



DOI:10.22144/ctu.jsi.2020.014

ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT CHIẾT LỰU VÀ RIỀNG LÊN MỘT SỐ CHỈ TIÊU MIỄN DỊCH CỦA CÁ ĐIỀU HỒNG (*Oreochromis sp.*)

Trần Thị Mỹ Duyên^{1*}, Bùi Thị Bích Hằng¹, Nguyễn Trọng Tuân² và Trần Thị Tuyết Hoa¹

¹Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Thị Mỹ Duyên (email: tmduyen@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 21/10/2019

Ngày nhận bài sửa: 12/02/2020

Ngày duyệt đăng: 23/04/2020

Title:

Effect of *Alpinia officinarum* and *Punica granatum* extracts on immune responses of red tilapia (*Oreochromis sp.*)

Từ khóa:

Alpinia officinarum, cá điều hồng, lựu, riềng, chất kích thích miễn dịch, *Punica granatum*

Keywords:

Alpinia officinarum, immunostimulants, *Punica granatum*, red tilapia

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of *Alpinia officinarum* and *Punica granatum* extracts as feed additives on immune system of red tilapia (*Oreochromis sp.*). Experiment was set up with 5 treatments in triplicate, including control, 1% and 2% of *P. granatum* extract; 1% and 2% of *A. officinarum* extract. The feeding experiment lasted for 4 weeks. Results revealed that the number of erythrocytes (RBC), leucocytes (WBC), lymphocytes, monocytes, neutrophils and thrombocyte of fish fed the additive diets was significantly higher compared to the control, in which the treatment of 2% *A. officinarum* showed the highest ($p < 0.05$). Phagocytic and lysozyme activities were significantly increased in additive feed groups compared with those of the control. However, the haematological, phagocytic and lysozyme activities of additive feed fed groups after 4-week feeding were did not significantly differ from those of 2-week feeding.

TÓM TẮT

Nghiên cứu này đánh giá sự ảnh hưởng của bổ sung chất chiết riềng (*Alpinia officinarum*) và lựu (*Punica granatum*) vào thức ăn lên hệ miễn dịch của cá điều hồng (*Oreochromis sp.*). Thí nghiệm gồm 5 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần gồm đối chứng, bổ sung 1% và 2% chất chiết lựu/kg thức ăn, bổ sung 1% và 2% chất chiết riềng/kg thức ăn. Mẫu máu cá được thu sau 2 và 4 tuần sau khi cho ăn thức ăn có bổ sung có chứa chất chiết lựu và riềng. Mật độ hồng cầu, tổng bạch cầu, tế bào lympho, bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính của nghiệm thức bổ sung chất chiết lựu và riềng đều gia tăng cao hơn nghiệm thức đối chứng và khác biệt có ý nghĩa thống kê, trong đó nghiệm thức bổ sung 2% riềng tăng cao nhất. Hoạt tính đại thực bào và lysozyme ở nghiệm thức bổ sung chất chiết lựu và riềng cũng gia tăng cao hơn nghiệm thức đối chứng. Tuy nhiên, các chỉ tiêu huyết học, hoạt tính bổ thể và lysozyme ở các nghiệm thức bổ sung thức ăn sau 4 tuần không gia tăng cao hơn và có ý nghĩa thống kê so với sau 2 tuần cho ăn.

Trích dẫn: Trần Thị Mỹ Duyên, Bùi Thị Bích Hằng, Nguyễn Trọng Tuân và Trần Thị Tuyết Hoa, 2020. Ảnh hưởng của chất chiết lựu và riềng lên một số chỉ tiêu miễn dịch của cá điều hồng (*Oreochromis sp.*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(Số chuyên đề: Thủy sản)(1): 121-128.

1 GIỚI THIỆU

Cá điêu hồng (*Oreochromis sp.*) là một trong những đối tượng nuôi nước ngọt có giá trị kinh tế cao do chất lượng thịt ngon, giàu dinh dưỡng, khả năng tăng trưởng nhanh, dễ nhân giống và dễ thích nghi với điều kiện môi trường nuôi. Trên thế giới, cá điêu hồng phát triển rộng rãi tại một số nước như Philippines, Indonesia, Thái Lan, Malaysia, Trung Quốc, Chile, Mexico, Ecuador, Brazil (Huicab-Pech *et al.*, 2016). Cá điêu hồng được du nhập vào Việt Nam từ năm 1970 và trở thành một trong những đối tượng nuôi chủ lực của cả nước nói chung và Đồng bằng sông Cửu Long nói riêng. Tuy nhiên, sự thâm canh hóa và mở rộng số lượng lồng bè nuôi dẫn đến chất lượng môi trường nước giảm cùng với sự thay đổi bất thường của thời tiết gây ảnh hưởng xấu đến hệ miễn dịch của cá, tạo điều kiện thuận lợi cho các bệnh truyền nhiễm xâm nhập dẫn đến tổn thất cho người nuôi.

Trong thực tế, để hạn chế tổn thất do dịch bệnh gây ra người nuôi thường sử dụng kháng sinh để phòng trị. Tuy nhiên, việc lạm dụng kháng sinh trong quá trình nuôi đã dẫn đến những kết quả không mong muốn như dư lượng kháng sinh trong môi trường làm kích thích sự phát triển của các chủng vi khuẩn kháng kháng sinh, hay lượng kháng sinh tồn lưu trong thịt cá gây ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng (Cabello *et al.*, 2013). Tiêm phòng cũng là một biện pháp hữu hiệu để phòng bệnh cho cá, nhưng chi phí sử dụng vaccine cao, khó áp dụng rộng rãi và mỗi loại vaccine chỉ đặc hiệu cho một mầm bệnh cụ thể (Embregts and Forlenza, 2016). Sử dụng thảo dược như chất kích thích miễn dịch trong quá trình nuôi cá là một hướng đi mới hiện nay, vì chất kích thích miễn dịch không để lại bất kỳ dư lượng nào trong cơ thể cá và môi trường, không gây hại cho sức khỏe con người (Galindo-Villegas and Hosokawa, 2004). Trong số các loại thảo dược đã được nghiên cứu, lựu (*Punica granatum*) và riềng (*Alpinia officinarum*) là những thảo dược tiềm năng, có khả năng kích thích tăng trưởng, ngăn ngừa nhiễm khuẩn và nhiễm virus trên động vật thủy sản (Harikrishnan *et al.*, 2010a, 2010b; Badawi and Gomaa, 2016; Acar *et al.*, 2018). Nghiên cứu về khả năng tăng cường đáp ứng miễn dịch của lựu và riềng chưa được nghiên cứu trên cá điêu hồng. Nghiên cứu này thực hiện để đánh giá tác động của chất chiết lựu và riềng lên hệ miễn dịch của cá điêu hồng, làm cơ sở đề xuất biện pháp phòng bệnh cho cá điêu hồng.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Cá điêu hồng có trọng lượng 15-20 g/con được mua từ trại giống ở Tiền Giang, vận chuyển về phòng thí nghiệm Bộ môn Bệnh học Thủy sản – Khoa Thủy sản và thuần dưỡng trong bể composite 2 tuần trước khi bố trí thí nghiệm.

2.2 Chuẩn bị chất chiết thảo dược

Chất chiết lựu (*P. granatum*) và riềng (*A. officinarum*) được chiết xuất theo phương pháp của Nguyễn Kim Phi Phụng (2007). Cụ thể, phần thân củ riềng và thân lá lựu sau khi thu về loại bỏ phần sâu bệnh, rửa sạch và sấy khô ở nhiệt độ từ 40-45°C. Mẫu sau khi khô được xay nhuyễn thành mẫu bột nguyên liệu. Bột nguyên liệu được cho vào trong túi vải và ngâm trong dung môi methanol. Mẫu được ngâm 5 lần, mỗi lần ngâm khoảng 24 giờ, dịch chiết từ các lần ngâm được gom lại, cô quay đuổi dung môi thu được chất chiết thảo dược ở dạng cao, sau đó được hoà tan trong dung môi DMSO.

Chất chiết lựu hoặc riềng được trộn vào thức ăn (Proconcon C5004, 30% đạm) với nồng độ lần lượt là 1% và 2%. Sau đó thức ăn được áo với dầu mực để ngăn sự hoà tan của chất chiết trong nước. Thức ăn được để khô ở 30°C trong 3 giờ và bảo quản ở 4°C trong suốt quá trình cho cá ăn.

2.3 Bố trí thí nghiệm

Cá điêu hồng được nuôi trong bể composite 250 L với mật độ 40 cá/ bể. Các thông số môi trường được duy trì phù hợp trong suốt quá trình nuôi, nước bể nuôi được sục khí liên tục và thay 50% nước mỗi ngày. Thí nghiệm bổ sung chất chiết thảo dược được thiết kế gồm 5 nghiệm thức gồm đối chứng (không bổ sung chất chiết thảo dược), 1% chất chiết lựu, 2% chất chiết lựu, 1% chất chiết riềng, và 2% chất chiết riềng. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Cá được cho ăn thức ăn bổ sung chất chiết thảo dược liên tục trong 4 tuần, cho cá ăn lượng thức ăn bằng 3% trọng lượng thân với chế độ ăn 2 lần/ ngày. Thu mẫu máu cá vào tuần thứ 2 và thứ 4 sau khi cho ăn thức ăn bổ sung chất chiết thảo dược. Thu mẫu máu của 3 cá/ bể để thực hiện các chỉ tiêu huyết học gồm định lượng hồng cầu, định lượng và định loại bạch cầu, hoạt tính lysozyme và hoạt tính thực bào.

2.4 Phương pháp phân tích

Xác định các chỉ tiêu huyết học: máu cá được thu bằng ống tiêm 1 mL có tráng dung dịch heparin (Rotexmedic, Đức) và cho vào ống eppendorf.

Định lượng hồng cầu: hồng cầu được định lượng theo phương pháp của Natt and Herrick (1952). Cụ thể, 5 μ L máu được cho vào ống eppendorf có chứa sẵn 995 μ L dung dịch Natt & Herrick, lắc nhẹ cho đều mẫu. Mật độ hồng cầu được xác định bằng buồng đếm Naubeuer và được tính theo công thức:

$THC = C \times 10 \times 5 \times 200$ (tb/mm³) với C là tổng số hồng cầu trên 5 buồng đếm.

Định lượng bạch cầu và định loại bạch cầu: bạch cầu được định lượng và định loại theo phương pháp của Chinabut *et al.* (1991). Nhỏ 10 μ L máu lên lame rồi dùng lamelle chạm vào giọt máu và đẩy lamelle ngược về phía trước. Mẫu được để khô rồi cố định trong methanol 1 phút. Mẫu khi khô được nhuộm bằng dung dịch Wright and Giemsa theo thứ tự: (i) nhuộm với dung dịch Wright trong 5 phút; (ii) rửa trong dung dịch pH 6,2-6,8 trong 5 phút; (iii) nhuộm với dung dịch Giemsa trong 25 phút; (iv) rửa trong dung dịch pH 6,2 trong 20 phút và (v) rửa lại bằng nước cất. Để mẫu khô tự nhiên và quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 100X.

Tổng số bạch cầu được tính theo công thức:

$TBC = (\text{số BC trong } 1.500 \text{ tế bào} \times R) / \text{số HC trong } 1.500 \text{ tế bào}$ với TBC: mật độ tổng bạch cầu, BC: bạch cầu, R: mật độ hồng cầu, HC: hồng cầu

Định loại từng loại bạch cầu trong tổng số 200 tế bào bạch cầu. Mật độ từng loại bạch cầu được tính theo công thức:

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

Xác định hoạt tính lysozyme trong huyết thanh: hoạt tính lysozyme trong huyết thanh được đo theo phương pháp của Ellis *et al.* (1990) dựa theo sự phân giải vi khuẩn Gram dương *Micrococcus luteus* (M3770, Sigma) của enzyme lysozyme. Dụng cụ chuẩn lysozyme với dãy nồng độ thích hợp trong dung dịch đệm phosphate, pH 6,2. Cho 10 μ L dung dịch từ các nồng độ pha loãng vào đĩa 96 giếng, tiếp theo cho 200 μ L/giếng dịch huyền phù *Micrococcus luteus*. Máu cá sau khi thu được ly tâm 10.000 vòng/ phút trong 5 phút ở 4°C, rút huyết thanh để phân tích hoạt tính lysozyme. Đối với mẫu huyết thanh của cá cho 10 μ L vào đĩa 96 giếng, thêm 200 μ L/giếng vi khuẩn *Micrococcus luteus*. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ 27°C và đo ở bước sóng 530 nm trong 1 phút và 6 phút. Hoạt tính lysozyme được tính dựa vào đường chuẩn lysozyme. Một unit của

hoạt tính lysozyme được thể hiện bằng lượng enzyme làm giảm 0,001 giá trị của độ hấp thụ.

Phân tích hoạt tính đại thực bào: xác định hoạt tính đại thực bào dựa theo phương pháp của Ispir and Yonar (2007). Máu của cá được trộn với *Saccharomyces cerevisiae* trong ống eppendorf 1,5 mL theo tỉ lệ 1:1. Hỗn hợp được ủ 30 phút ở nhiệt độ 28 °C. Trộn hỗn hợp và trải đều mẫu trên lame kính. Để lame khô tự nhiên, cố định tế bào bằng dung dịch methanol trong 1 phút. Tiếp tục nhuộm với Giemsa trong 30 phút, rửa sạch bằng nước cất. Quan sát hoạt tính thực bào bằng kính hiển vi. Hoạt tính thực bào dựa trên tổng số tế bào thực bào trong 100 đại thực bào đếm được.

2.5 Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được nhập và tính trung bình \pm SD bằng phần mềm Excel. So sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức thông qua phân tích ANOVA 1 nhân tố với phép thử Duncan ở mức ý nghĩa $p = 0,05$ bằng chương trình SPSS 20.0.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của chất chiết lựu và riêng lên chỉ tiêu huyết học của cá điêu hồng

3.1.1 Mật độ hồng cầu

Kết quả định lượng hồng cầu cho thấy trong 2 đợt thu mẫu mật độ hồng cầu ở các nghiệm thức cho ăn thức ăn bổ sung thảo dược đều cao hơn so với nghiệm thức đối chứng, dao động từ $1,82 \times 10^6 - 2,57 \times 10^6$ tb/mm³ (Bảng 1). Sau 2 tuần cho cá ăn thức ăn có bổ sung chất chiết thảo dược, mật độ hồng cầu ở nghiệm thức 1% chất chiết riêng là cao nhất ($1,96 \times 10^6$ tb/mm³) và thấp nhất là nghiệm thức 1% chất chiết lựu ($1,84 \times 10^6$ tb/mm³), khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($1,17 \times 10^6$ tb/mm³) ($p < 0,05$), nhưng không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức cho ăn thức ăn có bổ sung chất chiết lựu và riêng ở các nồng độ khác nhau. Sau 4 tuần cho cá ăn thức ăn bổ sung, mật độ hồng cầu ở nghiệm thức 2% chất chiết riêng cao nhất ($2,57 \times 10^6$ tb/mm³), kế đến là nghiệm thức 1% chất chiết riêng ($2,53 \times 10^6$ tb/mm³), khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng, tuy nhiên không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức khác. Mật độ hồng cầu ở nghiệm thức 1% và 2% chất chiết lựu có tăng cao hơn so với nghiệm thức đối chứng nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Bảng 1: Mật độ hồng cầu ($\times 10^6$ tb/mm³) và bạch cầu ($\times 10^5$ tb/mm³) ở cá điều hồng sau khi cho ăn thức ăn bổ sung chất chiết lựu và riềng

Nghiệm thức	Hồng cầu ($\times 10^6$ tb/mm ³)		Bạch cầu ($\times 10^5$ tb/mm ³)	
	2 tuần	4 tuần	2 tuần	4 tuần
Đối chứng	1,17 ± 0,42 ^a	1,33 ± 0,46 ^a	0,82 ± 0,40 ^a	0,96 ± 0,32 ^a
1% chất chiết lựu	1,84 ± 0,35 ^b	1,82 ± 0,45 ^{ab}	1,36 ± 0,40 ^b	1,39 ± 0,60 ^{ab}
2% chất chiết lựu	1,95 ± 0,52 ^b	2,09 ± 0,69 ^{ab}	1,40 ± 0,28 ^b	1,63 ± 0,76 ^{ab}
1% chất chiết riềng	1,96 ± 0,32 ^b	2,52 ± 0,85 ^b	1,44 ± 0,28 ^b	1,84 ± 0,78 ^b
2% chất chiết riềng	1,92 ± 0,54 ^b	2,57 ± 0,58 ^b	1,47 ± 0,52 ^b	2,01 ± 0,51 ^b

(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 hồng cầu là một trong những chỉ tiêu miễn dịch quan trọng để đánh giá tình trạng sức khoẻ của cá. Kết quả nghiên cứu cho thấy mật độ hồng cầu ở các nghiệm thức của thí nghiệm dao động từ $1,17 \times 10^6 - 2,57 \times 10^6$ tb/mm³, phù hợp với kết quả ghi nhận của Glomski and Pica (2006) khi theo dõi sự biến đổi hồng cầu ở cá nước ngọt ($1 \times 10^6 - 3,5 \times 10^6$ tb/mm³). Hơn nữa, Acar *et al.* (2018) cũng ghi nhận mật độ hồng cầu tăng cao hơn nghiệm thức đối chứng khi bổ sung dầu hạt lựu ở các nồng độ 0,5%; 1% và 2% vào thức ăn cho cá hồi *Onchoryhynchus mykiss* trong thời gian 2 tháng. Nghiên cứu đáp ứng miễn dịch của cá điều hồng sau khi ăn thức ăn có bổ sung tỏi được Mai Thanh Thanh và Bùi Thị Bích Hằng (2018) cũng cho thấy mật độ hồng cầu có sự gia tăng so với đối chứng, nhưng không có khác biệt có ý nghĩa thống kê. Dấu hiệu tăng cường tổng hồng cầu ở cá sau khi bổ sung chất chiết xuất lựu và riềng trong nghiên cứu này và trong các nghiên cứu liên quan trước đây có thể biểu thị khả năng kích thích tạo hồng cầu, và do đó tăng khả năng mang oxy và tăng cường cơ chế phòng thủ chống lại các tác động của môi trường sống. Tác động này có thể là do các vitamin, khoáng chất và các axit amin thiết yếu có trong chất chiết riềng và lựu, rất cần thiết cho quá trình tổng hợp của hồng cầu (Bhowmik *et al.*, 2013).

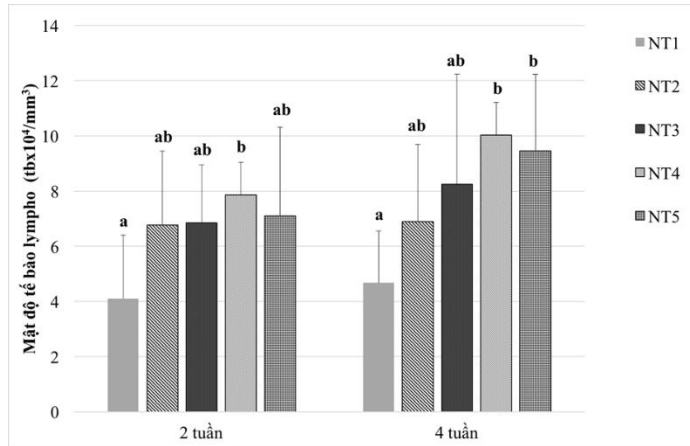
3.1.2 Mật độ tổng bạch cầu

Sau 2 tuần bổ sung thảo dược, mật độ tổng bạch cầu ở các nghiệm thức đều tăng cao hơn so với nghiệm thức đối chứng, khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) (Bảng 1). Trong đó, nghiệm thức 2% chất chiết riềng có tổng bạch cầu cao nhất ($1,47 \times 10^5$ tb/mm³), nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức khác. Tổng bạch cầu của cá sau 4 tuần cho ăn thức ăn bổ sung chất chiết thảo dược tăng cao hơn sau 2 tuần cho ăn nhưng không

có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), riêng nghiệm thức 2% chất chiết riềng thì mật độ bạch cầu sau 4 tuần cho ăn thức ăn bổ sung vẫn cao nhất ($2,01 \times 10^5$ tb/mm³), khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với sau 2 tuần cho ăn.

3.1.3 Mật độ các loại tế bào bạch cầu

Sau 2 tuần bổ sung chất chiết lựu và riềng, mật độ tế bào lympho ở các nghiệm thức được bổ sung tăng cao hơn nghiệm thức đối chứng (Hình 1). Mật độ tế bào lympho sau 4 tuần cho ăn thức ăn bổ sung chất chiết lựu và riềng tăng cao hơn sau hơn 2 tuần cho ăn. Trong cả 2 đợt thu mẫu, nghiệm thức 1% chất chiết riềng đều có số lượng tế bào lympho cao nhất nhưng chỉ khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng sau 4 tuần cho ăn. Lượng tế bào lympho ở 2% chất chiết riềng đều cao hơn so với nghiệm thức đối chứng ở cả 2 lần thu mẫu nhưng chỉ khác biệt có ý nghĩa thống kê sau 4 tuần cho ăn ($p < 0,05$). Tương tự, mật độ bạch cầu đơn nhân ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết thảo dược tăng cao hơn so với nghiệm thức đối chứng ở cả 2 lần thu mẫu và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở đợt thu mẫu sau 2 tuần cho ăn, tuy nhiên khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức ($p > 0,05$). Lượng bạch cầu đơn nhân ở nghiệm thức 2% chất chiết riềng vẫn tăng cao nhất ở cả 2 lần thu mẫu và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng. Sau 2 đợt thu mẫu, lượng tế bào bạch cầu trung tính và tiêu cầu đều gia tăng ở các nghiệm thức có bổ sung chất chiết thảo dược, tuy nhiên không khác biệt thống kê so với nghiệm thức đối chứng. Chỉ có nghiệm thức 1% chất chiết riềng khác biệt có ý nghĩa thống kê ở chỉ tiêu bạch cầu trung tính; nghiệm thức 2% chất chiết lựu và nghiệm thức 2% chất chiết riềng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở chỉ tiêu tiêu cầu.

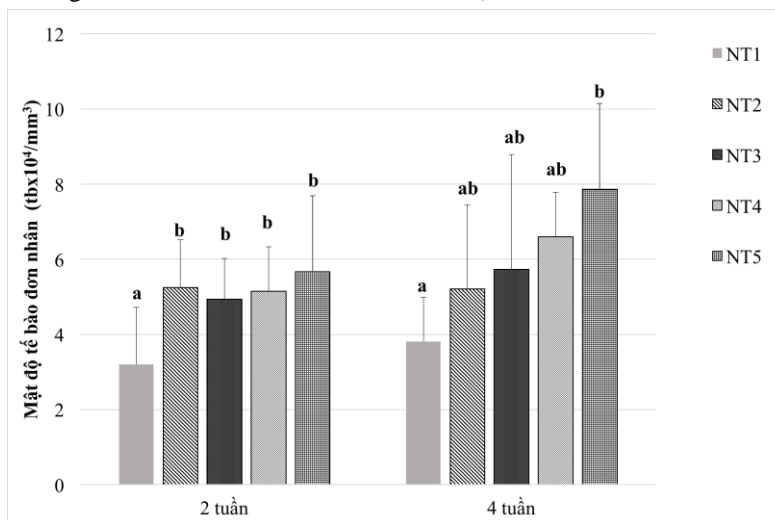


Hình 1: Mật độ tế bào lympho của cá điêu hồng sau 2 và 4 tuần bổ sung chất chiết lựu và riềng

(Ghi chú: giá trị thể hiện là số trung bình ± độ lệch chuẩn của 3 lần lặp lại thí nghiệm. Các giá trị có ký tự giống nhau trong một đợt thu mẫu (a, b) thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$))

Tế bào bạch cầu được xem là hàng rào bảo vệ đầu tiên, có khả năng thực bào và đáp ứng miễn dịch chống lại sự xâm nhập của các tác nhân lạ vào cơ thể (Kumar *et al.*, 2013). Trong nghiên cứu này, sự gia tăng tổng bạch cầu đã chứng tỏ khả năng kích thích gây ra đáp ứng miễn dịch của chất chiết lựu và riềng đối với cá. Nguyên nhân có thể do chất chiết lựu và riềng có thành phần hoá học bao gồm flavonoids, alkaloid và một số hợp chất chống oxy hoá, có khả năng tăng cường hệ miễn dịch (Hai, 2015). Kết quả này tương tự ghi nhận của Ndong and Fall (2011) khi quan sát thấy tổng bạch cầu của cá rô phi lai (*Oreochromis niloticus* × *O. Aureus*) tăng đáng kể khi bổ sung 1% tỏi vào thức ăn và cho

ăn trong 4 tuần. Ngoài ra, Nya and Austin (2009) cho thấy rằng mật độ tổng bạch cầu, mật độ tế bào lympho, bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính đều tăng cao hơn so với nghiệm thức đối chứng khi bổ sung gừng *Zinger officinale* (cùng họ với riềng) vào thức ăn của cá hồi với các nồng độ 0,05; 0,1; 0,5 và 1 g/ 100 g thức ăn nhưng mật độ tiểu cầu không gia tăng trong. Kết quả của nghiên cứu này phù hợp với công bố của Nya and Austin (2009).. Mặt khác, mật độ tổng bạch cầu cũng như mật độ mỗi loại bạch cầu thấp hơn khi bổ sung chất chiết từ rong biển vào thức ăn của cá điêu hồng giống ở các nồng độ 2,5%; 5% và 7,5% trong thời gian 15 ngày (Mastoi *et al.*, 2012).



Hình 2: Mật độ bạch cầu đơn nhân của cá điêu hồng sau 2 và 4 tuần bổ sung chất chiết lựu và riềng

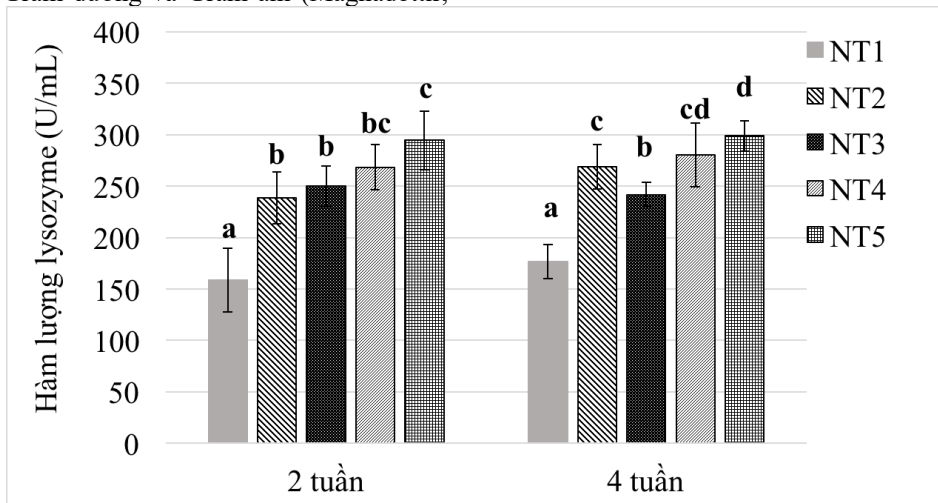
(Ghi chú: giá trị thể hiện là số trung bình ± độ lệch chuẩn của 3 lần lặp lại thí nghiệm. Các giá trị có ký tự giống nhau trong một đợt thu mẫu (a, b) thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$))

3.2 Hoạt tính lysozyme

Sau 2 tuần cho ăn thức ăn có bổ sung chất chiết lựu và riêng, kết quả phân tích hoạt tính lysozyme trong huyết thanh cá ở nghiệm thức bổ sung chất chiết tăng cao hơn so với đối chứng. Trong đó, hoạt tính lysozyme ở nghiệm thức 2% chất chiết riêng (294,4 U/mL) tăng cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với các nghiệm thức còn lại (Hình 3). Hoạt tính lysozyme của nghiệm thức 1% và 2% chất chiết lựu cũng gia tăng cao hơn so với nghiệm thức đối chứng và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Sau 4 tuần bổ sung lựu và riêng, hoạt tính lysozyme ở nghiệm thức bổ sung thảo dược đều cao hơn nghiệm thức đối chứng và thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Lysozyme là một protein kháng khuẩn thông qua cơ chế thủy phân liên kết glycosic của vách tế bào vi khuẩn, và thường được sử dụng như một chỉ số phản ứng miễn dịch không đặc hiệu để bảo vệ chống lại sự xâm nhập của mầm bệnh (Uribe *et al.*, 2011). Ngoài ra, lysozyme còn có khả năng phá vỡ tế bào vi khuẩn Gram dương và Gram âm (Magnadóttir,

2006). Trong nghiên cứu này, kết quả cho thấy sự gia tăng hoạt động lysozyme trong các nghiệm thức được cho ăn thức ăn có bổ sung chất chiết lựu và riêng. Kết quả này tương tự khi bổ sung chất chiết lựu (*P. granatum*) với nồng độ 100 mg/kg của trọng lượng cá bón, hoạt tính lysozyme tăng cao và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng, nhưng ở nồng độ 5 và 50 mg/kg không thể gia tăng hoạt tính lysozyme (Harikrishnan *et al.*, 2010a). Khi bổ sung hỗn hợp gồm 3 loại thảo dược lựu (*P. granatum*), cúc (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) và xuyên tiêu (*Zanthoxylum schinifolium*), hoạt tính lysozyme tăng cao so với đối chứng ở nồng độ 50 mg/kg và 100 mg/kg trọng lượng cơ thể cá bón (Harikrishnan *et al.*, 2010b). Tuy nhiên, khi bổ sung dầu chiết xuất từ hạt lựu ở các nồng độ khác nhau gồm 0; 0,5%, 1%, và 2% vào thức ăn cho cá hồi ăn trong thời gian 2 tháng, hoạt tính lysozyme không tăng cao hơn so với nghiệm thức đối chứng (Acar *et al.*, 2018). Do đó, tăng cường hoạt động lysozyme có thể tác động đến tình trạng miễn dịch của cá (Fletcher *et al.*, 2011) và là chỉ số quan trọng về khả năng phòng vệ miễn dịch ở cá (Ellis, 2001).



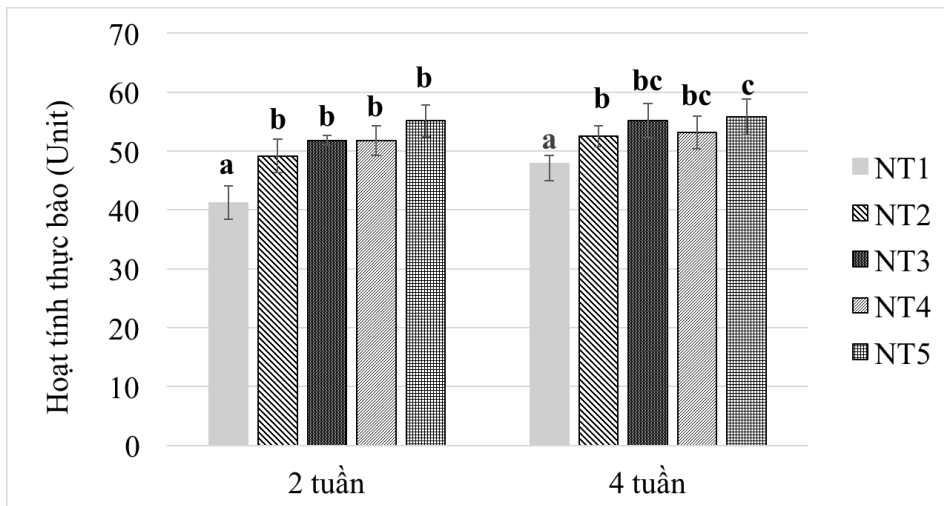
Hình 3: Hoạt tính lysozyme của cá điều hồng sau 2 và 4 tuần bổ sung chất chiết lựu và riêng

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

3.3 Hoạt tính đại thực bào

Hoạt tính đại thực bào của cá ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết lựu và riêng đều tăng cao so với nghiệm thức đối chứng ở cả 2 đợt thu mẫu (Hình 4). Trong đó nghiệm thức 2% chất chiết riêng tăng cao nhất và có khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng trong mỗi đợt thu mẫu. Ở

đợt thu sau 2 tuần cho ăn, hoạt tính đại thực bào của các nghiệm thức tăng cao so với đối chứng và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Tuy nhiên, sau 4 tuần bổ sung chất chiết thảo dược, chỉ có hoạt tính thực bào ở nghiệm thức 1% chất chiết lựu và nghiệm thức 2% chất chiết riêng tăng cao so với nghiệm thức đối chứng và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).



Hình 4: Hoạt tính thực bào của cá điều hồng sau 2 và 4 tuần bổ sung chất chiết lựu và riềng

Hoạt tính đại thực bào được ghi nhận là một yếu tố quan trọng trong hệ thống bảo vệ của vật chủ chống lại các vi sinh vật xâm nhập và tạo thành một đặc tính quan trọng của hệ thống miễn dịch không đặc hiệu. Hoạt tính đại thực bào của cá tăng cao hơn khi cho ăn thức ăn có bổ sung chất chiết thảo dược, kết quả này tương tự khi thực hiện thí nghiệm bổ sung chất chiết lựu (*P. granatum*) (Harikrishnan *et al.*, 2010a), hoặc bổ sung hỗn hợp gồm 3 loại thảo dược gồm lựu (*P. granatum*), cúc (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) và xuyên tiêu (*Zanthoxylum chinifolium*) bằng phương pháp tiêm vào cá bon *Paralichthys olivaceus* (Harikrishnan *et al.*, 2010b). Cá bon được tiêm chất chiết lựu với 4 nồng độ khác nhau gồm 0, 5, 50 và 100 mg/kg khối lượng cá và được theo dõi trong 8 tuần, kết quả cho thấy hoạt tính đại thực bào ở nghiệm thức 50 và 100 mg/kg tăng cao hơn nghiệm thức đối chứng và khác biệt có ý nghĩa thống kê, nhưng khác biệt này không có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức 5 mg/kg. Tương tự thí nghiệm bổ sung 3 loại thảo dược được theo dõi trong 30 ngày, cho thấy hoạt tính tổng thể ở nghiệm thức 50 và 100 mg/kg tăng cao có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng, ngược lại ở nồng độ bổ sung 5 mg/kg không thể hiện sự gia tăng hoạt tính đại thực bào.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Cá điều hồng được bổ sung thức ăn có chứa chất chiết lựu và riềng với các hàm lượng khác nhau có sự đáp ứng miễn dịch sau 4 tuần, đặc biệt là có sự tăng cao so với nghiệm thức đối chứng. Chế độ bổ sung chất chiết lựu *P. granatum* 1% và riềng *A. officinarum* 2% vào thức ăn có khả năng tăng cường miễn dịch cho cá điều hồng bằng dựa trên các chỉ số

huyết học (tổng hồng cầu, tổng bạch cầu, lymphocytes, bạch cầu đơn nhân), tăng cường hoạt tính lysozyme và đại thực bào. Sự ảnh hưởng của chất chiết lựu và riềng lên cá điều hồng cần tiếp tục nghiên cứu khả năng kháng bệnh cũng như khảo sát ở quy mô ao nuôi để có thể ứng dụng trong thực tế.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này đã được tài trợ bởi Dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 bằng nguồn vốn vay ODA từ chính phủ Nhật Bản

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Acar, Ü., Parrino, V., Kesbiç, O.S., *et al.*, 2018. Effects of different levels of pomegranate seed oil on some blood parameters and disease resistance against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout. *Frontier Physiology*. 9: 1–7.
- Badawi, M.E., and Gomaa, A.M., 2016. Influence of diets supplemented with pomegranate peel extract on performance in oreochromis niloticus. *Japanese Journal Veterinary Research*. 64: S87–S94.
- Bhowmik, D., Gopinath, H., Kumar, B.P., Duraivel, S., Aravind, G., and Kumar, K.P.S., 2013. Medicinal uses of *Punica granatum* and its health benefits. *Journal of Pharmacology and Phytochemistry*. 1: 28–35.
- Cabello, F.C., Godfrey, H.P., Tomova, A., *et al.*, 2013. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: Its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology*. 15: 1917–1942.
- Embregts, C.W.E., and Forlenza, M., 2016. Oral vaccination of fish: Lessons from humans and veterinary species. *Developmental and Comparative Immunology*. 64: 118–137.

- Fletcher, G.L., Hobbs, R.S., Evans, R.P., Shears, M.A., Hahn, A.L., and Hew, C.L., 2011. Lysozyme transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research*. 42: 427–440.
- Galindo-Villegas, J., and Hosokawa, H., 2004. Immunostimulants: towards temporary prevention of diseases in marine fish. *Advanced and Nutrition. Acuicola VII Memorias Del VII Simp.* 16–19.
- Hai, N.V., 2015. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review. *Aquaculture*. 446: 88–96.
- Harikrishnan, R., Heo, J., Balasundaram, C., et al., 2010a. Effect of traditional Korean medicinal (TKM) triherbal extract on the innate immune system and disease resistance in *Paralichthys olivaceus* against *Uronema marinum*. *Veterinary Parasitology*. 170: 1–7.
- Harikrishnan, R., Heo, J., Balasundaram, C., et al., 2010b. Effect of *Punica granatum* solvent extracts on immune system and disease resistance in *Paralichthys olivaceus* against lymphocystis disease virus (LDV). *Fish Shellfish Immunology*. 29: 668–673.
- Huicab-Pech, Z.G., Landeros-Sánchez, C., Castañeda-Chávez, M.R., Lango-Reynoso, F., López-Collado, C.J., and Platas Rosado D.E., 2016. Current state of bacteria pathogenicity and their relationship with host and environment in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Journal of Aquaculture Research and Development*. 7: 1–10.
- Kumar, S., Raman, R.P., Pandey, P.K., Mohanty, S., Kumar, A., and Kumar, K., 2013. Effect of orally administered azadirachtin on non-specific immune parameters of goldfish *Carassius auratus* (Linn. 1758) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*. 34: 564–573.
- Magnadóttir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunology*, 20: 137–151.
- Mai Thanh Thanh và Bùi Thị Bích Hằng, 2018. Ảnh hưởng của việc bổ sung tỏi (*Allium sativum*) vào thức ăn lên một số chỉ tiêu miễn dịch và khả năng kháng khuẩn của cá điêu hồng (*Oreochromis* sp.). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 54(2): 168 - 176.
- Mastoi, A.M., Sukumaran, M., Mastoi, A., Hussan, A., Shaharom, F., and Chatterji, A., 2012. Differences in haematological parameters in normal, infected and immune-primed fingerlings of red tilapia (*Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis niloticus*). *Biology Forum - An International Journal*, 4: 90–97.
- 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.
- Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007. Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh. TP. Hồ Chí Minh. 538 trang.
- Nya, E.J., and Austin, B., 2009. Use of dietary ginger, *Zingiber officinale Roscoe*, as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*. 32: 971–977.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., and Moran, G., 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: A review. *Veterinary Medicine (Praha)*. 56: 486–503.