

ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT CHIẾT LÁ KHUYNH DIỆP LÊN KHẢ NĂNG KHÁNG *Edwardsiella ictaluri*, GÂY BỆNH GAN THẬN MỦ VÀ MỘT SỐ CHỈ SỐ HUYẾT HỌC TRÊN CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Trần Bửu Tài¹, Nguyễn Thị Trúc Linh^{1,*}

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của chất chiết lá khuynh diệp (*Eucalyptus globulus*) lên hoạt tính kháng *Edwardsiella ictaluri*, gây bệnh gan thận mủ và xác định một số chỉ số huyết học trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Kết quả đã cho thấy, khả năng kháng khuẩn của chất chiết lá khuynh diệp bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch, đồng thời xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) bằng phương pháp pha loãng nồng độ. Chất chiết lá khuynh diệp có hoạt tính kháng *Edwardsiella ictaluri*, với đường kính vòng vô trùng 23 mm; MIC, MBC tương ứng 1,56 mg/mL và 3,12 mg/mL. Kết quả chỉ số huyết học đã thể hiện rõ việc bổ sung chất chiết từ lá khuynh diệp giúp làm gia tăng có ý nghĩa số lượng tổng hồng cầu, tổng bạch cầu nói chung và các loại bạch cầu nói riêng so với đối chứng ở liều bổ sung 1%.

Từ khóa: Cá tra, chất chiết lá khuynh diệp, chỉ số huyết học, *Edwardsiella ictaluri*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh gan thận mủ do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây ra trên cá tra nuôi ở tất cả các giai đoạn, tỉ lệ hao hụt có thể lên đến 90% [1]. Một số biện pháp được đề xuất trong phòng trị bệnh là sử dụng kháng sinh và biện pháp sinh học. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh một cách phổ biến trong điều trị bệnh vi khuẩn đã và đang dẫn đến hiện tượng kháng kháng sinh của các loài vi khuẩn gây bệnh trên cá [1]. Đa số vi khuẩn *E. ictaluri* trên cá tra đã kháng với một số loại thuốc kháng sinh như: Streptomycin, oxytetracycline, trimethoprim và kháng với nhóm quinolone như: Flumequin, axit oxolinic và enrofloxacin [2]. Trong khi đó, hầu hết vi khuẩn đã kháng thuốc tự nhiên đối với kháng sinh colistin (polypeptide) [2]. Do đó, việc phòng trị bệnh gan thận mủ theo hướng an toàn sinh học, góp phần giảm ô nhiễm môi trường và nâng cao chất lượng cá tra xuất khẩu trên thị trường thế giới. Có thể nói, việc sử dụng thảo dược được coi là giải pháp an toàn thay thế kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản [3].

Thảo dược được đánh giá là có hiệu quả trong 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 miễn dịch chống lại mầm bệnh [4, 5]. Chiết xuất thảo dược được ghi nhận có hoạt tính kháng khuẩn cao, tăng cường hệ miễn dịch, ít ảnh hưởng đến môi trường và không gây hại cho con người [6].

Cây khuynh diệp có tên khoa học *Eucalyptus*, thuộc họ Sim *Myrtaceae* chứa 23 hợp chất được nhận diện trong tinh dầu từ lá bạch đàn thứ sinh, chiếm tỷ lệ 99,52% [7]. Thành phần chính là 1,8-cineole (38,34), α -pinene (18,86%), α -Terpinyl acetate (9,00%) [8]. Ngoài ra, tinh dầu từ lá bạch đàn có khả năng ức chế cả vi khuẩn Gram (+) và Gram (-) [9]. Một nghiên cứu khác của Nguyễn Thị Trúc Linh và Mai Văn Hoàng (2023) [10] cũng đã xác định chất chiết lá khuynh diệp có khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm thẻ chân trắng khi phối trộn chất chiết lá khuynh diệp với tỷ lệ 1 - 1,5% đã làm tăng hệ miễn dịch không đặc hiệu trên tôm thẻ chân trắng.

¹ Trường Đại học Trà Vinh

*Email: tructinh@tvu.edu.vn

Các nghiên cứu trước đây cho thấy, kết quả đầy hứa hẹn về khả năng kháng vi khuẩn của chất chiết lá khuy nh diệp cũng như việc tăng cường hệ thống miễn dịch và khả năng kháng khuẩn gây bệnh gan thận mủ trên cá tra.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Lá khuy nh diệp (*Eucalyptus globulus*) được thu hái tại khóm 4, phường 5, thành phố Trà Vinh, tỉnh Trà Vinh.

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

Cá tra có khối lượng 15 g/con, những con cá này khỏe mạnh và không mang mầm bệnh.

2.2. Phương pháp trích ly chất chiết thảo dược

Lá khuy nh diệp được rửa sạch và làm khô, sau đó được nghiền thành bột mịn. Bột lá khuy nh diệp được ngâm trong dung môi ethanol theo tỉ lệ 1: 10 trong 5 ngày. Lọc lấy dịch chiết, sau đó dung dịch này được cô quay chân không để loại bỏ dung môi và thu được chất chiết thô [11]. Chất chiết được bảo quản ở 4°C để thực hiện thí nghiệm khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và sử dụng cho thí nghiệm cho ăn.

2.3. Phương pháp xác định khả năng kháng khuẩn của chất chiết thảo dược

2.3.1. Xác định hoạt tính kháng khuẩn

Các bước chuẩn bị vi khuẩn được thực hiện theo Abutbul và cs (2004) [12]. Đĩa giấy tẩm chất chiết lá khuy nh diệp được thực hiện theo Nezhad và cs (2009) [13]. Sau đó, dùng tăm bông tiết trùng trải đều vi khuẩn *E. ictaluri* đã chuẩn bị lên mặt đĩa thạch TSA (Tryptone Soya Agar, Meck), tiến hành đặt đĩa tẩm chất chiết khuy nh diệp lên đĩa. Đồng thời, đĩa tẩm DMSO (Dimethyl Sulfoxide) được sử dụng làm đối chứng. Ủ đĩa ở 28°C trong 48 giờ. Khả năng kháng khuẩn của chất chiết khuy nh diệp được xác định bằng cách đo đường kính vòng kháng khuẩn [14].

2.3.2. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC - Minimum inhibitory concentration)

Việc xác định nồng độ ức chế tối thiểu được thực hiện theo Oonmetta-aree và cs (2006) [14]. Chất chiết được pha loãng theo cơ số 2 với nồng độ giảm dần từ 25 - 0,025 mg/mL, trong mỗi ống nghiệm có chứa sẵn môi trường LB (Luria Bertani Broth, Himedia, Ấn Độ), sau đó bổ sung vi khuẩn *E. ictaluri*. Mẫu đối chứng dương là mẫu không bổ sung chất chiết chỉ bổ sung vi khuẩn và dung môi DMSO. Mẫu đối chứng âm là mẫu không bổ sung vi khuẩn. Các ống nghiệm ủ ở 28°C lắc trong 48 giờ. MIC của chất chiết từ lá khuy nh diệp được xác định là nồng độ thấp nhất của chất chiết trong môi trường lỏng không có vi khuẩn phát triển.

2.3.3. Xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC - Minimum bacterial concentration)

Các ống nghiệm được xác định là các nồng độ ức chế tối thiểu sử dụng để xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu. MBC được xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc vi khuẩn *E. ictaluri* trên đĩa môi trường TSA. Cụ thể, trải 100 μ L huyền phù từ các ống nghiệm nồng độ ức chế sự phát triển của vi khuẩn lên môi trường TSA, sau đó ủ ở 28°C trong 48 giờ. Giá trị MBC của chất chiết thảo dược được xác định là nồng độ thấp của chất chiết trong môi trường lỏng không có vi khuẩn phát triển trên đĩa môi trường TSA [14].

2.3.4. Ảnh hưởng của chất chiết lá khuy nh diệp lên một số chỉ tiêu huyết học trên cá tra

Cá tra có kích cỡ 15 g/con được nuôi trong bể composite 250 L với mật độ 30 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 lá khuy nh diệp được thiết kế 4 nghiệm thức gồm: Đối chứng (không bổ sung chất chiết khuy nh diệp), 1% chất chiết lá khuy nh diệp, 1,5% chất chiết lá khuy nh diệp và 2% chất chiết lá khuy nh diệp. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Cá được cho ăn thức ăn bổ sung chất chiết lá khuy nh diệp liên tục trong 30 ngày, cho cá ăn lượng thức ăn bằng 3% khối lượng thân với chế độ ăn 2 lần/ngày. Theo dõi chỉ tiêu huyết học được xác định ở thời điểm ngày thu 15 và 30 ngày sau khi ăn thức ăn chứa các nồng độ chất chiết lá khuy nh diệp khác nhau.

Các chỉ tiêu theo dõi:

- Các yếu tố môi trường: pH, TAN, độ kiềm, NO₂ được theo dõi mỗi ngày 1 lần bằng bộ test kit Sera. Nhiệt độ được đo bằng nhiệt kế thủy ngân của Công ty Lê Anh, Việt Nam.

- Thông số huyết học:

Định lượng hồng cầu: Thực hiện theo phương pháp của Natt và Herick (1952) [15]. Mật độ hồng cầu được xác định bằng buồng đếm Neubauer và tính theo công thức:

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

Trong đó: C là tổng số hồng cầu của 5 vùng đếm.

Định lượng bạch cầu: Phân tích theo phương pháp của Hrubec và cs (2000) [16]. Một giọt máu của cá tra được trải lên lame, sau đó để khô và cố định bằng methanol trong 1 phút, tiếp tục nhuộm mẫu với Wright & Giemsa. Tổng số lượng bạch cầu được tính theo công thức:

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

Trong đó: 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 [16], tính mật độ từng loại bạch cầu theo công thức: Mật độ loại bạch cầu (tb/mm³) = (Số lượng mỗi loại bạch cầu x TBC)/200.

2.4. Phương pháp phân tích số liệu

Phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm SPSS, phân tích phương sai một nhân tố (ANOVA). Sử dụng phép thử Duncan để so sánh sự khác biệt giữa các phương pháp điều trị (p<0,05).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng kháng *E. ictaluri* của chất chiết lá khuynh diệp

Kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn của chất chiết khuynh diệp được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Hoạt tính kháng khuẩn, nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của chất chiết khuynh diệp đối với *E. ictaluri*

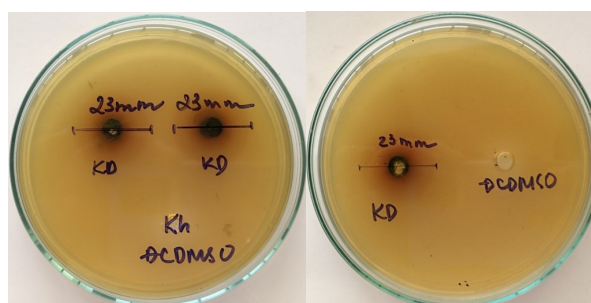
Thảo dược	Vòng vô khuẩn (mm)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MBC/MIC
Khuynh diệp	23	1,56	3,12	2

Ghi chú: Kháng: ≤ 9 mm; trung bình: ≥ 10 - 13 mm; nhạy: ≥ 14 mm [17]; đối chứng Dimethyl Sulfoxide.

Kết quả xác định hoạt tính kháng khuẩn của chất chiết lá khuynh diệp khảo sát (Bảng 1, hình 1) cho thấy, đường kính vô khuẩn là 23 mm và đối chứng âm DMSO có vòng kháng khuẩn là 0 mm. Kết quả nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của chất chiết lá khuynh diệp lên *E. ictaluri* là 1,56 mg/mL và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) là 3,12. MIC/MBC là bằng 2. Kết quả này đã cho thấy, chất chiết lá khuynh diệp nhạy với vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh gan thận mủ trên cá tra và chúng có khả năng diệt *E. ictaluri*. Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Trúc Linh và Mai Văn Hoàng (2023) [10] cho thấy, chất chiết từ lá khuynh diệp có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* với vòng vô khuẩn 25 mm. Dịch chiết của lá khuynh diệp có

hoạt tính kháng khuẩn cao là do có chứa các thành phần như: 1,8-cineole, citronellal, citronellol, citronellyl axetat, p-cymene, eucamalol, limonene, linalool, β-pinene, γ-terpinene, α-terpinol, alloocimene và aromadendrene [18]. Dựa trên kết quả nghiên cứu này và các nghiên cứu đã công bố trước cho thấy, lá cây khuynh diệp được thu thập từ các vùng khác nhau trên thế giới có đặc tính kháng khuẩn hiệu quả; tính năng này làm cho nó trở thành một loại cây kháng khuẩn độc đáo và đầy hứa hẹn [13]. Ngoài ra, trong lá của khuynh diệp có chứa hơn 70% cineol, là chất có hoạt tính diệt khuẩn [19], đồng thời một số chất còn có vai trò là chất chống oxy hóa [20]. Như vậy, từ những kết quả thu được trong nghiên cứu này đã góp

phần bổ sung thêm dữ liệu về khả năng kháng khuẩn của chất chiết lá khuyneh điệp lên *E. ictaluri* gây bệnh gan thận mũ trong nuôi cá tra.



Hình 1. Vòng kháng khuẩn của chất chiết lá khuyneh điệp với vi khuẩn *E. ictaluri*

3.2. Ảnh hưởng của chất chiết thảo dược lên chỉ số huyết học của cá tra

3.2.1. Các chỉ tiêu môi trường

Kết quả thí nghiệm cho thấy, TAN trong suốt quá trình bố trí dao động từ 0 - 2 mg/L; NO₂ từ 0 - 4 mg/L, nhiệt độ 27 - 28°C, độ kiềm 80 - 90 mgCaCO₃/L và pH 7,0 - 7,5. Các yếu tố môi trường được quản lý tốt và không gây ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển bình thường trên cá tra trong suốt thời gian thí nghiệm.

3.2.2. Ảnh hưởng chất chiết thảo dược lên một số chỉ tiêu huyết học cá tra

Tác động của chất chiết lá khuyneh điệp lên các chỉ tiêu huyết học của cá tra được trình bày trong bảng 2. Theo đó, việc bổ sung chất chiết lá khuyneh điệp có khả năng cải thiện rõ rệt số lượng tổng hồng cầu, tổng bạch cầu và các loại bạch cầu với hiệu quả khác biệt phụ thuộc vào nồng độ và thời gian sử dụng chất chiết (Bảng 2).

Bảng 2. Tác động của chất chiết lá khuyneh điệp lên các chỉ tiêu huyết học của cá tra

Nghiệm thức	15 ngày	30 ngày
Tổng hồng cầu ($\times 10^6$ tb/mm ³)		
Đối chứng	2,76 $\pm$ 0,76 ^a	3,04 $\pm$ 0,32 ^a
KD 1%	3,09 $\pm$ 0,48 ^a	4,11 $\pm$ 0,34 ^b
KD 1,5%	3,05 $\pm$ 0,67 ^a	3,83 $\pm$ 0,39 ^b
KD 2%	2,93 $\pm$ 0,34 ^a	3,94 $\pm$ 0,43 ^b
Tổng bạch cầu ($\times 10^4$ tb/mm ³)		
Đối chứng	27,14 $\pm$ 9,03 ^a	29,33 $\pm$ 4,64 ^a
KD 1%	32,72 $\pm$ 9,13 ^a	36,58 $\pm$ 3,24 ^b
KD 1,5%	31,60 $\pm$ 5,77 ^a	34,94 $\pm$ 7,60 ^b
KD 2%	29,02 $\pm$ 5,74 ^a	34,73 $\pm$ 5,61 ^b
Bạch cầu đơn nhân ($\times 10^4$ tb/mm ³)		
Đối chứng	3,17 $\pm$ 0,94 ^a	3,19 $\pm$ 0,67 ^a
KD 1%	3,91 $\pm$ 1,01 ^a	4,73 $\pm$ 0,95 ^b
KD 1,5%	3,78 $\pm$ 2,02 ^a	3,92 $\pm$ 1,53 ^{ab}
KD 2%	3,46 $\pm$ 1,48 ^a	4,27 $\pm$ 0,95 ^{ab}
Bạch cầu trung tính ($\times 10^4$ tb/mm ³)		

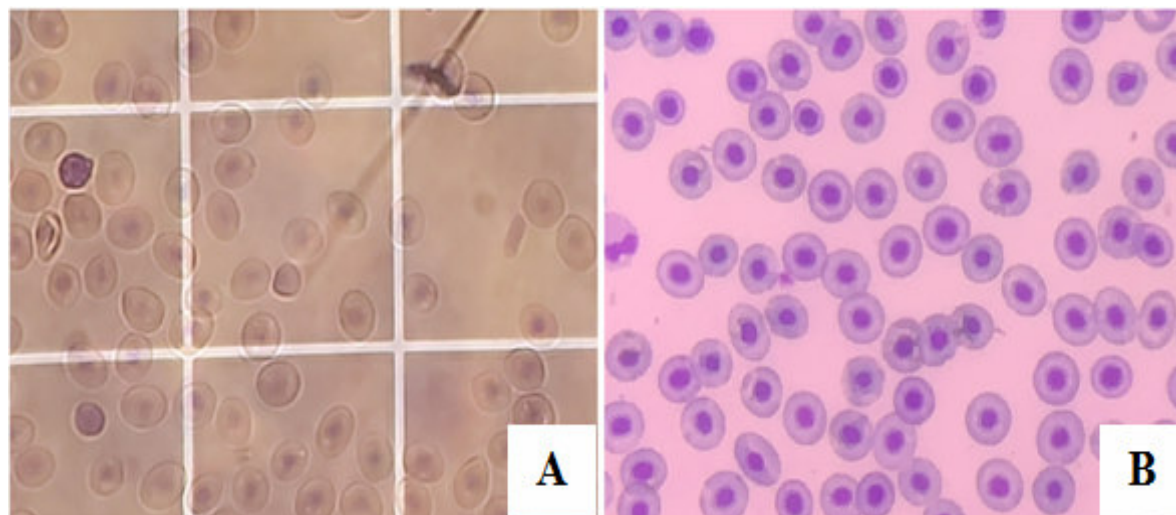
Đối chứng	$4,83 \pm 1,60^a$	$5,21 \pm 1,18^a$
KD 1%	$5,79 \pm 1,83^a$	$6,44 \pm 0,86^b$
KD 1,5%	$5,87 \pm 2,49^a$	$5,94 \pm 0,84^{ab}$
KD 2%	$5,45 \pm 2,80^a$	$6,27 \pm 1,05^{ab}$
Tiểu cầu ($\times 10^4$ tb/mm ³)		
Đối chứng	$0,55 \pm 0,41^a$	$0,90 \pm 0,35^a$
KD 1%	$0,79 \pm 0,43^a$	$1,57 \pm 0,59^b$
KD 1,5%	$0,64 \pm 0,29^a$	$1,25 \pm 0,52^{ab}$
KD 2%	$0,57 \pm 0,36^a$	$1,40 \pm 0,29^b$
Tế bào Lympho ($\times 10^4$ tb/mm ³)		
Đối chứng	$18,59 \pm 6,55^a$	$20,03 \pm 3,46^a$
KD 1%	$22,23 \pm 6,11^a$	$23,84 \pm 2,75^a$
KD 1,5%	$21,31 \pm 5,59^a$	$23,82 \pm 5,70^a$
KD 2%	$19,54 \pm 4,05^a$	$22,80 \pm 3,95^a$

Ghi chú: KD: Chất chiết lá khuynh diệp.

- Tổng hồng cầu

Tổng hồng cầu của cá tra trong thí nghiệm được xác định bằng phương pháp nhuộm với Natt-Herrick và đếm trên buồng đếm Neubauer (Hình

2A), đồng thời được quan sát trên lame kính nhuộm với Wright và Giemsa (Hình 2B) với hình oval đặc trưng và nhân nằm trung tâm tế bào, bắt màu tím của thuốc nhuộm.



Hình 2. Hình thái hồng cầu cá tra quan sát trên buồng đếm Neubauer (A) và tiêu bản phết kính nhuộm Wright & Giemsa (B) (40X)

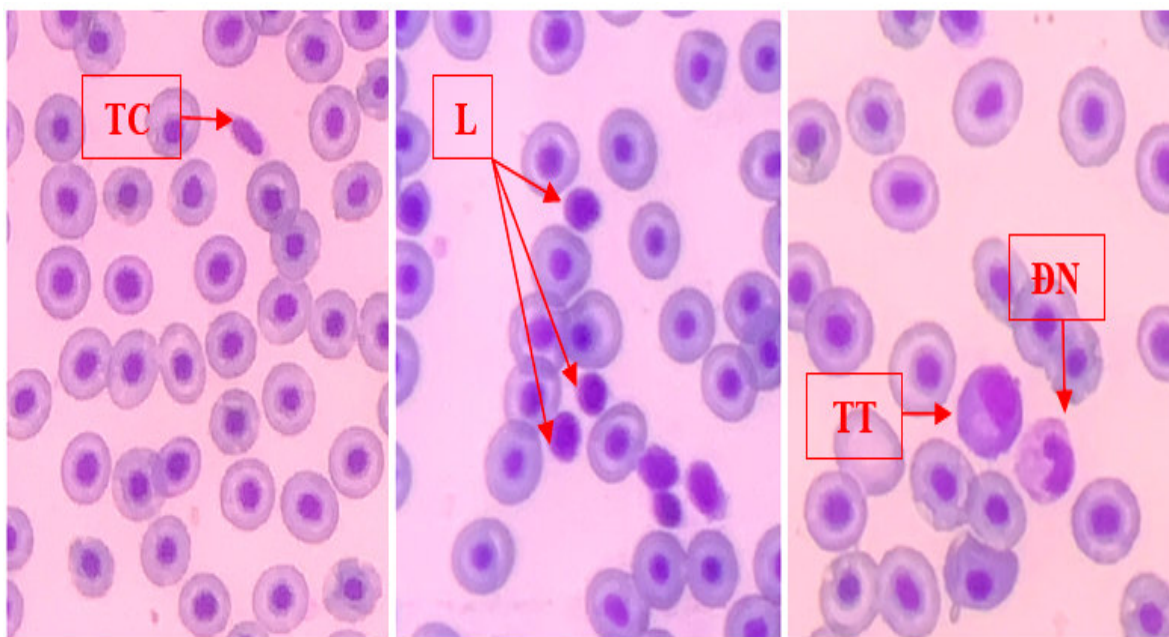
Kết quả phân tích qua các lần thu mẫu cho thấy, số lượng tổng hồng cầu của cá ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết lá khuynh diệp trung bình $2,98 \times 10^6$ tb/mm³ ở đợt thu mẫu sau 15 ngày đều thể hiện cao hơn so với cá ở nghiệm thức đối

chứng không bổ sung chất chiết với mật độ trung bình $2,76 \times 10^6$ tb/mm³. Tuy nhiên, số lượng tổng hồng cầu chỉ được ghi nhận khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) trong lần thu mẫu ở ngày 30 giữa nghiệm thức đối chứng với tổng hồng cầu trung bình $3,04$

$\times 10^6$ tb/mm³ với các nghiệm thức bổ sung chất chiết lá khuyễn diệp. Trong đó, cao nhất là ở nghiệm thức bổ sung 1% với $4,11 \times 10^6$ tb/mm³, tiếp đến ở 2% với $3,94 \times 10^6$ tb/mm³ và $3,83 \times 10^6$ tb/mm³ ở nghiệm thức bổ sung 1,5% dịch chiết. Không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$) giữa các nghiệm thức có bổ sung chất chiết.

- Tổng bạch cầu và các loại bạch cầu

Trên tiêu bản quan sát và phân loại được 4 loại tế bào bạch cầu đặc trưng ở cá tra bao gồm: Tế bào lympho, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính và tiểu cầu với các hình thái đặc trưng khác nhau (Hình 3).



Hình 3. Hình thái tiểu cầu (TC), tế bào Lympho (L), bạch cầu đơn nhân (ĐN) và bạch cầu trung tính (TT) quan sát trên tiêu bản phết kính nhuộm Wright & Giemsa (B) (40X)

Tương tự như tổng hồng cầu, không ghi nhận được sự khác biệt có ý nghĩa của số lượng tổng bạch cầu giữa các nghiệm thức bổ sung chất chiết lá khuyễn diệp ở tất cả các lần thu mẫu ($p > 0,05$) và chỉ ghi nhận sự khác biệt về số lượng giữa nghiệm thức bổ sung chất chiết và nghiệm thức đối chứng không bổ sung chất chiết sau 30 ngày ($p < 0,05$). Trong đó, ở các lần thu mẫu sau 15 và 30 ngày, cá cho ăn chất chiết ở nồng độ 1% thể hiện giá trị cao nhất với $32,72$ và $36,58 \times 10^4$ tb/mm³, tiếp đến là ở nghiệm thức bổ sung 1,5% với $31,6$ và $34,94 \times 10^4$ tb/mm³, nghiệm thức bổ sung 2% với $29,02$ và $34,73 \times 10^4$ tb/mm³ và thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng không bổ sung với $27,14$ và $29,33 \times 10^4$ tb/mm³, tương ứng với các lần thu mẫu.

Tương ứng với số lượng tổng bạch cầu, số lượng của từng loại bạch cầu thấp nhất đối với các mẫu thu ở nghiệm thức đối chứng không bổ sung

chất chiết lá khuyễn diệp với số lượng bạch cầu đơn nhân trung bình ở lần thu mẫu sau 15 ngày là $3,17 \times 10^4$ tb/mm³, bạch cầu trung tính $4,83 \times 10^4$ tb/mm³, tiểu cầu $0,55 \times 10^4$ tb/mm³ và tế bào Lympho $18,59 \times 10^4$ tb/mm³, thấp hơn so với cá ở các nghiệm thức có bổ sung chất chiết với mật độ dao động của từng loại lần lượt là $3,46 - 3,91 \times 10^4$ tb/mm³; $5,45 - 5,87 \times 10^4$ tb/mm³; $0,57 - 0,79 \times 10^4$ tb/mm³ và $19,54 - 22,23 \times 10^4$ tb/mm³. Tuy nhiên, sự khác biệt này giữa các nghiệm thức không có ý nghĩa ($p < 0,05$). Sau 30 ngày, mật độ của các loại bạch cầu được ghi nhận cao nhất trên cá ở nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) với số lượng bạch cầu đơn nhân trung bình là $4,73 \times 10^4$ tb/mm³ (so với $3,19 \times 10^4$ tb/mm³), bạch cầu trung tính là $6,44 \times 10^4$ tb/mm³ (so với $5,21 \times 10^4$ tb/mm³), tiểu cầu $1,57 \times 10^4$ tb/mm³ (so với $0,9 \times 10^4$ tb/mm³) và tế bào Lympho lần lượt là $23,84 \times 10^4$ tb/mm³ (so với $3,19$

$\times 10^4$ tb/mm³). Ở các nghiệm thức bổ sung ở liều 1,5% và 2%, mật độ của các loại bạch cầu đều ghi nhận tăng cao so với nghiệm thức đối chứng, tuy nhiên, chúng khác biệt không có nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Phân tích về huyết học của cá là một trong những chỉ tiêu được sử dụng để đánh giá tình trạng sức khỏe và điều kiện sống của cá trong môi trường khác nhau [21]. Không những vậy, một số chỉ tiêu cơ bản như số lượng tổng hồng cầu, tổng bạch cầu và các loại bạch cầu là các chỉ tiêu dùng trong các nghiên cứu để đánh giá hiệu quả các sản phẩm vaccine, chất kích thích miễn dịch, chế phẩm vi sinh và chất chiết thảo dược sử dụng trên cá nuôi nói chung và cá tra nuôi nói riêng tại khu vực đồng bằng sông Cửu Long. Trong nghiên cứu này, các chỉ tiêu trên cũng được sử dụng trong đánh giá hiệu quả của bổ sung chất chiết từ lá khuynh diệp lên cá tra trong thời gian 30 ngày thí nghiệm và 2 đợt thu mẫu sau 15, 30 ngày bố trí.

Kết quả phân tích đã thể hiện rõ việc bổ sung chất chiết từ lá khuynh diệp giúp làm gia tăng số lượng tổng hồng cầu, tổng bạch cầu nói chung và các loại bạch cầu nói riêng sau khi kết thúc thí nghiệm, trong đó, cho kết quả tốt nhất ở liều bổ sung 1%. Kết quả của nghiên cứu này có sự tương đồng với kết quả nghiên cứu của Nurudeen và cs (2022) [22, 23], theo đó, bổ sung chất chiết lá khuynh diệp lên cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) ở các liều 1, 2, 3 và 4% có khả năng làm tăng số lượng các chỉ tiêu huyết học, đồng thời còn giúp kích thích tăng trưởng, khả năng sử dụng thức ăn cũng như tăng cao thành phần dinh dưỡng và cấu trúc cơ thịt cá. Sự gia tăng số lượng tế bào máu trên cá tra cũng đã được ghi nhận trong nghiên cứu trên một số loại thảo dược khác như bổ sung chất chiết lá hoàng ngọc 0,1% và 0,5% [24]; bổ sung chất chiết lựu (*Punica granatum*) các liều 1,5% và 3% sau 2 – 4 tuần sử dụng [25]; chất chiết lá cách (*Premna serratifolia* L.) ở các liều 2% sau 4 tuần [26]. Có thể nói, đây là nghiên cứu đầu tiên về lá khuynh diệp trên cá tra.

Thông qua kết quả phân tích huyết học, có thể thấy được việc sử dụng chất chiết lá khuynh diệp góp phần giúp nâng cao đáng kể sức khỏe của cá tra. Trong đó, sự cải thiện số lượng tổng hồng cầu ở các nghiệm thức có bổ sung chất chiết biểu thị khả năng chiết xuất thảo dược kích thích tạo hồng cầu, do đó, làm tăng khả năng vận chuyển oxy, đáp ứng đủ nhu cầu oxy cho các hoạt động sống của tế bào, đồng thời thúc đẩy cho các quá trình trao đổi chất của cơ thể cùng với sự tăng cường cơ chế bảo vệ chống lại stress sinh lý [27]. Bên cạnh đó, bổ sung chất chiết từ lá khuynh diệp còn giúp tăng số lượng tổng bạch cầu nói chung và số lượng từng loại bạch cầu nói riêng, là một trong những thành phần quan trọng của hệ miễn dịch trên cá bởi khả năng miễn dịch tế bào và phản ứng khi gặp các vấn đề về sức khỏe. Sự gia tăng bạch cầu giúp cá nâng cao hệ miễn dịch và khả năng bảo vệ trước những tác nhân gây bệnh [28]. Theo Nurudeen và cs (2022) [23], sự gia tăng số lượng tế bào máu có thể do đặc tính dinh dưỡng phong phú của chúng, đặc biệt là polysaccharides, các vitamin thiết yếu (riboflavin, thiamine, axit folic) và các axit amin không thiết yếu, chủ yếu cần thiết cho quá trình tổng hợp huyết sắc tố.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Chất chiết lá khuynh diệp thể hiện hoạt tính kháng khuẩn cao đối với vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh gan thận mủ trên cá tra với đường kính vòng vô trùng là 23 mm. MIC và MBC của chất chiết lá khuynh diệp đối với vi khuẩn *E. ictaluri* tương ứng là 1,56 mg/mL; 3,12 mg/mL.

Cá tra ăn thức ăn bổ sung 1% chất chiết lá khuynh diệp giúp tăng cường chỉ số huyết học ở mức tốt nhất trong điều kiện thí nghiệm. 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 quy định miễn dịch.

LỜI CẢM ƠN

Kết quả nghiên cứu được tài trợ bởi Trường Đại học Trà Vinh thông qua Hợp đồng số 316/2023/HĐ.HĐKH&ĐT-DHTV.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dung, T.T., F. Haesebrouck, P. Sorgeloos, N.A Tuan and F. Pasmans (2009). IncK plasmid-mediated tetracyclin resistance in *Edwardsiella ictaluri* isolates from diseased freshwater catfish in Vietnam. *Aquaculture*, 295: 157 - 159.
2. Từ Thanh Dung, Freddy Haesebrouck, Partrick Sorgeloos, Margo Baele, Annemie Decostere và Nguyễn Anh Tuấn (2010). Hiện trạng kháng thuốc kháng sinh trên vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan, thận mũ trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, (15a), 162 - 171.
3. Seyyednejad, S.M, & Motamedi, H. (2010). A review on native medicinal plants in Khuzestan, Iran with antibacterial properties. *International Journal of Pharmacology*, 6(5), 551 - 560.
4. Harikrishnan, R., Balasundaram, C. & Heo, M. S. (2011a). Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, 317(1-4), 1 - 15.
5. Harikrishnan, R., Kim, J.S., Kim, M.C., Balasundaram, C., & Heo, M.S. (2011b). *Lactuca indica* extract as feed additive enhances immunological parameters & disease resistance in *Epinephelus bruneus* to *Streptococcus iniae*. *Aquaculture*, 318: 43 - 47.
6. Abdul Kader Mydeen and Haniffa (2011). Evaluation of Antibacterial activity of Medicinal Plants on Fish Pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Advances in Water Resources*. https://www.researchgate.net/publication/251734356_Evaluation_of_Antibacterial_activity_of_Medicinal_Plants_on_Fish_Pathogen_Aeromonas_hydrophila/citation/download.
7. Phùng Thị Lan Hương và Nguyễn Thị Định (2020). Nghiên cứu thành phần hoá học và hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu từ lá bạch đàn thứ sinh (*Eucalyptus*) tại thành phố Việt Trì, tỉnh Phú Thọ. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Trường Đại học Hùng Vương*. Vol 18, 54 - 61.
8. Đỗ Tất Lợi (2004). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nxb Thời đại, Hà Nội. pp. 1268.
9. Ghalem, B.R and Mohamed, B (2008). Antibacterial Activity of Leaf Essential Oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 211 - 215.
10. Nguyễn Thị Trúc Linh và Mai Văn Hoàng (2023). Ảnh hưởng của cao chiết lá khuynh diệp (*Eucalyptus globulus*) lên khả năng kháng *Vibrio parahaemolyticus*, gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính và một số chỉ tiêu huyết học trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 92 - 100.
11. Phung. N.K.P (2007). "Fractionation Method for Organic Compounds", *Vietnam National University Ho Chi Minh Press*, p. 528.
12. Abutbul. S., A. Golan-Goldhirsh, O. Barazani and D. Zilberg (2004). "Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis* sp.)", *Aquaculture*, vol. 238, No. 1-4, pp. 97 - 105.
13. Nezhad. F.M, H. Zeigham, A. Mota, M. Sattari and A. Yadegar (2009). Antibacterial activity of Eucalyptus extracts on methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. *Research Journal of Biological Sciences*, vol. 4, no. 8, pp. 905 - 908.
14. Oonmetta-aree. J., T. Suzuki, P. Gasaluck, and G. Eumkeb (2006). Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT-Food Sci Technol.*, vol. 39, no. 10, pp. 1214 - 1220.

15. Natt M.P and C. A. Herrick (1952). A new blood diluent for counting erythrocytes and leukocytes of the chicken. *Poultry Science*, vol. 31, pp. 735 - 738.
16. Hrubec. T.C, J. L. Cardinale, S., and A. Smith (2000). Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Veterinary Clinical Pathology*, vol. 29, pp. 7 - 12.
17. Lorian, V. (1995). Antibiotics in laboratory medicine. In: J. F. Acar, and F.W. Goldstein (Eds.). Disk susceptibility test, Fourth Edition. London: Williams and Walkins Awaverly, p.1. <https://www.hkmj.org/system/files/hkm9809p344b.pdf>.
18. Harkat-Madouri. L, B. Asma, K. Madani, Z. BO. S. Said, P. Rigou, D. Grenier, H. Allalou, H. Remini, A. Adjaoud, and L. Boulekbache-Makhlouf (2015). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria. *Industrial Crops and Products*, vol. 78, pp. 148 - 153.
19. Esser. L.L (1993). "Eucalyptus globules. In: Fire Effects Information System, Department of Agriculture, Forest Service Rocky Mountain Research Station, *Fire Science Laboratory* (Producer)". *USDA*.
20. Luis. A, A. Duarte, J. Gominho, F. Domingues, and A. P. Duarte (2016). Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. *Ind Crop Prod*, vol. 79, pp. 274 - 282.
21. Anjusha, K. V., M. A. A. Mamun, P. Dharmakar and Shamima, N. (2019). Effect of Medicinal Herbs on Hematology of Fishes. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 8(9): 2371 - 2376. doi: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.809.274>.
22. Nurudeen N.D, C. L. Ayisi and A. Ampofo-Yeboah (2022). 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.
23. Nurudeen ND, Ayisi CL, Ampofo-Yeboah A. (2022). Effects of Eucalyptus Globulus leaf extract on growth performance, feed utilization and blood biochemistry of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758). *Veterinaria*, 71(2), 175 - 189.
24. Bùi thị Bích Hằng và Nguyễn Thanh Phương (2020a). Ảnh hưởng của chất chiết từ lá cây hoàn ngọc (*Pseuderanthemum palatiferum* (Wall.) Radlk) lên tăng trưởng và đáp ứng miễn dịch cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 56(3) (3), 101. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2020.059>.
25. Bùi Thị Bích Hằng và Trần Thị Tuyết Hoa (2020b). Ảnh hưởng của chất chiết lựu (*Punica granatum*) lên tăng trưởng và đáp ứng miễn dịch của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*. 56 (Số chuyên đề: Thủy sản) (1): 161 - 169.
26. Bùi Thị Bích Hằng và Trần Thị Tuyết Hoa (2021). Ảnh hưởng chu kỳ bổ sung chất chiết lá cách (*Premna serratifolia* L.) lên đáp ứng miễn dịch và khả năng kháng bệnh của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, 57(Số chuyên đề: Thủy sản), 169 - 180. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2021.076>
27. Docan, A., Grecu, I. & Dediu, L. (2019). Use of Hematological Parameters as Assessment Tools in Fish Health Status. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 24(4), 317 - 324.
28. Javeed H., Farooz Ahmad Bhat, Tasaduq H Shah, Oyas Ahmad Asimi, Adnan Abubakr and Bilal Ahmad Bhat (2022). Fish haematology: A review. *The Pharma Innovation Journal*. 11(5S): 230 - 232.

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

Tran Buu Tai¹, Nguyen Thi Truc Linh¹

¹Tra Vinh University

Summary

The study was conducted to evaluate the effects of eucalyptus leaf extract (*Eucalyptus globulus*) on the antibacterial activity of *E. ictaluri*, causing purulent liver and kidney disease and hematological index on catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). The antibacterial activity of eucalyptus leaf extract was investigated by the agar disk diffusion method; Determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using the concentration dilution method. The results showed that eucalyptus leaf extract was active against *E. ictaluri*, had the highest antagonizing ability with a sterile ring diameter of 23 mm; MIC, MBC were 1.56 mg/mL and 3.12 mg/mL, respectively. The results about hematological index showed that supplementing eucalyptus leaf extract 1% increased the density of leukocytes, mononuclear cells, lymphocytes in treatments supplemented with eucalyptus leaf extract compared to the control ($p < 0.05$). These capabilities of eucalyptus leaf extract are great, so it would be a promising candidate to be used as a supplement for catfish.

Keywords: Catfish, *Edwardsiella ictaluri*, eucalyptus leaf extract, hematological index.

Người phản biện: PGS.TS. Võ Văn Nha

Ngày nhận bài: 02/3/2024

Ngày thông qua phản biện: 29/3/2024

Ngày duyệt đăng: 8/4/2024