



Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ

Số chuyên đề: Thủy sản

website: sj.ctu.edu.vn



DOI:10.22144/ctu.jsi.2018.045

ẢNH HƯỞNG CỦA INULIN VÀ FRUCTOOLIGOSACCHARIDES LÊN TĂNG TRƯỞNG, MỘT SỐ CHỈ TIÊU MIỄN DỊCH VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN CỦA CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Nguyễn Thị Mỹ Hân và Bùi Thị Bích Hằng*

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

*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: 18/06/2018

Ngày duyệt đăng: 30/07/2018

Title:

Effect of inulin and fructooligosaccharide on growth performance, immune parameters and disease resistance of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Từ khóa:

Cá tra, đáp ứng miễn dịch, FOS, inulin, tăng trưởng

Keywords:

FOS, growth performance, immunostimulants, inulin, *Pangasianodon hypophthalmus*

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the effects of inulin and fructooligosaccharides (FOS) on the growth performance and immune system of striped catfish fingerling (*Pangasianodon hypophthalmus*). The experiment was randomly designed with 5 treatments (control, 0.5% Inulin, 1% Inulin, 0.5% FOS, and 1% FOS) and triplications for each treatment. After 21 and 28 days, several immune parameters including total erythrocyte cells, total leucocyte cells, number of each type of leucocytes and lysozyme activity were analyzed for evaluating of fish immune response. After 28 days, fish was weighted for estimation of growth performance and was challenged with pathogen (*Edwardsiella ictaluri*) for evaluating of bacterial resistance. Fish mortality was recorded daily for 14 days. After 3 days of infection with *E. ictaluri*, 3 fish in each tank were collected for immune assay. The results showed that hematological parameters and lysozyme activity of inulin and FOS supplemented treatments were higher than those of the control treatment after 28 days. The treatment of 1% inulin showed that the total number of leucocyte, monocyte, neutrophil, lymphocyte, thrombocyte and lysozyme activity were significantly higher than those of the control treatment after 28 days and the lowest mortality (42.67%) after challenge with *E. ictaluri* ($p < 0.05$).

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tìm hiểu ảnh hưởng của việc bổ sung inulin và fructooligosaccharides (FOS) vào thức ăn lên tăng trưởng và sự đáp ứng miễn dịch tự nhiên của cá tra giống (*Pangasianodon hypophthalmus*). Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 nghiệm thức (đối chứng, 0,5% Inulin, 1% Inulin, 0,5% FOS và 1% FOS); mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Sau 21 và 28 ngày, các chỉ tiêu miễn dịch bao gồm mật độ tổng hồng cầu, mật độ tổng bạch cầu, định lượng từng loại bạch cầu và hoạt tính của lysozyme được phân tích để đánh giá đáp ứng miễn dịch của cá. Sau 28 ngày, cá được cân trọng lượng để tính tăng trọng và tiến hành cảm nhiễm với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* để đánh giá khả năng kháng khuẩn. Tỷ lệ chết của cá được ghi nhận hàng ngày trong suốt 14 ngày. Sau 3 ngày cảm nhiễm với *E. ictaluri*, 3 cá/bể được thu để phân tích miễn dịch. Kết quả cho thấy các chỉ tiêu huyết học và hoạt tính lysozyme ở các nghiệm thức bổ sung inulin và FOS đều cao hơn nghiệm thức đối chứng sau 28 ngày cho ăn. Nghiệm thức bổ sung 1% inulin cho kết quả mật độ tổng bạch cầu, bạch cầu đơn nhân, trung tính, lympho, tiểu cầu và hoạt tính lysozyme tăng cao có ý nghĩa thống kê sau 28 ngày và có tỉ lệ chết thấp nhất (42,67%) sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* ($p < 0,05$).

Trích dẫn: Nguyễn Thị Mỹ Hân và Bùi Thị Bích Hằng, 2018. Ảnh hưởng của inulin và fructooligosaccharides lên tăng trưởng, một số chỉ tiêu miễn dịch và khả năng kháng khuẩn của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(Số chuyên đề: Thủy sản)(2): 125-134.

1 GIỚI THIỆU

Sự phát triển của nghề nuôi cá tra đã đóng góp lớn cho sự phát triển ngành thủy sản, giúp cung cấp thực phẩm trong nước cũng như xuất khẩu mang lại nguồn ngoại tệ lớn. Tuy nhiên, song song với việc tăng nhanh về diện tích nuôi, mức độ thâm canh hóa ngày càng cao, một trong những nguyên nhân làm môi trường nuôi ngày càng ô nhiễm và bùng phát dịch bệnh với diễn biến ngày càng phức tạp. Các bệnh thường gặp và gây ảnh hưởng lớn đối với cá tra nuôi thâm canh ở Việt Nam như: gan thận mù, bệnh xuất huyết phù đầu, trắng gan trắng mang, trắng đuôi,... (Dung *et al.*, 2008; Từ Thanh Dung, 2010; Từ Thanh Dung và *ctv.*, 2012). Để quản lý dịch bệnh, nhiều loại thuốc và hóa chất đặc biệt là kháng sinh đã được sử dụng. Tuy nhiên, việc lạm dụng thuốc và hóa chất không theo quy định dẫn đến nguy cơ tồn lưu trên sản phẩm, tạo các dòng vi khuẩn kháng thuốc, phá hủy quần thể vi sinh vật trong môi trường nuôi trồng thủy sản và ức chế hệ thống miễn dịch ở cá (Smith *et al.*, 2003; Sapkota *et al.*, 2008). Để hạn chế những vấn đề trên, nhiều biện pháp tiên tiến đã được áp dụng như: dùng vaccine, chế phẩm sinh học (probiotic), hợp chất tiền sinh học (prebiotic), chất kích thích miễn dịch,... Inulin và fructooligosaccharides (FOS) là hai prebiotic được sử dụng phổ biến trong nuôi trồng thủy sản (Đỗ Thị Thanh Hương, 2014). Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu được tiến hành và đánh giá hiệu quả khi sử dụng Inulin và FOS đơn lẻ hay kết hợp với một số chất khác vào thức ăn trong nuôi trồng thủy sản cho thấy tác động tích cực đến tăng trưởng, chức năng sinh lý và kích thích hệ miễn dịch không đặc hiệu ở một số loài cá như cá hồi *Salmo salar* (Grisdale-Helland *et al.*, 2008), cá mú báo *Mycteroperca rosacea* (Reyes-Becerril *et al.*, 2014), cá chép *Cyprinus carpio* (Eshaghzadeh *et al.*, 2015; Hoseinifar *et al.*, 2016), cá rô phi *Oreochromis niloticus* (Tiengtam *et al.*, 2017),... Tuy nhiên, chưa có nhiều kết quả nghiên cứu về hiệu quả của Inulin và FOS lên các chỉ tiêu tăng trưởng, miễn dịch và khả năng kháng khuẩn của cá tra. Xuất phát từ thực tế, nghiên cứu này được thực hiện nhằm cung cấp thông tin hữu ích làm cơ sở cho việc xây dựng biện pháp phòng bệnh và nâng cao hiệu quả của nghề nuôi cá tra.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Địa điểm và vật liệu nghiên cứu

Địa điểm nghiên cứu là Phòng thí nghiệm Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) có kích cỡ 15-20 g/con được vận chuyển từ trại giống Anh

Dũng (Cần Thơ) về Phòng thí nghiệm Bệnh học Thủy sản và thuần dưỡng trong 2 tuần. Cá được kiểm tra ký sinh trùng, vi sinh, nấm trước khi bố trí thí nghiệm.

Vi khuẩn *E. ictaluri* được cung cấp từ bộ sưu tập vi khuẩn của Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. Inulin và fructooligosaccharides (FOS) được cung cấp bởi Sigma.

Thức ăn thí nghiệm có dạng viên nổi, 28% đạm (Proconco). Inulin và FOS được hòa tan với 15 ml nước theo tỉ lệ của mỗi nghiệm thức, phun đều vào thức ăn, để khô tự nhiên 1 giờ, sau đó áo một lớp dầu mực qua thức ăn, tiếp tục phơi thức ăn ở nhiệt độ phòng trong 8 giờ. Thức ăn được trữ ở 4°C trong thời gian thí nghiệm.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 nghiệm thức: đối chứng, 0,5% Inulin, 1% Inulin, 0,5% FOS và 1% FOS; mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần trong 4 tuần. Cá được bố trí 30 cá/bể nhựa 250 L, được cho ăn 2 lần/ngày với 3% trọng lượng thân. Hàng tuần, lượng nước trong bể được thay khoảng 50%. Ba cá/bể được tiến hành thu vào ngày thứ 21 và ngày thứ 28 sau khi bổ sung Inulin và FOS. Các chỉ tiêu huyết học (tổng hồng cầu, tổng bạch cầu và định lượng từng loại bạch cầu) và hoạt tính lysozyme được phân tích. Ở ngày thứ 28, cá ở mỗi nghiệm thức được cân trọng lượng để xác định tăng trọng và tiến hành cảm nhiễm.

Thí nghiệm cảm nhiễm cá tra với vi khuẩn *E. ictaluri* được tiến hành với 6 nghiệm thức (NT), trong đó, NT 1: Đối chứng (0% Inulin và FOS) và tiêm vi khuẩn (đối chứng dương), NT 2: 0,5% inulin và tiêm vi khuẩn, NT 3: 1% inulin và tiêm vi khuẩn, NT 4: 0,5% FOS và tiêm vi khuẩn, NT 5: 1% FOS và tiêm vi khuẩn, NT 6: Đối chứng (0% Inulin và FOS) và tiêm 0,85% NaCl (đối chứng âm). Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, 10 cá/bể, sục khí liên tục và không thay nước cá. Mỗi cá được tiêm 0,1 ml vi khuẩn *E. ictaluri* (10^6 CFU/ml). Trong thí nghiệm này, mật độ vi khuẩn cảm nhiễm được chọn là 10^6 CFU/ml, cao hơn 10 lần so với LD50 (Hang *et al.*, 2013). Cá cảm nhiễm được theo dõi trong 14 ngày. Hằng ngày, các dấu hiệu bệnh lý được quan sát, số cá chết được ghi nhận, vi khuẩn *E. ictaluri* từ thận cá lờ đờ được phân lập và tiến hành tái định danh bằng phương pháp phản ứng chuỗi polymerase (PCR). Hiệu quả điều trị bệnh trong phòng thí nghiệm được đánh giá bằng tỉ lệ sinh tồn tương đối (relative survival rate – RPS). Giá trị RPS (%) theo công thức (Ellis, 1990): $[1 - (\% \text{ cá chết ở nghiệm}$

thức bổ sung inulin; FOS/% cá chết ở nghiệm thức đối chứng dương] x 100.

2.2.2 Phương pháp phân tích các chỉ tiêu tăng trưởng

Một số chỉ tiêu tính toán về tăng trưởng của cá: Tăng trọng: $WG = W_t - W_0$, Tốc độ tăng trưởng tuyệt đối: $DWG (g/ngày) = (W_t - W_0)/T$, Tốc độ tăng trưởng tương đối: $SGR (\%/ngày) = (\ln W_t - \ln W_0)/T \times 100$, Hệ số chuyển hóa thức ăn: $FCR = \text{Lượng thức ăn cá ăn vào (Kg)}/\text{Tăng trọng của cá (Kg)}$ và Tỷ lệ sống (%): $SR (\%) = 100 \times (\text{Số cá thu hoạch}/\text{số cá ban đầu})$. Trong đó: W_0 : Khối lượng trung bình của cá ban đầu, W_t : Khối lượng trung bình của cá kết thúc thí nghiệm, T: Thời gian thí nghiệm.

2.2.3 Phương pháp phân tích các chỉ tiêu miễn dịch

Định lượng hồng cầu (Natt and Herrick, 1952):

10 μL máu được cho vào ống có chứa 1990 μL dung dịch Natt và Herrick, lắc nhẹ cho đều ống. Mật độ hồng cầu được xác định bằng buồng đếm hồng cầu thông qua sự quan sát dưới kính hiển vi quang học (40X).

Định lượng tổng bạch cầu và từng loại bạch cầu: Trải mẫu máu lên lame và để mẫu khô tự nhiên, sau đó cố định mẫu máu bằng cách ngâm mẫu trong methanol 1–2 phút, để mẫu khô tự nhiên và tiến hành nhuộm mẫu với dung dịch nhuộm Wright và Giemsa (Rowley, 1990). Quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 100X và đọc mẫu theo hình Z-Z. Đếm tổng số 1.500 tế bào hồng cầu và bạch cầu trên lame nhuộm. Đếm tổng số 200 tế bào bạch cầu (Hrubec *et al.*, 2000). Định loại các tế bào máu theo Supranec *et al.* (1991).

Xác định hoạt tính lysozyme trong huyết thanh (Ellis *et al.*, 1990): Dụng đường chuẩn lysozyme với các nồng độ 0, 2, 4, 8 và 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cho 10 μL dung dịch từ các nồng độ pha loãng cho vào đĩa 96 giếng, tiếp theo cho 200 $\mu\text{L}/\text{giếng}$ dịch huyền phù *Micrococcus luteus* (Sigma). Đối với mẫu huyết thanh của cá, cho 10 μL vào đĩa 96 giếng, thêm 200 $\mu\text{L}/\text{giếng}$ 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: $y = ax + b$ với y là trị số OD và x là hoạt tính lysozyme.

2.2.4 Phương pháp PCR tái định danh vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*

Vi khuẩn *E. ictaluri* được phát hiện bằng phương pháp PCR được mô tả bởi Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương (2010). Thành phần phản ứng PCR bao gồm: 1X dung dịch đệm 10X, 1,5mM MgCl_2 , 200 μM dNTPs, 2,5U Taq DNA polymerase, 0,4 μM mỗi xuôi (EiFd-1:

GTAGCAGGGAGAAAGCTTGC), 0,4 μM mỗi ngược (EiRs-1: GAACGCTATTAACGCTCACACC) và 500 ng mẫu DNA chiết tách từ máu cá có trộn vi khuẩn *E. ictaluri*. Chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 95°C trong 4 phút, sau đó 95°C trong 30 giây, 55°C trong 45 giây, 72°C trong 30 giây, lặp lại chu kỳ trên 30 lần, 72°C trong 10 phút. Sản phẩm khuếch đại đặc hiệu với DNA của vi khuẩn *E. ictaluri* là 407 bp.

2.3 Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel, xử lý thống kê bằng phương sai 1 nhân tố ANOVA và so sánh sự khác biệt có ý nghĩa bằng phép thử LSD ở mức ý nghĩa $p < 0,05$ với phần mềm SPSS.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của inulin và FOS lên các chỉ tiêu tăng trưởng của cá tra

Sau 28 ngày, cá ở các nghiệm thức bổ sung inulin và FOS có WG (g), DWG (g/ngày), SGR (%/ngày) cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Trong đó, NT5 (1% FOS) có WG và DWG cao nhất với giá trị lần lượt là 15,67 g và 0,56 g/ngày nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) so với các nghiệm thức bổ sung còn lại (NT2, NT3, NT4). Ở NT4 (0,5% FOS) có giá trị SRG cao nhất (1,83 %/ngày) nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức bổ sung còn lại ($p > 0,05$) và hệ số FCR có giá trị thấp nhất (0,9) khác biệt có ý nghĩa thống kê so với NT1 và NT3 ($p < 0,05$). Trong các nghiệm thức bổ sung inulin và FOS, NT3 (1% inulin) có giá trị WG (g), DWG (g/ngày), SGR (%/ngày) thấp nhất và hệ số FCR cao nhất (Bảng 1). Kết quả này tương đồng với kết quả của nghiên cứu bổ sung FOS (0%, 1% và 2%) vào thức ăn của cá tầm sao giống *Acipenser stellatus* trong 11 tuần với nghiệm thức bổ sung 1% FOS có các chỉ số tăng trọng như WG, SGR cao và hệ số tiêu tốn thức ăn FCR thấp hơn có ý nghĩa so với cá ở nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$) (Reza *et al.*, 2013). Thí nghiệm bổ sung *Bacillus subtilis* kết hợp với FOS lên tăng trưởng của hải sâm (*Apostichopus japonicus*) của Zhang *et al.* (2010) với 9 nghiệm thức bổ sung vào thức ăn tương ứng với 3 mức *Bacillus subtilis* (0, $1,82 \times 10^7$, $4,95 \times 10^7$ CFU/g) kết hợp 3 mức FOS (0, 0,25%, 0,50%) trong 8 tuần cho thấy tốc độ tăng trưởng tương đối SGR cao nhất ở mức FOS 0,5% và $1,82 \times 10^7$ *Bacillus subtilis* ($p < 0,05$). Ngoài ra, Mahious *et al.* (2006) đã nghiên cứu ảnh hưởng của chế độ ăn bổ sung 2% các chất inulin, oligofructose và lactosucrose lên sự tăng trưởng và hệ vi khuẩn đường ruột của cá bơn (*Psetta maxima*) cho kết quả nhóm cá bổ sung 2% oligofructose có khối lượng cao hơn đáng kể so với các nghiệm thức khác.

Bảng 1: WG (g), DWG (g/ngày), SGR (%/ngày) và FCR của cá sau 28 ngày nuôi

	WG (g)	DWG (g/ngày)	SGR (%/ngày)	FCR
NT1(đối chứng)	8,23±2,59 ^a	0,30±0,09 ^a	1,03±0,26 ^a	2,02±0,33 ^c
NT2(0,5% Inulin)	13,45±3,87 ^b	0,48±0,14 ^b	1,64±0,37 ^b	1,06±0,25 ^{ab}
NT3(1% Inulin)	12,28±3,05 ^b	0,44±0,11 ^b	1,53±0,33 ^b	1,26±0,36 ^b
NT4(0,5% FOS)	15,48±1,60 ^b	0,55±0,06 ^b	1,83±0,17^b	0,90±0,06^a
NT5(1% FOS)	15,67±3,82^b	0,56±0,13^b	1,80±0,35 ^b	1,02±0,22 ^{ab}

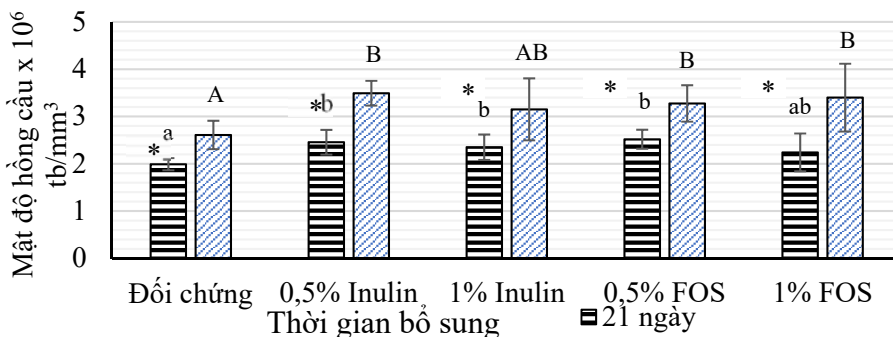
Ghi chú: các giá trị có ký tự giống nhau trong cùng một cột (a,b) thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p>0,05)

3.2 Ảnh hưởng của inulin và FOS lên một số chỉ tiêu miễn dịch của cá tra

3.2.1 Chỉ tiêu huyết học

Mật độ hồng cầu và mật độ tổng bạch cầu: sau 21 ngày, mật độ hồng cầu của cá ở các nghiệm thức dao động từ 1,99 – 2,52 x 10⁶ tb/mm³. Các nghiệm thức bổ sung inulin và FOS đều có mật độ hồng cầu cao hơn so với đối chứng, trong đó, cao nhất ở nghiệm thức 0,5% FOS (2,52 x 10⁶ tb/mm³) khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng (1,99 x 10⁶ tb/mm³) (p<0,05) nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức bổ sung inulin và FOS khác (p>0,05). Ở thời điểm 28 ngày sau khi bổ sung inulin và FOS, mật độ hồng cầu ở các nghiệm thức bổ sung đều tăng cao so với đối chứng. Cụ thể, nghiệm thức bổ sung 0,5% inulin có mật độ hồng cầu cao nhất (3,49 x 10⁶ tb/mm³), khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng (2,61 x 10⁶ tb/mm³) (p<0,05). Mật độ hồng cầu của các nghiệm thức ở ngày thứ 28 đều cao hơn có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức thu ở ngày thứ 21 (p<0,05) (Hình 1). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Glomski and Pica (2006) về sự biến động của mật độ tế bào hồng cầu ở cá nước ngọt dao động 1-3,5 x 10⁶ tb/mm³. Mật độ hồng cầu ở cá tra khỏe ở một số nghiên cứu trước được xác định là

2,27 x 10⁶ tb/mm³ (Từ Thanh Dung, 2010), 2,05 x 10⁶ tb/mm³ (Nguyễn Thị Thúy Liễu và ctv., 2011). Tiengtam *et al.* (2017) nghiên cứu ảnh hưởng của bổ sung inulin và củ Cúc Vu (*Helianthus tuberosus*), một loại củ có chứa lượng inulin và FOS khá cao, lên thức ăn của cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) giai đoạn giống với kết quả cá ở nghiệm thức bổ sung 0,5% inulin có mật độ tế bào hồng cầu tăng cao hơn có ý nghĩa so với cá ở nghiệm thức đối chứng (p<0,05). Thí nghiệm nghiên cứu bổ sung FOS vào thức ăn cho cá tra giống (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở các mức khác nhau gồm đối chứng, 0,5%, 1,0%, 1,5% và 2,0% FOS đã xác định mật độ hồng cầu cá tra tăng cao ở các nghiệm thức bổ sung FOS và đạt cao nhất ở nghiệm thức 1,0% (2,99 x 10⁶ tế bào/mm³) sau 90 ngày thí nghiệm (Đỗ Thị Thanh Hương, 2014). Một nghiên cứu gần đây của Reza *et al.* (2013) trên cá tầm sao giống (*Acipenser stellatus*) cho thấy bổ sung 1% FOS vào thức ăn của cá cho kết quả mật độ hồng cầu cao hơn so với nghiệm thức 2% và đối chứng (p<0,05). Trên cá bống tượng (*Oxyeleotris lineolatus*), kết quả nghiên cứu bổ sung FOS ở mức 1,5% và 3% trong thức ăn của Renjie *et al.* (2010) trong 30 ngày cho thấy mật độ hồng cầu trong máu của nhóm cá có bổ sung FOS được tăng đáng kể (P<0,05) so với nhóm đối chứng.



Hình 1: Biểu đồ mật độ hồng cầu ở cá tra sau 21, 28 ngày bổ sung inulin và FOS

Ghi chú: các ký hiệu giống nhau trong cùng một đợt thu mẫu (a, b, c), (A, B, C) thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p>0,05); (*) : sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) giữa 2 lần thu mẫu

Sau 21 ngày thí nghiệm, mật độ tổng bạch cầu ở các nghiệm thức bổ sung inulin và FOS cao hơn

nghiệm thức đối chứng. Riêng NT3 (212,07 x 10³ tb/mm³) có giá trị thấp hơn so với đối chứng (214,03

$\times 10^3$ tb/mm³) nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Mật độ tổng bạch cầu cao nhất ở NT 5 ($371,39 \times 10^3$ tb/mm³) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$). Sau 28 ngày, mật độ tổng bạch cầu ở các nghiệm thức bổ sung inulin và FOS tiếp tục tăng cao ($330,02-361,54 \times 10^3$ tb/mm³) và cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng ($210,17 \times 10^3$ tb/mm³). Mật độ bạch cầu đạt giá trị cao nhất ở NT2 ($361,54 \times 10^3$ tb/mm³) nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức bổ sung inulin và FOS khác ($p > 0,05$). Giữa 2 đợt thu mẫu, tổng bạch cầu ở NT1 và NT5 giảm nhẹ so với sau 21 ngày nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Mật độ bạch cầu ở các nghiệm thức còn lại (NT2, NT3 và NT4) đều có giá trị cao hơn khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đợt

thu mẫu sau 21 ngày ($p < 0,05$) (Bảng 2). Kết quả mật độ tổng bạch cầu ở cá tra khỏe của thí nghiệm cao hơn so với kết quả nghiên cứu khác như 101×10^3 tb/mm³ (Tùng Thanh Dung, 2010), $112,9 \times 10^3$ tb/mm³ (Bùi Thị Bích Hằng và ctv., 2017). Theo nghiên cứu của Ahmdifar *et al.* (2011), số lượng bạch cầu tăng lên đáng kể ($p < 0,05$) ở nghiệm thức bổ sung 1% inulin so với các nghiệm thức bổ sung 0%, 2% và 3% inulin vào thức ăn cá tầm (*Huso huso*) giai đoạn cá giống trong 8 tuần. Nghiên cứu khác của Đỗ Thị Thanh Hương (2014) bổ sung FOS vào thức ăn cá tra ở mức 1% làm gia tăng mật độ hồng cầu cũng như mật độ bạch cầu khi so với các nghiệm thức khác ($p < 0,05$). Tương tự, nghiệm thức bổ sung 1% FOS vào thức ăn cá tầm sao giống (*Acipenser stellatus*) cũng làm mật độ bạch cầu tăng cao (Reza *et al.*, 2013).

Bảng 2: Mật độ tổng bạch cầu các tra sau 21 ngày, 28 ngày bổ sung inulin và FOS trên cá tra ($\times 10^3$ tb/mm³)

Nghiệm thức	Mật độ tổng bạch cầu	
	21 ngày	28 ngày
NT1 (Đối chứng)	214,03±58,35 ^{Aa}	210,17±41,54 ^{Aa}
NT2 (0,5% Inulin)	254,43±73,76 ^{Aa}	361,54±55,10^{Bb}
NT3 (1% Inulin)	212,07±34,03 ^{Aa}	358,08±59,69 ^{Bb}
NT4 (0,5% FOS)	216,69±34,59 ^{Aa}	330,02±66,87 ^{Bb}
NT 5 (1% FOS)	371,39±70,81^{Ab}	338,97±53,86 ^{Ab}

Ghi chú: Kết quả trên bảng thể hiện giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các giá trị có ký tự giống nhau trong cùng một cột (a, b, c), một dòng (A, B, C) thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$)

Sự biến động của tế bào đơn nhân: Sau 2 lần thu mẫu, mật độ tế bào đơn nhân ở các nghiệm thức bổ sung tăng cao so với nghiệm thức đối chứng, trong đó NT2 (0,5% inulin) có giá trị cao nhất ($14,60 \times 10^3$ tb/mm³) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức khác ($p < 0,05$). Tuy nhiên, mật độ tế bào đơn nhân ở NT5 sau 28 ngày ($9,91 \times 10^3$ tb/mm³) giảm nhẹ so với ngày thứ 21 ($8,38 \times 10^3$ tb/mm³) nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Sự biến động của tế bào trung tính: Kết quả nghiên cứu cho thấy, sau 21 ngày, mật độ tế bào trung tính ở các nghiệm thức bổ sung inulin và FOS ($1,21 - 2,54 \times 10^3$ tb/mm³) thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng ($2,67 \times 10^3$ tb/mm³). Cụ thể, mật độ tế bào trung tính ở NT3 (1% inulin) có giá trị thấp nhất ($1,21 \times 10^3$ tb/mm³) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ($p < 0,05$). Ngoài ra, các nghiệm thức còn lại khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ($p > 0,05$). Mật độ tế bào trung tính tăng cao sau 28 ngày, các nghiệm thức bổ sung inulin và FOS đều có giá trị cao hơn so với đối chứng và cao nhất ở NT3 ($22,57 \times 10^3$ tb/mm³) gấp 3,85 lần so với đối chứng ($5,86 \times 10^3$ tb/mm³) (Bảng 3).

Sự biến động của tế bào lympho: Mật độ tế bào lympho ở NT2, NT3 và NT5 cao hơn so với đối chứng ở đợt thu mẫu của ngày thứ 21. NT4 (0,5% FOS) có mật độ tế bào lympho thấp nhất nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ($p > 0,05$). Trong khi đó, NT5 (1% FOS) ($270,51 \times 10^3$ tb/mm³) tăng cao và đạt giá trị cao nhất, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức khác ($p < 0,05$). Sau 28 ngày, mật độ tế bào lympho ở các nghiệm thức bổ sung inulin và FOS dao động trong khoảng $161,76 - 218,22 \times 10^3$ tb/mm³, đều cao hơn so với nghiệm thức đối chứng ($121,29 \times 10^3$ tb/mm³). NT5 vẫn có mật độ tế bào lympho cao nhất ($218,22 \times 10^3$ tb/mm³), khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$). Tuy nhiên, giá trị này giảm so với đợt thu mẫu ngày thứ 21 và sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Sự biến động của tế bào tiểu cầu: Mật độ tế bào tiểu cầu sau 21 ngày ở NT4 ($111,08 \times 10^3$ tb/mm³) và NT5 ($112,93 \times 10^3$ tb/mm³) tăng cao có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($63,44 \times 10^3$ tb/mm³) ($p < 0,05$). NT3 ($48,99 \times 10^3$ tb/mm³) có mật độ tế bào tiểu cầu thấp nhất trong các nghiệm thức nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ($p > 0,05$). Sau 28 ngày,

mật độ tế bào tiểu cầu tăng so với sau 21 ngày, trừ NT5 giảm nhẹ nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). NT2 ($150,49 \times 10^3$ tb/mm³) có

mật độ tế bào tiểu cầu cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê đối với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$) (Bảng 3).

Bảng 3: Mật độ bạch cầu đơn nhân, trung tính, lympho và tiểu cầu của cá tra ở 21 ngày và 28 ngày sau khi bổ sung inulin và FOS vào thức ăn ($\times 10^3$ tb/mm³)

Nghiệm thức	Đơn nhân	Trung tính	Lympho	Tiểu cầu
Sau 21 ngày bổ sung				
Đối chứng	5,71±1,49 ^{Aa}	2,67±1,4 ^{Aa}	156,39±55,12 ^{Aa}	63,44±18,47 ^{Ab}
0,5% Inulin	14,60±5,25 ^{Ac}	1,83±0,65 ^{Aab}	160,94±56,85 ^{Aa}	89,46±18,18 ^{Abc}
1% Inulin	9,29±4,52 ^{Aab}	1,21±0,61 ^{Ab}	177,99±48,77 ^{Aa}	48,99±21,86 ^{Aa}
0,5% FOS	6,56±1,76 ^{Aab}	2,29±1,53 ^{Aab}	138,15±30,99 ^{Aa}	111,08±46,34 ^{Ac}
1% FOS	9,91±1,35 ^{Ab}	2,54±1,08 ^{Aab}	270,51±52,15 ^{Ab}	112,93±43,94 ^{Ac}
Sau 28 ngày bổ sung				
Đối chứng	4,73±1,27 ^{Aa}	5,86±1,77 ^{Ba}	121,29±15,06 ^{Aa}	67,92±14,43 ^{Aa}
0,5% Inulin	16,54±3,57 ^{Ad}	5,92±0,53 ^{Ba}	172,32±46,03 ^{Ab}	150,49±21,42 ^{Bb}
1% Inulin	11,55±2,64 ^{Ac}	22,57±4,02 ^{Bb}	202,49±42,44 ^{Abc}	130,97±36,91 ^{Bb}
0,5% FOS	9,29±1,71 ^{Bbc}	19,62±6,67 ^{Bb}	161,76±24,14 ^{Aab}	143,10±43,81 ^{Ab}
1% FOS	8,38±1,12 ^{Ab}	21,09±5,09 ^{Bb}	218,22±37,55 ^{Ac}	81,70±26,06 ^{Aa}

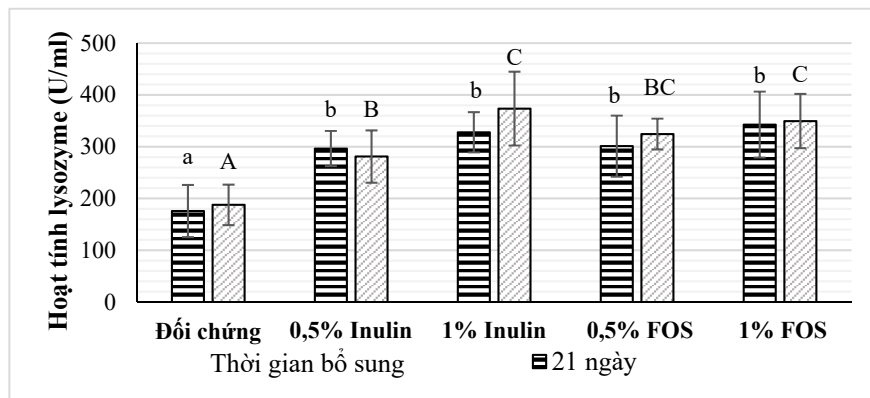
Ghi chú: Kết quả trên bảng thể hiện giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các giá trị có ký tự giống nhau trong cùng một cột (a, b, c), một dòng (A, B, C) thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$)

Theo nghiên cứu của Reza *et al.* (2013), ở nghiệm thức bổ sung 1% FOS trên cá tầm sao giống (*Acipenser stellatus*), mật độ tế bào lympho tăng hơn so với đối chứng. Chinabut *et al.* (1991) cho biết bạch cầu tham gia vào quá trình đáp ứng miễn dịch của vật chủ chống lại mầm bệnh xâm nhập và các nhân tố bất lợi khác, mỗi loại bạch cầu sẽ đảm nhiệm chức năng khác nhau. Bạch cầu trung tính có chức năng thực bào những vật thể lạ, chúng sẽ tập trung ở những nơi bị viêm để tiêu diệt vi khuẩn và các mảnh vụn tế bào (Hrubec *et al.*, 2000). Ở người, bạch cầu đơn nhân chỉ tồn tại vài giờ rồi đi vào mô và nhanh chóng trở thành đại thực bào có kích thước lớn và nhiều lysosome trong bào tương, ty lạp thể và những không bào lớn có khả năng thực bào (Lê Thị Hoàng Mỹ, 2007). Tế bào lympho có vai trò quan trọng trong miễn dịch đặc hiệu sau khi liên kết với

các mô của cơ quan đích, bảo vệ cơ thể bằng miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào, các tiểu cầu đảm nhiệm vai trò quan trọng trong quá trình đông máu (Chinabut *et al.*, 1991; Lê Thị Hoàng Mỹ, 2007).

3.2.2 Kết quả phân tích hoạt tính lysozyme

Sau 21 ngày, kết quả phân tích hoạt tính lysozyme trong huyết thanh cá tra ở các nghiệm thức bổ sung inulin và FOS dao động từ 296,33 - 342,72 U/ml, tăng cao có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với đối chứng (175,72 U/ml). Sau 28 ngày, các nghiệm thức bổ sung inulin và FOS vẫn tăng cao có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với đối chứng (187,61 U/ml). Cụ thể, NT3 (1% inulin) có hoạt tính lysozyme cao nhất (373,50 U/ml). Hoạt tính lysozyme ở các nghiệm thức sau 28 ngày khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với hoạt tính lysozyme ở các nghiệm thức sau 21 ngày ($p > 0,05$) (Hình 2).



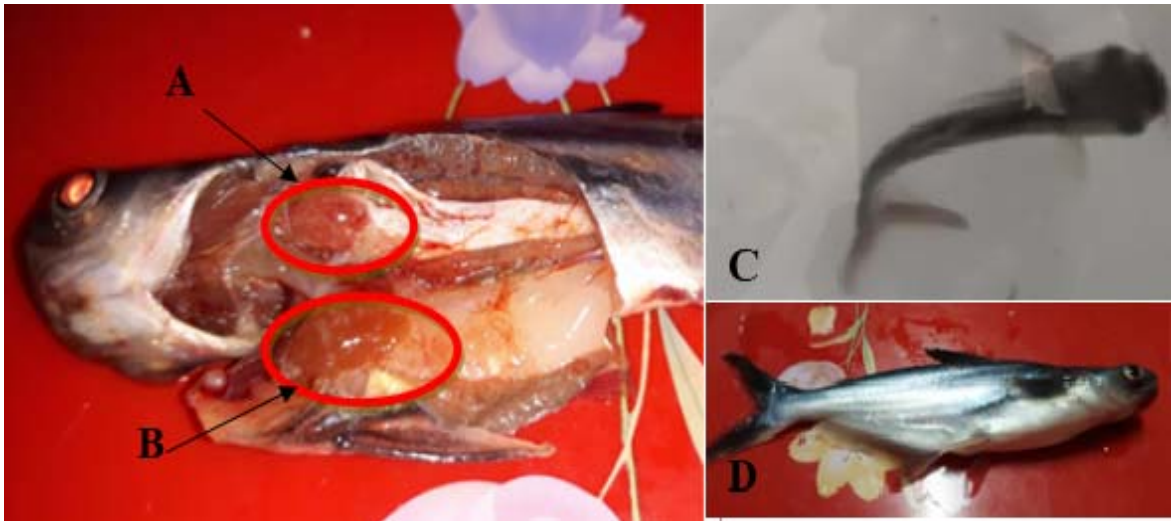
Hình 2: Biểu đồ hoạt tính lysozyme sau khi bổ sung inulin và FOS

Ghi chú: các ký hiệu giống nhau trong cùng một đợt thu mẫu (a, b, c), (A, B, C) thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)

Nghiên cứu của Tiengtam *et al.* (2017) về bổ sung inulin và củ Củc Vu vào thức ăn của cá rô phi vằn (*Oreochromis niloticus*) giai đoạn giống cho kết quả nghiệm thức bổ sung 0,5% inulin có hàm lượng lysozyme tăng cao và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ($p < 0,05$). Tương tự, khi bổ sung 0,5% inulin vào thức ăn của cá rô phi vằn (*Oreochromis niloticus*) trong 2 tháng và cảm nhiễm cá với *Aeromonas hydrophila* cũng ghi nhận sự gia tăng hoạt tính lysozyme ở cá được bổ sung 0,5% inulin (Ibrahem *et al.*, 2010). Kết quả nghiên cứu bổ sung FOS vào thức ăn của cá dầy (*Rutilus rutilus*) giai đoạn cá bột đã được Soleimani *et al.* (2012) tiến hành trong 7 tuần cho thấy các nghiệm thức bổ sung 1%, 2% và 3% FOS đều làm tăng hoạt tính lysozyme huyết thanh. Trong đó, nghiệm thức 2% và 3% cao hơn có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ($p < 0,05$). Một nghiên cứu khác cho kết quả bổ sung 1% FOS vào thức ăn cá tầm sao giống (*Acipenser stellatus*) trong vòng 11 tuần làm tăng hàm lượng lysozyme huyết thanh khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức 0% và 2% FOS ($p < 0,05$) (Reza *et al.* 2013).

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

Cá ở nghiệm thức đối chứng âm (tiêm nước muối sinh lí) khỏe mạnh và không có bất cứ dấu hiệu bệnh lý nào. Trong khi cá được tiêm vi khuẩn bơi lờ đờ không định hướng, khi giải phẫu có nhiều đốm trắng đục xuất hiện trên gan, thận và tỳ tạng của cá (Hình 4). Các dấu hiệu bệnh lý này hoàn toàn giống với mô tả bệnh lý của cá tra bị nhiễm *E. ictaluri* (Tu Thanh Dung *et al.*, 2008). Kết quả ở Hình 5 cho thấy cá bắt đầu chết vào ngày thứ 4 và đến ngày thứ 8 hầu như cá không còn chết. Tỷ lệ chết của cá ở các nghiệm thức được bổ sung inulin và FOS đều thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng (90,67%). Cụ thể, tỷ lệ chết ở NT2 là 54,67%, NT3 là 42,67%, NT4 là 76,33% và NT5 là 62% và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng (NT1). Riêng NT6 (đối chứng âm) cá khỏe mạnh và không chết trong suốt quá trình thí nghiệm. Kết quả RPS của cá ở các nghiệm thức bổ sung inulin và FOS khá cao, NT3 có RPS cao nhất 57,33%, kế tiếp là NT2 đạt 45,33%, NT5 có RPS là 38% và NT4 đạt 23,67%.

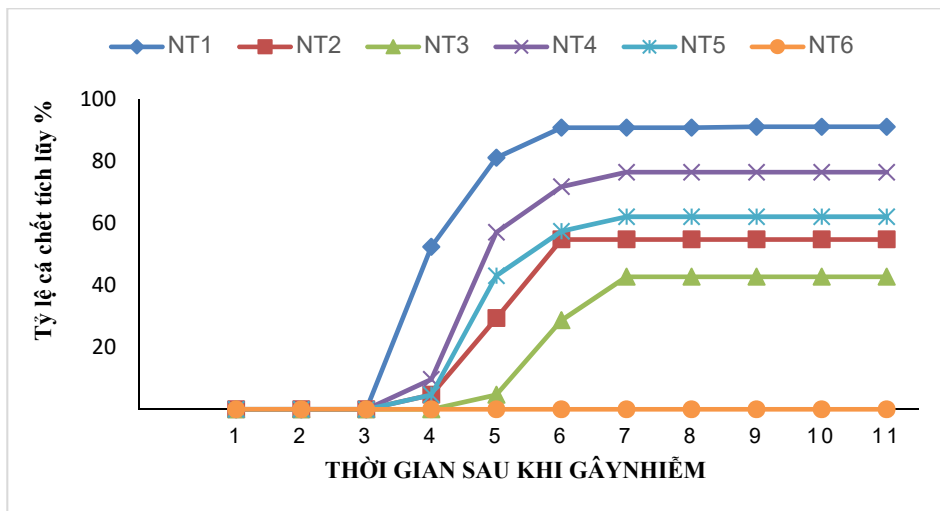


Hình 4: Thận cá có đốm trắng (A), gan cá có đốm trắng (B), cá bệnh bơi lờ đờ (C), cá bị xuất huyết nhẹ ở các gốc vây (D)

Tương tự, Lê Thị Mai Anh (2013) nghiên cứu bổ sung FOS lên tăng trưởng và hoạt tính enzyme tiêu hóa của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*), với các mức bổ sung 0,5%, 1,0%, 1,5% và 2,0% trong vòng 3 tháng. Kết quả cho thấy tỷ lệ sống đạt cao nhất (100%) ở mức bổ sung 0,5% và 1,0%, thấp nhất (82,1%) ở mức bổ sung 1,5% FOS ($p < 0,05$). Một nghiên cứu khác của Đào Ngọc Thủy và *ctv.* (2012) về ảnh hưởng của monooligosaccharide (MOS) trong sản phẩm Actigen™ lên tốc độ tăng trưởng, cải thiện sức khỏe và khả năng miễn dịch của cá tra

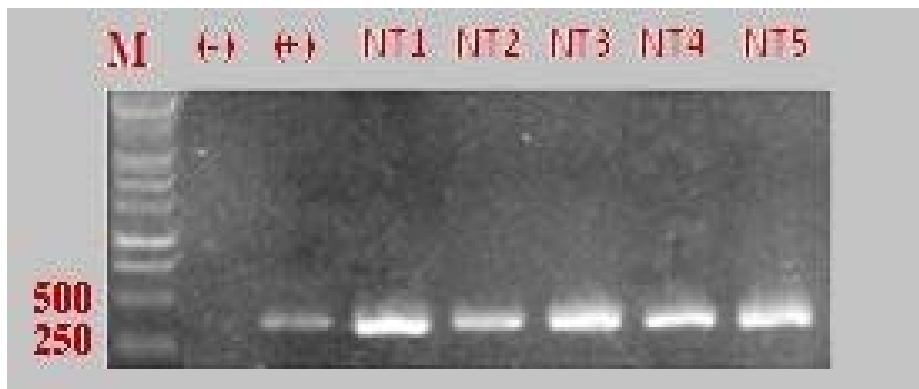
(*Pangasianodon hypophthalmus*) cho thấy bổ sung 800 và 1200 g Actigen/tấn thức ăn làm gia tăng sinh trưởng của cá ($p < 0,05$). Khi gây cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* thì tỷ lệ sống của cá tra sau 14 ngày gây cảm nhiễm có khuynh hướng gia tăng với các liều bổ sung Actigen nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa so với đối chứng ($p > 0,05$).

Kết quả PCR cho thấy cả 5 mẫu cá cảm nhiễm với vi khuẩn đều xuất hiện vạch 407 bp, vạch đặc hiệu của vi khuẩn *E. ictaluri*.



Hình 5: Tỷ lệ chết tích lũy của cá tra bổ sung inulin và FOS sau cảm nhiễm với *E. ictaluri*

Ghi chú: NT1: đối chứng tiêm vi khuẩn; NT2: 0,5% inulin + vi khuẩn; NT3: 1% inulin + vi khuẩn; NT4: 0,5% FOS + vi khuẩn; NT5: 1% FOS + vi khuẩn; NT6: đối chứng tiêm NaCl



Hình 6: Kết quả PCR tái định danh vi khuẩn *E. ictaluri*

(M: thang ADN; (-): đối chứng âm; (+): đối chứng dương, NT1, NT2, NT3, NT4, NT5: các nghiệm thức cảm nhiễm với *E. ictaluri*)

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Sau 4 tuần bổ sung inulin và FOS vào thức ăn cá tra, tốc độ tăng trưởng của cá tăng cao so với nghiệm thức đối chứng. Các tra được bổ sung thức ăn có chứa inulin và FOS sau 21 và 28 ngày cho thấy có sự kích thích đáp ứng miễn dịch thông qua gia tăng chỉ tiêu huyết học, hoạt tính lysozyme. Sau 28 ngày, nghiệm thức 1% inulin cho kết quả tốt nhất trong các nghiệm thức bổ sung. Sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*, tỉ lệ chết của cá ở nghiệm thức bổ sung inulin và FOS thấp hơn so với đối chứng. Trong đó, tỉ lệ chết của cá ở nghiệm thức 3 (1% inulin) có tỉ lệ chết thấp nhất là 42,67%, cho kết quả RPS cao nhất 57,33%.

Các nghiên cứu về ảnh hưởng của chu kỳ bổ sung inulin và FOS lên tăng trưởng, đáp ứng miễn dịch và khả năng đề kháng vi khuẩn của cá tra cần được tiến hành. Từ các kết quả trên, nồng độ và chu

kỳ bổ sung inulin vào thức ăn cho cá cần được triển khai ứng dụng vào mô hình nuôi cá tra thực tế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmdifar, E., Akrami, R., Ghelichi, A., and Zarejabad, A.M., 2011. Effects of different dietary prebiotic inulin levels on blood serum enzymes, hematologic, and biochemical parameters of great sturgeon (*Huso huso*) juveniles. *Comparative Clinical Pathology*. 20(5): 447-451.
- Bùi Thị Bích Hằng, Lê Văn Tèo, Trương Quỳnh Như và Nguyễn Thanh Phương, 2017. Ảnh hưởng của levamisole lên một số chỉ tiêu miễn dịch và khả năng kháng bệnh ở cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 48b: 1-9.
- Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương, 2010. Phát hiện vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh mù gan trên cá tra (*Pangasianodon*

- hypophthalmus) bằng phương pháp PCR. Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 13: 151-159.
- Đào Ngọc Thủy, Ngô Lâm Trung Nguyên và Lê Thanh Hùng, 2012. Ảnh hưởng của mannan oligosaccharide trong sản phẩm ActigenTM lên khả năng tăng trưởng và cải thiện sức khỏe cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Trong Tuyển tập Hội nghị Khoa học trẻ ngành thủy sản toàn quốc lần thứ III, ngày 24 – 25 tháng 3 năm 2012, Huế. Trang 222 – 229.
- Đỗ Thị Thanh Hương, 2014. Ảnh hưởng của fructooligosaccharide trong thức ăn lên một số chỉ tiêu sinh lý, enzyme tiêu hóa, tăng trưởng và khả năng chịu stress của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) giống. Báo cáo tổng kết đề tài khoa học và công nghệ cấp trường, Trường Đại học Cần Thơ. 83 trang.
- Dung, T.T., Ngọc, N.T.N., Thinh, N.Q., et al., 2008. Common diseases of *Pangasius catfish* farmed in Viet Nam. *Global Aquaculture Advocate*. 11(4): 77-78.
- Ellis, A.E., 1990. Lysozyme Assays. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S. and Van Muiswinkel, W.B., (Eds.). *Techniques in Fish Immunology* Fair Haven, SOS Publications, Fair Haven, pp. 101-103.
- Eshaghzadeh, H., Hoseinifar, S.H., Vahabzadeh, H. and Ringø, E., 2015. The effects of dietary inulin on growth performances, survival and digestive enzyme activities of common carp (*Cyprinus carpio*) fry. *Aquaculture Nutrition*. 21(2): 242-247.
- Glomski, C.A. and Pica, A., 2006. Erythrocyte of the piokilothrems: A phylogenesis odyssey. Foxwell & Davies (UK) Limited publisher, 438 pages.
- Grisdale-Helland, B., Helland, S. J. and Gatlin, D. M., 2008. The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*. 283(1): 163-167.
- Hoseinifar, S.H., Ahmadi, A., Raeisi, M., et al., 2016. Comparative study on immunomodulatory and growth enhancing effects of three prebiotics (galactooligosaccharide, fructooligosaccharide and inulin) in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Research*. 48(7): 3298-3307.
- Hrubec, T.C., Cardinale, J.L., Smith, S.A., 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for culture tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Vet Clin Pathol* 2000. 29: 7-12.
- Ibrahim, M.D., Fathi, M., Mesalhy, S., Abd El-Aty, A.M., 2010. Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology*. 29: 241-246.
- Lê Thị Hoàng Mỹ, 2007. Tạo máu và sinh lý hồng cầu. Giáo trình huyết học và miễn dịch. Trường Đại học Y Dược Cần Thơ. 255 trang.
- Lê Thị Mai Anh, 2013. Ảnh hưởng của Fructooligosaccharide trong thức ăn lên một số chỉ tiêu sinh lý và tăng trưởng của cá tra giống (*Pangasianodon hypophthalmus*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học: 31:79-86.
- Mahious, A.S., Gatesoupe, F.J., Hervi, M., Metailler, R., Ollevier, F., 2006. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). *Aquaculture International*. 14:219-229.
- Natt M. P., and Herrick C. A., 1952. A new blood diluent for counting erythrocytes and leukocytes of the chicken. *Poult Sci*. 31:735-738.
- Nguyễn Thị Thủy Liễu, Bùi Thị Bích Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2011. Tìm hiểu sự biến động của các yếu tố miễn dịch không đặc hiệu trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nuôi nhiễm vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*. Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 17a: 20-29.
- Reyes-Becerril, M., Ascencio, F., Gracia-Lopez, V., Macias, M.E., Roa, M.C., Esteban, M., 2014. Single or combined effects of *Lactobacillus sakei* and inulin on growth, non-specific immunity and IgM expression in leopard grouper (*Mycteroperca rosacea*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 40: 1169-1180.
- Reza, A., Y. Iri, H.K. Rostami and M.R. Mansour, 2013. Effect of dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) on growth performance, survival, lactobacillus bacterial population and hemato-immunological parameters of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) juvenile. *Fish and Shellfish Immunology*. 35: 1235-1239.
- Rowley, A.F., 1990. Collection, separation and identification of fish leucocytes. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., van Muiswinkel, W.B., (Eds.) *Techniques in fish immunology*. New York: SOS Publications, pp. 113-136.
- Sapkota, A.A.R., Kucharski, M., Burke, J., et al., 2008. Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. *Environment international*, 34(8): 1215-1226.
- Smith, V.J., Brown, J.H. and Hauton, C., 2003. Immunostimulation in crustaceans: Does it really protect against infection?. *Fish and Shellfish Immunology*, 15(1): 71-90
- Soleimani, N., Hoseinifar, S.H., Merrifield, D.L., et al., 2012. Dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) improves the innate immune response, stress resistance, digestive enzyme activities and growth performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish and Shellfish Immunology*, 32(2): 316-321

- Supranee, C., Chalor, L., Praveena, K., 1991. Histology of walking catfish, *Clarias batrachus*. Thailand: AAHRI, 96 pages.
- Tiengtam, N., Paengkoum, P., Sirivoharn, S., Phonsiri, K., Boonanuntanasarn, S., 2017. The effects of dietary inulin and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) tuber on the growth performance, haematological, blood chemical and immune parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Aquaculture Research*. doi:10.1111/are.13341
- Tu Thanh Dung, Haesebrouck F., Nguyen Anh Tuan, Sorgeloos P., Baele M. and Decostere A., 2008. Antimicrobial Susceptibility Pattern of *Edwardsiella ictaluri* isolates from natural outbreaks of Bacillary Necrosis of *Pangasianodon hypophthalmus* in Vietnam. *Microb. Drug Res.* 14(b): 311-316.
- Từ Thanh Dung, 2010. Nghiên cứu huyết học cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bệnh trắng gan trắng mang. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 15b: 81-90
- Từ Thanh Dung, Nguyễn Thị Tiên và Nguyễn Anh Tuấn, 2012. Nghiên cứu tác nhân gây bệnh trắng đuôi trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) và giải pháp phòng trị. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 22c: 136-145
- Zhang, Q., H. Ma, K. Mai, W. Zhang, Z. Liufu and W. Xu, 2010. Interaction of dietary *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on the growth performance, non-specific immunity of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology* 29, 204-211.