera*) và nhục đậu khấu (*Myristica fragrans*) giúp cải thiện đáng kể các chỉ số miễn dịch như hoạt tính thực bào, hoạt tính diệt khuẩn của huyết thanh, tỷ lệ albumin–globulin (A/G) và leucocrit ở cá sông mỡ (*Epinephalus tauvina*) khi cảm nhiễm với *Vibrio harveyi* [3]. Chất chiết của bốn loại cây như cây cỏ gà (*Cynodon dactylon*), bầu nâu (*Aegle marmelos*), nhân sâm (*Withania somnifera*) và gừng (*Zingiber officinale*) phối trộn vào thức ăn của cá rô phi đen (*Oreochromis mossambicus*) làm gia tăng các chỉ tiêu leucocrit, thực bào và hoạt tính lysozyme trong máu [4]. Phối trộn chất chiết xuất lá ổi (*Psidium guajava*) vào thức ăn viên giúp cá rô phi tăng hoạt động của các chỉ số trong hệ miễn dịch và kháng lại mầm bệnh do vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* [5]. Bên cạnh đó, ở Việt Nam cũng có nhiều chất chiết thảo dược có nguồn gốc từ nhiều loài thực vật được ghi nhận có khả năng giúp cá cải thiện tăng trưởng và tăng cường đáp ứng miễn dịch như chiết xuất lá lựu (*Punica granatum*), điệp hạ châu (*Phyllanthus urinaria*), lá cách (*Premna serratifolia*) giúp cá tra tăng cường đáp ứng miễn dịch đặc hiệu và không đặc hiệu, đồng thời giúp cá tra chống lại vi khuẩn gây bệnh gan thận mủ [6]-[8].

Khuynh điệp (*E. globulus*) hay còn có tên gọi khác là bạch đàn, thuộc họ Myrtaceae (sim), có nguồn gốc ở Úc, mọc hầu hết mọi nơi ở vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới và cũng được trồng ở nhiều vùng khí hậu khác [9]. Đã có nhiều kết quả nghiên cứu đánh giá về tác dụng của khuynh điệp đối với bệnh truyền nhiễm trên động vật thủy sản, như khuynh điệp có khả năng diệt tác nhân vi khuẩn gây bệnh trên động vật thủy sản [10], [11]. Hay tác dụng của khuynh điệp trên cá hồi vân về sự gia tăng một số chỉ số miễn dịch như hiệu giá kháng thể, tổng số bạch cầu và hoạt tính diệt khuẩn trong huyết thanh [12], [13]. Hay cá rô phi cải thiện hiệu quả tăng trưởng, hiệu quả chuyển hóa thức ăn và làm tăng các chức năng huyết học và các thông số sinh hóa khi cá ăn chế độ ăn bổ sung khuynh điệp [14]. Như vậy, một số nghiên cứu trước đây cho thấy kết quả đầy hứa hẹn về hiệu quả kháng vi khuẩn gây bệnh của chất chiết lá khuynh điệp. Tuy nhiên, chưa có bất kỳ báo cáo nào về việc bổ sung chất chiết lá khuynh điệp vào thức ăn của cá tra, cũng như đánh giá hiệu quả mang lại của chất chiết này đến hệ miễn dịch của cá. Nghiên cứu này sẽ tập trung đánh giá hiệu quả của chất chiết lá khuynh điệp trong việc bảo vệ cá tra chống lại bệnh gan thận mủ do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cá tra (*P. hypophthalmus*) có khối lượng trung bình 15 g/con.

Lá khuynh điệp (*E. globulus*) được thu hái tại Trà Vinh.

Chủng vi khuẩn *E. ictaluri* được lấy từ bộ sưu tập vi khuẩn của Khoa Nông nghiệp - Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh.

2.2. Phương pháp chuẩn bị chất chiết lá khuynh điệp

Lá khuynh điệp sau khi thu hái được rửa sạch và sấy khô ở nhiệt độ 50°C, tiếp theo chúng được nghiền nhuyễn thành dạng bột mịn. Tiếp tục ngâm các bột này trong dung dịch ethanol theo tỉ lệ ngâm là 1:10, sau 5 ngày thu dung dịch qua giấy lọc và tiếp tục tiến hành cô quay bằng hệ thống cô quay chân không để loại bỏ phần dung môi và thu hồi chất dạng cao là chất chiết lá khuynh điệp [15]. Chất chiết này được pha loãng và được phối trộn vào thức ăn viên của cá tra với nhiều nồng độ khác nhau, rồi những loại thức ăn này được sử dụng cho cá ăn.

2.3. Thí nghiệm bổ sung chất chiết lá khuynh điệp với các nồng độ khác nhau vào thức ăn cho cá tra

2.3.1. Bố trí thí nghiệm cho cá tra ăn chất chiết thảo dược

Cá tra trước khi thí nghiệm được thuần dưỡng trong bể composite 3 khối trong 14 ngày. Tiếp theo, những con cá này được bố trí vào trong các bể composite có thể tích 250 L với mật độ 30 cá/bể. Cụ thể, thí nghiệm được bố trí gồm 4 nghiệm thức và từng nghiệm thức sẽ lặp lại 3 lần: (1) Nghiệm thức đối chứng (không bổ sung chất chiết lá khuyễn diệp – ĐC), (2) Nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết lá khuyễn diệp (1% KD), (3) Nghiệm thức bổ sung 1,5% chất chiết lá khuyễn diệp (1,5% KD) và (4) Nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết lá khuyễn diệp (2% KD). Các nghiệm thức này được tiến hành bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên.

Cá được cho ăn thức ăn có bổ sung chất chiết khuyễn diệp với các nồng độ khác nhau liên tục trong 30 ngày, ăn 2 lần/ngày, cá ăn với lượng thức ăn bằng 3% trọng lượng thân. Các chỉ tiêu môi trường luôn được giữ phù hợp trong cả quá trình nuôi, định kỳ thay 50% nước mỗi ngày. Ở thí nghiệm này theo dõi chỉ tiêu huyết học ở thời điểm 30 ngày và hoạt tính kháng khuẩn huyết thanh được xác định ở 15 và 30 ngày sau khi ăn thức ăn chứa các nồng độ chất chiết lá khuyễn diệp khác nhau.

2.3.2. Phương pháp cảm nhiễm cá tra với vi khuẩn *E. ictaluri*

Cá tra ăn thức ăn phối trộn chất chiết lá khuyễn diệp liên tục sau 30 ngày sẽ được di chuyển lên khu vực cảm nhiễm. Sau đó tiến hành bố trí cảm nhiễm chúng với vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh gan thận mủ bằng phương pháp tiêm soan bụng. Cụ thể, (i) cá ở các nghiệm thức cho ăn chất chiết lá khuyễn diệp và nghiệm thức đối chứng dương (ĐC dương) được tiêm 100 μ L dung dịch vi khuẩn *E. ictaluri* với mật số 10^4 CFU/mL, và (ii) nghiệm thức đối chứng âm (ĐC âm) là nghiệm thức cá không ăn thức ăn bổ sung chất chiết khuyễn diệp và không tiêm vi khuẩn *E. ictaluri* mà tiêm nước muối sinh lý. Trong thời gian cảm nhiễm, các nghiệm thức vẫn được cho ăn thức ăn có bổ sung các nồng độ chất chiết lá khuyễn diệp khác nhau.

Thí nghiệm cảm nhiễm sẽ được ghi nhận số lượng cá chết hàng ngày trong 14 ngày, nhằm xác định tỷ lệ chết tích lũy khi thí nghiệm kết thúc. Trong quá trình cảm nhiễm sẽ thu mẫu máu để xác định thông số huyết học và hoạt tính kháng khuẩn huyết thanh ở thời điểm 3 ngày cảm nhiễm.

2.3.3. Phương pháp xác định các chỉ tiêu theo dõi

Thông số huyết học:

Định lượng hồng cầu: Thực hiện theo phương pháp của Natt và Herick [16]. Mật độ hồng cầu được xác định bằng buồng đếm Neubauer và tính bằng công thức:

$$HC \text{ (tb/mm}^3\text{)} = C \times 10 \times 5 \times 200$$

(1)

(C: Tổng số hồng cầu của 5 vùng đếm)

Định lượng bạch cầu: Phân tích theo phương pháp của Hrubec [17]. Một giọt máu được trải lên phiến kính, sau đó để khô và cố định bằng dung dịch methanol trong 1 phút, sau đó nhuộm mẫu với Wright & Giemsa. Tổng lượng bạch cầu được xác định bằng công thức:

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

(2)

(TBC: mật độ tổng bạch cầu, BC: bạch cầu, R: mật độ hồng cầu, HC: hồng cầu)

Định lượng từng loại bạch cầu: Từng loại bạch cầu được tính trong tổng số 200 tế bào bạch cầu [17]. Tính mật độ từng loại bạch cầu bằng công thức:

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

(3)

Hoạt tính kháng khuẩn huyết thanh:

Vi khuẩn *E. ictaluri* được phục hồi, sau đó chúng được nuôi tăng sinh trong môi trường TSB, nuôi lắc ở nhiệt độ 28°C trong 18 giờ. Tiến hành thu sinh khối bằng cách ly tâm ở 5000 vòng/phút trong 5 phút, rồi tiếp tục rửa lại 2 lần bằng PBS. Điều chỉnh mật số vi khuẩn đạt 10^9 CFU/mL (trương đương OD= $1 \pm 0,2$ bước sóng 610 nm), rồi tiếp theo pha loãng dung dịch vi khuẩn về các dãy nồng độ giảm 10 lần bằng dung dịch PBS (1:9). Hoạt tính kháng khuẩn của huyết thanh được xác định bằng cách ủ 5 μ L vi khuẩn ở nồng độ pha loãng cuối với 50 μ L

huyết thanh cá trong 1 giờ ở 28°C. Hoạt tính kháng khuẩn huyết thanh được tính bằng cách đếm mật số vi khuẩn trong các ống trên môi trường TSA và so sánh mật số vi khuẩn giữa các nghiệm thức ăn thức ăn bổ sung các chất chiết lá khuyneh diệp ở các nồng độ khác nhau [18].

Tỷ lệ chết của cá tra sau cảm nhiễm:

$$\text{Tỷ lệ chết của cá (\%)} = \frac{\text{Tổng số cá chết}}{\text{Tổng số cá thí nghiệm}} \times 100 \quad (4)$$

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được thu thập và xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS 20.0, bao gồm phân tích phương sai một nhân tố (ANOVA) bằng phép thử Duncan để so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức ($p < 0,05$).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả huyết học và hoạt tính kháng huyết thanh của cá tra ăn thức ăn phối trộn chất chiết lá khuyneh diệp với các nồng độ khác nhau

3.1.1. Chỉ số huyết học

Số lượng hồng cầu, bạch cầu của cá tra sau 30 ngày ăn thức ăn bổ sung chất chiết lá khuyneh diệp được trình bày qua Bảng 1. Kết quả định lượng mật độ hồng cầu cho thấy tổng hồng cầu ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết khuyneh diệp không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p > 0,05$) với các giá trị dao động từ $2,28 \pm 0,16$ đến $2,48 \pm 0,20 \cdot 10^6$ tb/mm³. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận ở mật độ bạch cầu trung tính và tiểu cầu. Tuy nhiên, mật độ tổng số bạch cầu, bạch cầu đơn nhân và tế bào lympho ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết lá khuyneh diệp có sự tăng cường và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Đồng thời tại thời điểm này, khi so sánh tổng số bạch cầu, bạch cầu đơn nhân và tế bào lympho của cá tra ở các nghiệm thức bổ sung với các nồng độ chất chiết lá khuyneh diệp khác nhau thì không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Điều này cho thấy sự bổ sung chất chiết lá khuyneh diệp ở các nồng độ 1%, 1,5% và 2% vào thức ăn đều giúp cá tra có sự tăng cường về các thông số bạch cầu, bạch cầu đơn nhân và tế bào lympho. Theo Fox [19] số lượng bạch cầu chênh lệch là chỉ số thể hiện sức khỏe của cá.

Bảng 1. Chỉ số huyết học của cá tra ở các nghiệm thức điều trị bằng chất chiết lá khuyneh diệp

Nghiệm thức	ĐC	1% KD	1,5% KD	2% KD
Hồng cầu (10^6 tb/mm ³)	$2,28 \pm 0,16^a$	$2,44 \pm 0,25^a$	$2,48 \pm 0,20^a$	$2,36 \pm 0,18^a$
Bạch cầu (10^3 tb/mm ³)	$303,75 \pm 27,44^a$	$351,10 \pm 40,93^{ab}$	$365,89 \pm 31,85^b$	$358,68 \pm 13,70^{ab}$
Bạch cầu đơn nhân (10^3 tb/mm ³)	$23,31 \pm 1,15^a$	$27,11 \pm 1,63^b$	$28,12 \pm 1,18^b$	$25,84 \pm 0,93^b$
Bạch cầu trung tính (10^3 tb/mm ³)	$36,42 \pm 3,12^a$	$42,02 \pm 2,84^a$	$42,68 \pm 6,89^a$	$37,80 \pm 2,48^a$
Tế bào lympho (10^3 tb/mm ³)	$230,05 \pm 6,39^a$	$266,98 \pm 23,79^b$	$280,62 \pm 5,53^b$	$279,02 \pm 19,8^b$
Tiểu cầu (10^3 tb/mm ³)	$13,30 \pm 3,45^a$	$14,97 \pm 3,42^a$	$14,45 \pm 2,02^a$	$15,67 \pm 3,98^a$

Ghi chú: Giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. Các giá trị trên cùng một hàng ngang mang mẫu tự (a,b,c) giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Ở động vật, tế bào bạch cầu có vai trò quan trọng trong việc tham gia vào quá trình đáp ứng miễn dịch, cụ thể khi có sự xâm nhập của các vật lạ thì các tế bào bạch cầu này sẽ là yếu tố trực tiếp tham gia vào quá trình tăng cường miễn dịch như chúng tham gia vào việc nhận diện, thực bào các kháng nguyên để bảo vệ cơ thể [20]. Nghiên cứu này cho thấy sự thay đổi đáng kể về số lượng các tế bào lympho và bạch cầu đơn nhân ở nghiệm thức 1%, 1,5% và 2% chất chiết lá khuyneh diệp, điều này cho thấy cá được tăng cường sức khỏe ở các nghiệm thức này. Kết quả cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu ở cá rô phi về các thông số huyết học. Cụ thể, theo kết quả nghiên cứu của Nurudeen [14], tế bào lympho và bạch cầu trung tính của cá rô phi bị ảnh hưởng đáng kể bởi mức độ bổ sung chất chiết khuyneh diệp khác nhau. Tế bào lympho tăng lên khi mức độ tăng của chất chiết khuyneh diệp trong khẩu phần ăn, trong khi số lượng bạch cầu trung tính giảm theo sự tăng hàm lượng chất chiết khuyneh diệp trong khẩu phần ăn.

3.1.2. Hoạt tính kháng khuẩn huyết thanh của cá tra

Hoạt tính kháng khuẩn trong huyết thanh của cá tra ăn thức ăn có phối trộn chất chiết lá khuyneh diệt chống lại *E. ictaluri* là cao hơn đáng kể. Cụ thể, ở nghiệm thức bổ sung chất chiết lá khuyneh diệt khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$) thông qua khả năng diệt vi khuẩn *E. ictaluri*. Cụ thể, ở thời điểm 15 ngày sau khi cá được cho ăn nồng độ 2% chất chiết lá khuyneh diệt có hiệu quả hơn ở nghiệm thức bổ sung nồng độ 1% và 1,5% ($p < 0,05$). Tuy nhiên, ở thời điểm 30 ngày sau khi cho ăn, khả năng kháng khuẩn ở 2 nghiệm thức bổ sung 1% và 1,5% được tăng cường. Do đó, cả 3 nghiệm thức bổ sung chất chiết lá khuyneh diệt nồng độ 1%, 1,5% và 2% có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng với các giá trị đánh giá là mật số vi khuẩn *E. ictaluri* trong huyết thanh thấp hơn đáng kể $0,94 \pm 0,00 \times 10^3$ CFU/mL, $0,87 \pm 0,07 \times 10^3$ CFU/mL, $0,88 \pm 0,09 \times 10^3$ CFU/mL tương ứng (Bảng 2).

Bảng 2. Kết quả hoạt tính kháng khuẩn huyết thanh của cá tra ở các nghiệm thức điều trị bằng chất chiết lá khuyneh diệt

Nghiệm thức	Mật độ vi khuẩn ($\times 10^3$ CFU/mL)		
	Ngày 0	Ngày 15	Ngày 30
ĐC dương	$1,24 \pm 0,05^a$	$1,22 \pm 0,02^c$	$1,23 \pm 0,04^b$
1% KD	$1,18 \pm 0,03^a$	$1,00 \pm 0,07^b$	$0,94 \pm 0,00^a$
1,5% KD	$1,23 \pm 0,03^a$	$0,99 \pm 0,01^b$	$0,87 \pm 0,07^a$
2% KD	$1,21 \pm 0,03^a$	$0,88 \pm 0,05^a$	$0,88 \pm 0,09^a$

Ghi chú: Giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. Các giá trị trên cùng một cột mang mẫu tự (a,b,c) giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Không có nhiều đánh giá khả năng kháng khuẩn huyết thanh trên cá tra, tuy nhiên có nhiều nghiên cứu cho thấy khả năng kháng khuẩn của cá tra ăn thức ăn có phối trộn chất chiết thảo dược thông qua chỉ số lysozyme, hoạt tính lysozyme đánh giá khả năng diệt vi khuẩn Gram dương [6] - [8]. Tuy nhiên, ở hoạt tính kháng khuẩn huyết thanh trong nghiên cứu này cho thấy được hiệu quả chống lại vi khuẩn gây bệnh, cụ thể gây bệnh trên cá tra, đặc biệt vi khuẩn *E. ictaluri* là tác nhân chính gây bệnh gan thận mủ trên cá tra. Chỉ số này là một chỉ tiêu đánh giá về đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu của cá. Hoạt tính kháng khuẩn huyết thanh do bạch cầu không hạt chịu trách nhiệm chính [21], kết quả này gần như tương đồng với kết quả ghi nhận ở thông số huyết học.

Như vậy, dựa vào kết quả ghi nhận được về sự gia tăng tổng mật số bạch cầu, bạch cầu đơn nhân, tế bào lympho và hoạt tính kháng khuẩn huyết thanh của cá tra cho thấy việc bổ sung 1%, 1,5% và 2% chất chiết lá khuyneh diệt vào thức ăn, sau 30 ngày giúp cá tra có sự cải thiện về sức khỏe.

3.2. Kết quả chống lại vi khuẩn *E. ictaluri* của cá tra ăn thức ăn bổ sung chất chiết lá khuyneh diệt với các nồng độ khác nhau

3.2.1. Chỉ số huyết học và hoạt tính kháng khuẩn huyết thanh của cá tra cảm nhiễm *E. ictaluri*

Theo Basusta [22], để đánh giá tình trạng sức khỏe của cá thì một trong các chỉ số huyết học là những yếu tố cần được quan tâm, cụ thể là sự thay đổi về hàm lượng tăng hay giảm tế bào máu như hàm lượng hồng cầu, hàm lượng từng loại bạch cầu. Do đó, trong nghiên cứu này, sau 3 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*, các thông số huyết học và hoạt tính kháng khuẩn huyết thanh của cá tra được xác định để đánh giá khả năng tăng sức đề kháng chống lại mầm bệnh *E. ictaluri*. Cụ thể, ở nghiệm thức bổ sung chất chiết lá khuyneh diệt thì có chỉ số huyết học và hoạt tính kháng khuẩn huyết thanh cũng được tăng cường và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Đồng thời, hoạt tính kháng khuẩn huyết thanh cũng được tăng cường chống lại vi khuẩn *E. ictaluri* thông qua các nghiệm thức của cá tra ăn thức ăn phối trộn chất chiết lá khuyneh diệt ở những nồng độ khác nhau ($p < 0,05$) (Bảng 3).

Bảng 3. Chỉ số huyết học và hoạt tính kháng khuẩn huyết thanh của cá tra cảm nhiễm *E. ictaluri*

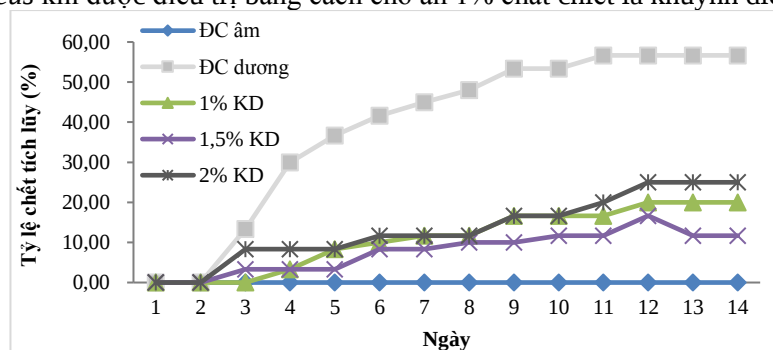
Nghiệm thức	ĐC âm	ĐC dương	1% KD	1,5% KD	2% KD
Hồng cầu (10^6 tb/mm ³)	2,40±1,01 ^a	2,50±0,32 ^{ab}	2,58±0,75 ^{ab}	2,68±2,09 ^b	2,50±0,28 ^{ab}
Bạch cầu (10^3 tb/mm ³)	365,32±19,63 ^{ab}	330,26±60,27 ^a	435,87±22,10 ^{bc}	463,48±57,86 ^c	403,07±26,99 ^{abc}
Bạch cầu đơn nhân (10^3 tb/mm ³)	25,93±2,71 ^a	32,24±4,81 ^{ab}	34,39±4,97 ^{bc}	39,31±0,82 ^c	31,90±1,75 ^{ab}
Bạch cầu trung tính (10^3 tb/mm ³)	47,29±3,82 ^a	35,31±3,93 ^a	49,13±6,64 ^a	51,11±6,62 ^a	47,66±3,11 ^a
Tế bào lympho (10^3 tb/mm ³)	276,43±21,30 ^{ab}	241,62±53,77 ^a	335,35±12,98 ^{bc}	357,14±49,26 ^c	307,23±34,97 ^{abc}
Tiểu cầu (10^3 tb/mm ³)	15,66±2,07 ^a	21,07±1,96 ^a	16,99±1,39 ^a	15,91±2,47 ^a	16,26±8,82 ^a
Hoạt tính kháng huyết thanh ($\times 10^3$ CFU/mL)	1,92±0,06 ^b	2,30±0,06 ^c	0,91±0,08 ^a	0,92±0,06 ^a	0,88±0,04 ^a

Ghi chú: Giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. Các giá trị trên cùng một hàng ngang mang mẫu tự (a,b,c,d) giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Trong một vài nghiên cứu trước đây cho thấy một số loại chất chiết có nguồn gốc từ thực vật cũng cho thấy có sự tăng cường các thông số huyết học. Cụ thể, tổng bạch cầu của cá tầm (*Huso huso*) ăn thức ăn bổ sung 6% chất chiết cây tầm ma (*Urtica dioica*) sau 8 tuần được tăng cường [23]. Bổ sung 3.000 mg/kg chất chiết từ nước ép quả bứa (*Garcinia gummigutta*) giúp cá tra tăng số lượng bạch cầu gấp 2 lần so với nghiệm thức đối chứng [24]. Hay chất chiết lá lựu (*Punica granatum*), diệp hạ châu (*Phyllanthus urinaria*), lá cách (*Premna serratifolia*) giúp cá tra tăng cường hệ thống miễn dịch thông qua các thông số miễn dịch đặc hiệu và không đặc hiệu, đồng thời giúp cá tra phòng được bệnh gan thận mù [6] – [8].

3.2.2. Tỷ lệ chết của cá tra khi cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*

Tất cả các nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* đều dẫn đến cá chết (Hình 1). Tuy nhiên, tỷ lệ cá chết ở nghiệm thức đối chứng dương (không bổ sung chất chiết lá khuyh diệp) là cao nhất với 56,67%, các nghiệm thức bổ sung chất chiết lá khuyh diệp với các nồng độ 1%, 1,5% và 2% thì thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p<0,05$), đặc biệt là nghiệm thức bổ sung 1,5% với tỷ lệ chết lần lượt là 20,00%, 11,67%, 25,00%. Một thí nghiệm trên tôm thẻ chân trắng cũng cho thấy hiệu quả bảo hộ tôm chống lại vi khuẩn *V. parahaemolyticus* khi được điều trị bằng cách cho ăn 1% chất chiết lá khuyh diệp [11].

**Hình 1.** Tỷ lệ chết của cá tra ở các nghiệm thức điều trị sau 14 ngày cảm nhiễm *E. ictaluri*

Hoạt động kháng khuẩn của khuyh diệp đã được chứng minh trong các nghiên cứu trước đó [25], [26]. Hiệu quả của chất chiết lá khuyh diệp như cá rô phi ăn chế độ 10 mL/500g trong 14 ngày đã có hiệu quả thúc đẩy hiệu suất tăng trưởng, hệ số chuyển đổi thức ăn thấp và làm tăng các chức năng huyết học và các thông số sinh hóa [14]. Được biết, liều lượng và thời gian của việc điều trị bằng chiết xuất thảo dược là những yếu tố chính thúc đẩy sự tăng cường đáp ứng miễn dịch và bảo vệ chống lại mầm bệnh. Đáp ứng miễn dịch có thể được kích hoạt đáng kể ở liều tối ưu, nhưng với liều quá cao, đáp ứng miễn dịch có thể không được tăng cường hoặc thậm chí còn bị ức chế [27]. Thời gian bổ sung thảo dược cũng là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến đáp ứng

miễn dịch của tôm và cá. Vì vậy, theo kiến nghị liều lượng và thời gian sử dụng thảo dược và các sản phẩm thảo dược cho cá và tôm từ 0,1% đến 10% và từ 14 ngày đến 70 ngày [28].

Theo Nezhad [29], hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất khuynh diệp góp phần vào các thành phần hoạt tính sinh học của nó như 1,8-cineole, citronellal, citronellol, citronellyl axetat, p-cymene, eucamalol, limonene, linalool, α -pinene, γ -terpinene, α -terpinol, oocimene và aromadendrene. Ngoài ra, trong lá của khuynh diệp có chứa hơn 70% cineol, là chất có hoạt tính diệt khuẩn [30], đồng thời một số chất còn có vai trò là chất chống oxy hóa [31]. Như vậy, từ những kết quả đạt được trong nghiên cứu này góp phần bổ sung thêm dữ liệu về khả năng ứng dụng chất chiết lá khuynh diệp trong nuôi trồng thủy sản.

4. Kết luận

Khi cá tra ăn thức ăn phối trộn 1,5% chất chiết lá khuynh diệp giúp tăng cường chỉ số huyết học, hoạt tính kháng khuẩn huyết thanh và chống lại vi khuẩn gây bệnh gan thận mù (*E. ictaluri*) trên cá tra. Tuy nhiên, cần có những nghiên cứu sâu hơn về tác động của chất chiết lá khuynh diệp lên một số chỉ tiêu khác như về tăng trưởng của cá tra hay về sự thay đổi số lượng một số gen qui định miễn dịch.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] M. Pavaraj, V. Balasubram, S. Baskaran, and P. Ramasamy, "Development of immunity by extract of medicinal plant *Ocimum sanctum* on common carp *Cyprinus carpio* (L.)," *J. Immuno. Res.*, vol. 4, pp. 12-18, 2011.
- [2] R. Harikrishnan, J. Kim, M. Kim, C. Balasundaram, and M. Heo, "Pomegranate enriched diet enhances the hematology, innate immune response and disease resistance in olive flounder against *Philasterides dicentrarchi*," *Vet. Parasitol.*, vol. 187, no. 1-2, pp. 147-156, 2012.
- [3] V. Sivaram, M. M. Babu, G. Immanuel, S. Murugadass, T. Citarasu, and M. P. Marian, "Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections," *Aquaculture*, vol. 237, no. 1-4, pp. 9-20, 2004.
- [4] G. Immanuel, R. P. Uma, P. Iyapparaj, T. Citarasu, S. M. Punitha Peter, M. Michael Babu, and A. Palavesam, "Dietary medicinal plant extracts improve growth, immune activity and survival of tilapia *Oreochromis mossambicus*," *J Fish Biol*, vol. 74, pp. 1462-1475, 2009.
- [5] P. Rattanachaikunsopon and P. Phumkhachorn, "Protective effect of clove oil-supplemented fish diets on experimental *Lactococcus graviae* infection in tilapia," *Biosci. Biotechnol. Biochem*, vol. 73, pp. 2085-2089, 2009.
- [6] T. B. H. Bui and T. T. H. Tran, "Effects of Pomegranate (*Punica granatum*) extract on growth performance and immune responses of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 56, pp. 161-169, 2020.
- [7] T. B. H. Bui and T. T. H. Tran, "Use of dietary chamberbitter (*Phyllanthus urinaria*) extract for prevention of Bacillary Necrosis in Pangasius (BNP) in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 56, pp. 149-160, 2020.
- [8] T. B. H. Bui and T. T. H. Tran, "Effect of dietary (*Premna serratifolia* L.) extract supplementation interval on immune response and disease resistance of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 57, pp. 169-180, 2021.
- [9] M. H. Salari, G. Amine, M. H. Shirazi, R. Hafezi, and M. Mohammadypour, "Antibacterial effects of *Eucalyptus globulus* leaf extract on pathogenic bacteria isolated from specimens of patients with respiratory tract disorders," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 12, p. 2, 2006.
- [10] L. Roomiani, M. Soltani, A. Akhondzadeh Basti, A. Mahmoodi, A. Taheri, A. Taheri Mirghaed, and F. Yadollahi, "Evaluation of the chemical composition and in vitro antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis*, *Zataria multiflora*, *Anethum graveolens* and *Eucalyptus globulus* against *Streptococcus iniae* the cause of zoonotic disease in farmed fish," *Iranian Journal of Fisheries Science*, vol. 12, pp. 702-716, 2013.
- [11] T. T. L. Nguyen, T. T. Luu, T. T. Nguyen, V. D. Pham, T. N. Nguyen, Q. P. Truong, and M. H. Hong, "A comprehensive study in efficacy of Vietnamese herbal extracts on whiteleg shrimp (*Penaeus*

- vannamei) against *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)," *Israeli Journal of Aquaculture*, vol. 75, no. 2, pp. 1-22, 2023.
- [12] N. Sheikhzadeh, M. Soltani, H. A. Ebrahimzadeh-Mousavi, A. R. Khosravi, H. Bagheri, A. Zargar, and E. Fathi, "Effects of *Eucalyptus globules* labill essential oil on some immunological variables of common carp (*Cyprinus carpio*)," *Iranian Veterinary Research Journal*, vol. 64, pp. 47-54, 2008.
- [13] M. Soltani, N. Sheikhzadeh, H. A. Ebrahimzadeh-Mousavi, and A. Zargar, "Effects of *Zataria multiflora* Essential oil on Innate Immune Responses of Common carp (*Cyprinus carpio*)," *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, vol. 5, no. 3, pp. 191-199, 2010.
- [14] N. D. Nurudeen, C. L. Ayisi, and A. Ampofo-Yeboah, "Effects of *Eucalyptus globulus* leaf extract on growth performance, feed utilization and blood biochemistry of Nile tilapia," *Oreochromis niloticus. Veterinaria*, vol. 71, no. 2, pp. 175-189, 2022.
- [15] N. K. P. Phung, *Fractionation Method for Organic Compounds*. Viet Nam National University Ho Chi Minh Press, 2007, p. 528.
- [16] M. P. Natt and C. A. Herrick, "A new blood diluent for counting erythrocytes and leukocytes of the chicken," *Poultry Science*, vol. 31, pp. 735-738, 1952.
- [17] T. C. Hrubec, J. L. Cardinale, and A. Smith, "Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis hybrid*)," *Vet. Clin. Path*, vol. 29, pp. 7-12, 2000.
- [18] A. M. M. Abd-El-Rhman, "Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*," *Fish & shellfish immunology*, vol. 27, no. 3, pp. 454-459, 2009.
- [19] H. E. Fox, S. A. White, M. F. Koa, and R. D. Fernald, "Stress and dominance in a social fish," *The Journal of Neuroscience*, vol. 16, no. 17, pp. 6463-6469, 1997.
- [20] D. N. Lien, *Basic immunology*. Hanoi National University Publishing House, 2004, p. 340.
- [21] A. M. Abd-El-Rhman, "Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*," *Fish & shellfish immunology*, vol. 27, no. 3, pp. 454-459, 2009.
- [22] G. A. Basusta, *Fish hematology and hematological techniques*, Research Techniques in Fish Biology, pp. 275-300, 2005.
- [23] M. Binaii, M. Ghiasi, S. M. V. Farabi, R. Ourgholam, H. Fazli, R. Safari, S. E. Alavi, M. J. Taghavi, and Z. Bankehsaz, "Biochemical and hemato-immunological parameters in juvenile beluga (*Huso huso*) following the diet supplemented with nettle (*Urtica dioica*)," *Fish and Shellfish Immunology*, vol. 36, pp. 46-51, 2014.
- [24] G. Prasad and G. L. Priyanka, "Effect of fruit rind extract of *Garcinia gummigutta* on haematology and plasma biochemistry of catfish *Pangasianodon hypophthalmus*," *Asian Journal Biochemistry*, vol. 6, pp. 240-251, 2011.
- [25] R. G. Bachir and M. Benali, "Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*," *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 2, no. 9, pp. 739-742, 2012.
- [26] L. Harkat-Madouri, B. Asma, K. Madani, Z. BO. S. Said, P. Rigou, D. Grenier, H. Allalou, H. Remini, A. Adjaoud, and L. Boulekbache-Makhlouf, "Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria," *Industrial Crops and Products*, vol. 78, pp. 148-153, 2015.
- [27] M. Reverter, N. Tapissier-Bontemps, P. Sasal, and D. Saulnier, *Use of medicinal plants in aquaculture*. Diagnosis and Control of Diseases of Fish and Shellfish, pp. 223-261, 2017.
- [28] R. Harikrishnan, C. Balasundaram, and M-S. Heo, "Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish," *Aquaculture*, vol. 317, no. 1-4, pp. 1-15, 2011.
- [29] F. M. Nezhad, H. Zeigham, A. Mota, M. Sattari, and A. Yadegar, "Antibacterial activity of *Eucalyptus* extracts on methicillin resistance *Staphylococcus aureus*," *Research Journal of Biological Sciences*, vol. 4, no. 8, pp. 905-908, 2009.
- [30] L. L. Esser, "Eucalyptus globules. In: Fire Effects Information System, Department of Agriculture, Forest Service Rocky Mountain Research Station, Fire Science Laboratory (Producer)," USDA, 1993.
- [31] A. Luis, A. Duarte, J. Gominho, F. Domingues, and A. P. Duarte, "Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils," *Ind Crop Prod*, vol. 79, pp. 274-82, 2016.