



DOI:10.22144/ctu.jvn.2019.108

ẢNH HƯỞNG CỦA VIỆC BỔ SUNG FRUCTOOLIGOSACCHARIDES VÀ VI KHUẨN *Bacillus subtilis* VÀO THỨC ĂN LÊN HỆ MIỄN DỊCH VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG BỆNH CỦA CÁ ĐIỀU HỒNG (*Oreochromis* SP.)

Bùi Thị Bích Hằng* và Nguyễn Thanh Phương

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

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

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 26/12/2018

Ngày nhận bài sửa: 02/03/2019

Ngày duyệt đăng: 30/08/2019

Title:

Effect of dietary fructooligosaccharides and *Bacillus subtilis* on immune system and bacterial resistance of red tilapia (*Oreochromis* sp.)

Từ khóa:

Bacillus subtilis, cá điều hồng, fructooligosaccharides, *Streptococcus agalactiae*

Keywords:

Bacillus subtilis, fructooligosaccharides, red tilapia, *Streptococcus agalactiae*

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the effects of dietary *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharides (FOS) on immune response and disease resistance of red tilapia (*Oreochromis* sp.). The experiment was in a completely randomized design with 4 treatments including control; *B. subtilis* (10^7 CFU/g); *B. subtilis* (10^7 CFU/g) and 0.2% FOS; *B. subtilis* (10^7 CFU/g) and 0.5% FOS. Sampling was conducted after the fish fed diets containing *B. subtilis* and FOS for 2 weeks, 4 weeks and after 3 days of infection with *Streptococcus agalactiae*. The result of hematology showed that the total erythrocyte, leukocyte, monocytes, neutrophils, lymphocytes and lysozyme activity were significantly increased ($p < 0.05$) in supplemental treatments of *B. subtilis* and FOS. After *S. agalactiae* infection, the cumulative mortality of fish in treatments of *B. subtilis* and FOS were lower than the one in the control treatment. In particular, the mortality of *B. subtilis* 10^7 CFU/g + 0,5% FOS treatment is the lowest (26.7%) and significantly different with other treatments.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung vi khuẩn *Bacillus subtilis* và fructooligosaccharides (FOS) lên đáp ứng miễn dịch và khả năng kháng bệnh của cá điều hồng (*Oreochromis* sp.). Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 nghiệm thức, bao gồm: Nghiệm thức đối chứng; *B. subtilis* (10^7 CFU/g); *B. subtilis* (10^7 CFU/g) và 0,2% FOS; *B. subtilis* (10^7 CFU/g) và 0,5% FOS. Tiến hành thu mẫu sau khi cá ăn thức ăn được bổ sung vi khuẩn *B. subtilis* và FOS 2 tuần, 4 tuần và sau cảm nhiễm 3 ngày với vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*. Kết quả huyết học cho thấy tổng tế bào hồng cầu, tổng bạch cầu, tế bào đơn nhân, bạch cầu trung tính, tế bào lympho và hoạt tính lysozyme tăng lên có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) ở nghiệm thức bổ sung vi khuẩn *B. subtilis* và FOS. Sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*, tỉ lệ chết tích lũy của cá ở các nghiệm thức bổ sung *B. subtilis* và FOS đều thấp hơn cá đối chứng. Trong đó, tỉ lệ chết ở nghiệm thức bổ sung *B. subtilis* và 0,5% FOS là thấp nhất (26,7%) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại.

Trích dẫn: Bùi Thị Bích Hằng và Nguyễn Thanh Phương, 2019. Ảnh hưởng của việc bổ sung fructooligosaccharides và vi khuẩn *Bacillus subtilis* vào thức ăn lên hệ miễn dịch và khả năng kháng bệnh của cá điều hồng (*Oreochromis* sp.). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(4B): 53-63.

1 GIỚI THIỆU

Cá điêu hồng (*Oreochromis sp.*) là một trong những đối tượng thủy sản quan trọng và có nhiều tiềm năng phát triển trên cả nước, do dễ nuôi, chất lượng thịt ngon. Hiện nay, cá điêu hồng được nuôi phổ biến trong bè với mật độ thả nuôi rất cao ở nhiều tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long như Tiền Giang, Vĩnh Long, Cần Thơ và An Giang. Tuy nhiên, cá điêu hồng được nuôi thâm canh với mật độ cao đã và đang gây ảnh hưởng xấu đến chất lượng môi trường nước, dẫn đến nhiều dịch bệnh xảy ra gây thiệt hại lớn về kinh tế cho người nuôi. Trong số các bệnh phổ biến trên cá điêu hồng, bệnh phù mắt và xuất huyết do vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* là nguy hiểm nhất, gây thiệt hại cao cho nghề nuôi cá điêu hồng thâm canh (Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012). Một trong những phương pháp phổ biến để kiểm soát mầm bệnh trong thủy sản là sử dụng hóa chất và thuốc trong quá trình nuôi. Thực tế cho thấy, khoảng 75% các loại kháng sinh điều trị bằng phương pháp cho ăn có thể rò rỉ ra môi trường nước thông qua bài tiết của cá nuôi và các thức ăn dư thừa (Lalumera *et al.*, 2004). Việc sử dụng hóa chất, kháng sinh không đúng qui định có thể tác động đến môi trường, hiện tượng kháng thuốc của các loài vi khuẩn trên cá hay tồn lưu dư lượng trong sản phẩm thủy sản làm ảnh hưởng xấu đến sức khỏe người tiêu dùng (Shah *et al.*, 2012). Do vậy, việc tìm ra giải pháp để nâng cao sức khỏe, phòng bệnh cho cá nuôi đồng thời hạn chế ảnh hưởng đến môi trường nuôi thủy sản là rất cần thiết. Chế phẩm vi sinh bao gồm các vi khuẩn có lợi đã từ lâu được áp dụng trong phòng ngừa hay điều trị hiệu quả một số bệnh trên vật nuôi trong thủy sản (Akhter *et al.*, 2015). Nhóm vi khuẩn *Bacillus* được sử dụng phổ biến do chúng có nhiều đặc tính có lợi như khả năng chịu được pH thấp của dạ dày, tham gia kích thích đáp ứng miễn dịch và có thể tiết ra các chất kháng khuẩn (Niayak, 2010). Nhiều nghiên cứu đã bổ sung vi khuẩn *Bacillus subtilis* vào thức ăn làm tăng khả năng tiêu hóa và hấp thụ dinh dưỡng của cá, thúc đẩy tăng trưởng, nâng cao đáp ứng miễn dịch và khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh trên một số loài cá nuôi (Cerezuela *et al.*, 2012; Mohapatra *et al.*, 2012). Bên cạnh đó, prebiotic là nguồn thức ăn bổ ích cho các vi sinh vật có lợi, thúc đẩy chúng sinh trưởng nhanh trong hệ tiêu hóa của vật chủ. Nghiên cứu về prebiotic trước đây đã ghi nhận một số lợi ích do prebiotic mang lại cho vật nuôi như tăng trưởng nhanh, cải thiện tình trạng sinh lý và tăng cường hệ miễn dịch (Ringo *et al.*, 2010). Fructooligosaccharide (FOS) là một trong những nguồn prebiotic quan trọng được sử dụng trên nhiều loài cá nuôi như *Pesetta maxima* (Mahious *et al.*, 2006), *Sciaenop ocellatus* (Buentello *et al.*, 2010),

Larimichthys crocea (Ai *et al.*, 2011), *Rutilus rutilus* (Soleimani *et al.*, 2012) và *Acipenser stellatus* (Akrami *et al.*, 2013). Sự kết hợp bổ sung chế phẩm vi sinh và prebiotic sẽ mang lại nhiều lợi ích hơn cho cá nuôi như nâng cao tỉ lệ sống, tăng cường hệ vi sinh đường ruột giúp cá hấp thu tốt thức ăn, tăng trưởng nhanh hơn và tăng sức đề kháng, hạn chế bị ảnh hưởng bởi các tác nhân gây bệnh (Zhang *et al.*, 2014). Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu kết hợp bổ sung chế phẩm vi sinh và prebiotic trên cá điêu hồng. Vì thế, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá khả năng ảnh hưởng của việc bổ sung *Bacillus subtilis* và fructooligosaccharides vào thức ăn lên đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu và khả năng kháng bệnh phù mắt, xuất huyết trên cá điêu hồng.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Thí nghiệm bổ sung FOS và *Bacillus subtilis*

Cá điêu hồng (*Oreochromis sp.*) có kích cỡ 6 – 10 g/con được chuyển về phòng thí nghiệm và thuần dưỡng 2 tuần để thích nghi với điều kiện thí nghiệm. Trước khi thí nghiệm, 5 cá được bắt ngẫu nhiên và kiểm tra lâm sàng về hình dạng, ký sinh trùng và vi khuẩn.

Chuẩn bị thức ăn: Thức ăn sử dụng cho thí nghiệm là thức ăn công nghiệp (28% đạm, Proconco). FOS (Sigma) và vi khuẩn *B. subtilis* (Công ty sinh phẩm Khánh Hòa) được bổ sung vào thức ăn bằng cách trộn hỗn hợp vi khuẩn *B. subtilis* và FOS vào trong 10 mL nước theo tỉ lệ của mỗi nghiệm thức và phun đều vào thức ăn, để khô tự nhiên trong 2 giờ. Sau đó, áo ngoài viên thức ăn bằng một lớp dầu mực, tiếp tục để khô ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ. Thức ăn được đóng gói và trữ ở 4°C trong thời gian thí nghiệm.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 nghiệm thức, 3 lần lặp lại. Các nghiệm thức bao gồm NT1: đối chứng (không bổ sung *B. subtilis* và FOS); NT2: bổ sung *B. subtilis* (10^7 CFU/g); NT3: bổ sung *B. subtilis* (10^7 CFU/g) và 0,2% FOS; NT4: bổ sung *B. subtilis* (10^7 CFU/g) và 0,5% FOS. Cá được bố trí với số lượng 40 cá/bể và cho ăn 2 lần/ngày với khẩu phần là 5% trọng lượng thân trong thời gian 4 tuần. Tiến hành thu mẫu vào tuần thứ 2 và 4 sau khi cá được bổ sung FOS và *B. subtilis*. Mỗi đợt thu mẫu 3 cá/bể, phân tích chi tiêu huyết học (xác định tổng hồng cầu, tổng bạch cầu và định lượng từng loại bạch cầu) và hoạt tính lysozyme và bổ thể.

2.2 Thí nghiệm cảm nhiễm

Sau 4 tuần bổ sung FOS và *B. subtilis*, cá thí nghiệm được tiến hành gây cảm nhiễm với vi khuẩn

S. agalactiae. Vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường Brain Heart Infusion Broth (BHIB), ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng là 610 nm. Sau đó pha loãng vi khuẩn đến mật độ 10^5 CFU/mL để tiến hành cảm nhiễm cho cá. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 10 nghiệm thức, trong đó mỗi nghiệm thức của thí nghiệm bổ sung FOS và *B. subtilis* được chia thành 2 nghiệm thức nhỏ, một sử dụng làm đối chứng (tiêm 0,1 mL NaCl (0,85%)) và một sử dụng để cảm nhiễm vi khuẩn (tiêm 0,1 mL *S. agalactiae*). Thí nghiệm bố trí 15 cá/bể, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Mỗi cá được tiêm 0,1 mL vi khuẩn (10^5 CFU/mL). Ghi nhận những biểu hiện lâm sàng và tỉ lệ chết của cá trong suốt 14 ngày sau khi cảm nhiễm. Dấu hiệu bệnh lý được ghi nhận, mẫu thận trước được trữ trong ethanol để tái định danh vi khuẩn. Sau 3 ngày gây cảm nhiễm thu 9 cá/nghiệm thức để phân tích các chỉ tiêu huyết học (tổng hồng cầu, tổng bạch cầu, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính, tế bào lympho và tiểu cầu) và hoạt tính lysozyme. Thí nghiệm được bố trí trong điều kiện có sục khí, không thay nước trong suốt quá trình thí nghiệm, cá được cho ăn thức ăn đối chứng theo nhu cầu.

Tỉ lệ chết (%) = (Tổng số cá chết / Tổng số cá thí nghiệm) x 100

2.3 Phương pháp phân tích các chỉ tiêu huyết học

Định lượng hồng cầu (Natt and Herrick, 1952), mật độ hồng cầu được xác định bằng buồng đếm Neubauer và tính theo công thức: $HC = C \times 10 \times 5 \times 200$ (tb/mm³) (C: Tổng số hồng cầu trong 5 vùng đếm).

Định lượng tổng bạch cầu và từng loại bạch cầu (Hrubec et al., 2000). Trãi mẫu máu bằng cách nhỏ một giọt máu lên lame, sau đó dùng lamelle chạm vào giọt máu và đẩy lamelle ngược về phía trước. Mẫu máu sau khi khô được cố định trong methanol 1 phút. Để mẫu khô tự nhiên và nhuộm Wright & Giemsa. Tổng số lượng bạch cầu được tính theo công thức:

TBC (tb/mm³) = (Số BC trong 1,500 tế bào x R)/Số HC trong 1,500 tế bào (TBC: mật độ tổng bạch cầu, BC: bạch cầu, R: mật độ hồng cầu, HC: hồng cầu).

Định lượng từng loại bạch cầu trong tổng số 200 tế bào bạch cầu. Tính mật độ từng loại bạch cầu theo

công thức: Mật độ loại bạch cầu (tb/mm³) = (Số lượng mỗi loại bạch cầu x TBC)/200

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

2.4 Phương pháp PCR định danh vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*

Vi khuẩn *S. agalactiae* được phát hiện theo phương pháp PCR được mô tả bởi Trần Thị Tuyết Hoa và ctv. (2014). Sản phẩm DNA khuếch đại đặc hiệu hiện vạch ở vị trí 220 bp.

2.5 Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả các số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel và SPSS với mức ý nghĩa 5%.

3 KẾT QUẢ

3.1 Ảnh hưởng của chế độ cho ăn thức ăn bổ sung FOS và vi khuẩn *Bacillus subtilis* lên các chỉ tiêu miễn dịch của cá

3.1.1 Tổng hồng cầu

Kết quả thí nghiệm cho thấy mật độ hồng cầu ở các nghiệm thức dao động từ $1,1 \times 10^6$ tb/mm³ đến $1,96 \times 10^6$ tb/mm³. Sau 2 tuần và 4 tuần cá sử dụng thức ăn bổ sung *B. subtilis* và FOS, mật độ hồng cầu ở các nghiệm thức bổ sung đều tăng cao so với nghiệm thức đối chứng, trong đó NT4 có mật độ hồng cầu cao nhất lần lượt là $1,87 \times 10^6$ tb/mm³ và $1,96 \times 10^6$ tb/mm³ ở 2 đợt thu mẫu, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với NT1 và NT2 (p<0,05). Mật độ hồng cầu ở cá được bổ sung *B. subtilis* và FOS trong 4 tuần cao hơn so với các nghiệm thức chỉ bổ sung trong 2 tuần, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê (p > 0,05). Sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*, mật độ hồng cầu ở NT3 và NT4 tăng cao lần lượt là 1,39 và $1,85 \times 10^6$ tb/mm³, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức đối chứng ($0,85 \times 10^6$ tb/mm³) và NT2 ($0,91 \times 10^6$ tb/mm³) (p<0,05), trong đó NT4 có giá trị cao nhất. Mật độ hồng cầu ở các nghiệm thức giảm so với thời điểm trước khi cảm nhiễm, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê (p>0,05) (Bảng 1).

Bảng 1: Mật độ hồng cầu ($\times 10^6$ tb/mm³) ở cá điều hồng sau khi bổ sung *B. subtilis* và FOS

Thí nghiệm	Thời gian cho ăn thức ăn bổ sung		Sau khi gây cảm nhiễm 3 ngày	
	2 tuần	4 tuần	Tiêm nước muối	Tiêm vi khuẩn
NT1	1,10 ± 0,11 ^{Aa}	1,10 ± 0,19 ^{Aa}	1,11 ± 0,21 ^{Aa}	0,85 ± 0,22 ^{Aa}
NT2	1,17 ± 0,32 ^{Aa}	1,20 ± 0,22 ^{Aa}	1,19 ± 0,04 ^{Aa}	0,91 ± 0,26 ^{Aa}
NT3	1,29 ± 0,20 ^{Aab}	1,49 ± 0,34 ^{Aab}	1,31 ± 0,18 ^{Aab}	1,39 ± 0,32 ^{Ab}
NT4	1,87 ± 0,36 ^{Ab}	1,96 ± 0,10 ^{Ab}	1,91 ± 0,22 ^{Ab}	1,85 ± 0,07 ^{Ac}

Ghi chú: 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 ($p > 0,05$).

Chỉ tiêu huyết học là một công cụ quan trọng trong việc đánh giá tình trạng sinh lý và sức khỏe của động vật bao gồm cá. Thông thường, các loại tế bào máu được kiểm tra nhằm phản ánh những ảnh hưởng của các chất kích thích miễn dịch lên hệ miễn dịch cá (Maita, 2007). Kết quả thí nghiệm này cho thấy bổ sung vi khuẩn *B. subtilis* và FOS làm thúc đẩy gia tăng tế bào hồng cầu ở cá. Thí nghiệm trước đây cũng đã ghi nhận các chỉ tiêu huyết học bao gồm tế bào hồng cầu, hemoglobin ở cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) sử dụng thức ăn chứa Biogen® (hỗn hợp *Bacillus licheniformes* và *B. subtilis*) cao hơn có ý nghĩa so với nhóm cá đối chứng (Khattab *et al.*, 2004). Marzouk *et al.* (2008) cũng báo cáo có sự gia tăng tế bào hồng cầu ở cá *O. niloticus* sau khi bổ sung *B. subtilis* và *Saccharomyces cerevisiae* vào thức ăn. Nghiên cứu bổ sung vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* vào thức ăn cho cá *Oncorhynchus mykiss* cũng làm gia tăng tế bào hồng cầu và hàm lượng hemoglobin (Faramazi *et al.*, 2011). Tương tự, cá *Acipenser stellatus* sử dụng thức ăn có chứa FOS cũng có mật độ tế bào hồng cầu tăng cao hơn cá đối chứng

(Akrami *et al.*, 2013). Tuy nhiên thí nghiệm của Guilherme *et al.* (2014) chỉ ra rằng bổ sung *B. subtilis* vào thức ăn cá rô phi nuôi ở mật độ thấp không làm thay đổi mật độ hồng cầu, nhưng khi nuôi cá ở mật độ cao thì mật độ hồng cầu giảm thấp hơn so với cá đối chứng.

3.1.2 Tổng bạch cầu

Sau 2 tuần, mật độ tổng bạch cầu của cá sử dụng thức ăn có bổ sung *B. subtilis* và FOS ($11,39 - 23,15 \times 10^4$ tb/mm³) tăng cao hơn so với cá ở nghiệm thức đối chứng ($8,75 \times 10^4$ tb/mm³), tuy nhiên NT2 và NT3 không khác biệt thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p > 0,05$). Tổng bạch cầu ở NT4 tăng cao nhất ($23,15 \times 10^4$ tb/mm³) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$). Sau 4 tuần bổ sung *B. subtilis* và FOS, tổng bạch cầu của cá ở NT3 và NT4 lần lượt là 17,2 và $23,63 \times 10^4$ tb/mm³, tăng cao có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($8,86 \times 10^4$ tb/mm³). Giữa hai đợt thu mẫu, tổng bạch cầu của cá ở lần thu mẫu của tuần thứ 4 cao hơn so với lần thu mẫu của tuần thứ 2, nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) (Bảng 2).

Bảng 2: Mật độ tổng bạch cầu ($\times 10^4$ tb/mm³) ở cá điều hồng sau khi bổ sung *B. subtilis* và FOS

Thí nghiệm	Thời gian cho ăn thức ăn bổ sung		Sau khi gây cảm nhiễm 3 ngày	
	2 tuần	4 tuần	Tiêm nước muối	Tiêm vi khuẩn
NT1	8,75 ± 2,32 ^{Aa}	8,86 ± 5,08 ^{Aa}	8,89 ± 2,21 ^{Aa}	9,53 ± 1,09 ^{Aa}
NT2	11,39 ± 2,48 ^{Aa}	12,32 ± 4,08 ^{Aa}	12,18 ± 0,60 ^{Aa}	13,82 ± 2,18 ^{Aa}
NT3	13,65 ± 4,64 ^{Aa}	17,20 ± 2,79 ^{Aab}	17,01 ± 3,49 ^{Aab}	25,77 ± 1,86 ^{Bb}
NT4	23,15 ± 4,48 ^{Ab}	23,63 ± 3,18 ^{Ab}	23,02 ± 2,88 ^{Ab}	36,09 ± 6,57 ^{Bc}

Ghi chú: 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 ($p > 0,05$).

Sau khi gây cảm nhiễm, tổng bạch cầu của các nghiệm thức tiêm vi khuẩn *S. agalactiae* đều tăng lên so với các nghiệm thức tiêm nước muối, trong đó NT3 và NT4 tăng cao ($25,77$ và $36,09 \times 10^4$ tb/mm³) có ý nghĩa so với các nghiệm thức tương ứng không chịu tác động bởi vi khuẩn. Giữa các nghiệm thức được tiêm vi khuẩn, tổng bạch cầu ở các nghiệm thức bổ sung *B. subtilis* và FOS cũng tăng cao, trong đó NT3, NT4 tăng khác biệt có ý nghĩa thống kê so với NT1 và NT2. Nghiệm thức NT4 có mật độ tổng bạch cầu tăng cao nhất và khác biệt với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$) (Bảng 2).

Kết quả trên cho thấy bổ sung *B. subtilis* và FOS có tác dụng kích thích làm gia tăng tế bào bạch cầu ở cá điều hồng. Maryam and Masood (2014) cũng thực hiện thí nghiệm bổ sung *B. subtilis* vào thức ăn cho cá hồi (*O. mykiss*) với tỉ lệ 10^7 tế bào/g thức ăn. Cá sử dụng thức ăn được bổ sung *B. subtilis* có mật độ bạch cầu cao hơn so với cá ở nhóm đối chứng. Ngoài ra, một số tác giả còn ghi nhận chế phẩm vi sinh thường ít tác động lên tế bào hồng cầu, nhưng luôn tác động theo hướng có lợi cho các tế bào bạch cầu ở cá như bổ sung vi khuẩn *Bacillus* vào thức ăn

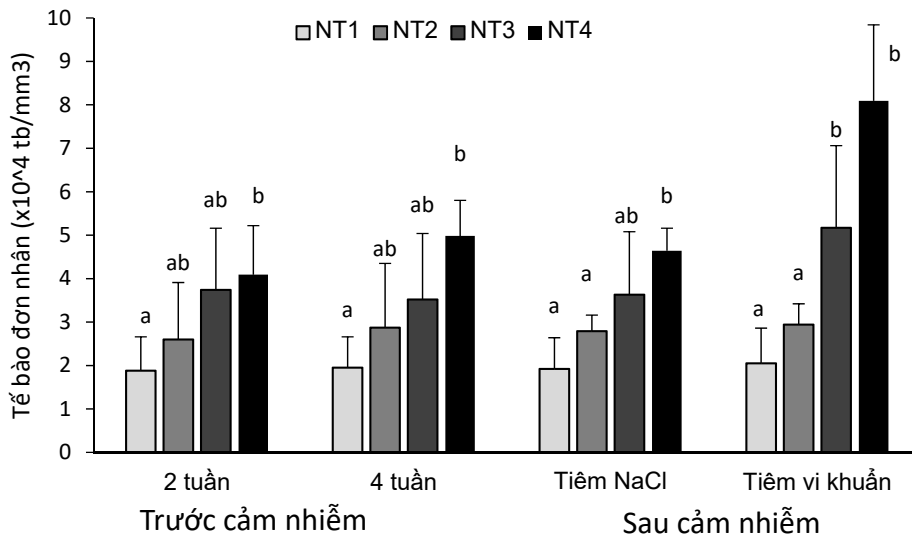
cho cá rô phi, cá hồi làm tăng mật độ bạch cầu trong máu của cá (Aly *et al.*, 2008; Capkin and Altinok, 2009). Bên cạnh đó, nghiên cứu của Akrami *et al.* (2013) cho thấy bổ sung 1% FOS cũng làm tăng mật độ tế bào bạch cầu ở cá *Acipenser stellatus*.

3.1.3 Tế bào đơn nhân

Kết quả cho thấy mật độ tế bào đơn nhân của cá ở các nghiệm thức được bổ sung *B. subtilis* và FOS tăng cao hơn nghiệm thức đối chứng ở cả 2 đợt thu mẫu (Hình 1). Tuy nhiên, chỉ có nghiệm thức NT4 cho kết quả tăng cao nhất ($5,04 \times 10^4$ tb/mm³) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Sau cảm nhiễm với vi khuẩn, mật độ tế bào đơn nhân của cá ở các nghiệm thức NT3, NT4 tăng cao có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với những nghiệm thức còn lại.

Kết quả này tương tự với kết quả thí nghiệm của Moheb *et al.* (2015) khi cho cá *Acipenser baerii* sử

dụng thức ăn có bổ sung *Lactobacillus plantarum* trong 45 ngày. Mật độ tế bào đơn nhân của cá tăng lên từ ngày thứ 30 và khác biệt có ý nghĩa với nghiệm thức đối chứng ở ngày 45 sau khi bổ sung *L. plantarum*. Standen *et al.* (2013) cũng cho biết có sự gia tăng mật độ tế bào đơn nhân, tế bào bạch cầu trung tính trong máu, cũng như gia tăng biểu hiện gen TNF α có vai trò trong việc kích hoạt đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu của cá khi sử dụng thức ăn có bổ sung chế phẩm sinh học. Tế bào đơn nhân là một trong những tế bào bạch cầu có vai trò quan trọng trong hệ miễn dịch không đặc hiệu của cá. Chúng thực hiện nhiều nhiệm vụ miễn dịch khác nhau như bổ sung các đại thực bào và tế bào dendritic ở tình trạng bình thường; khi viêm nhiễm, bạch cầu đơn nhân có thể di chuyển nhanh chóng đến các mô bị nhiễm trong vòng từ 8-10 giờ và sẽ biệt hóa thành các đại thực bào để tạo ra đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu với tác nhân gây bệnh (Vojgani, 2001).



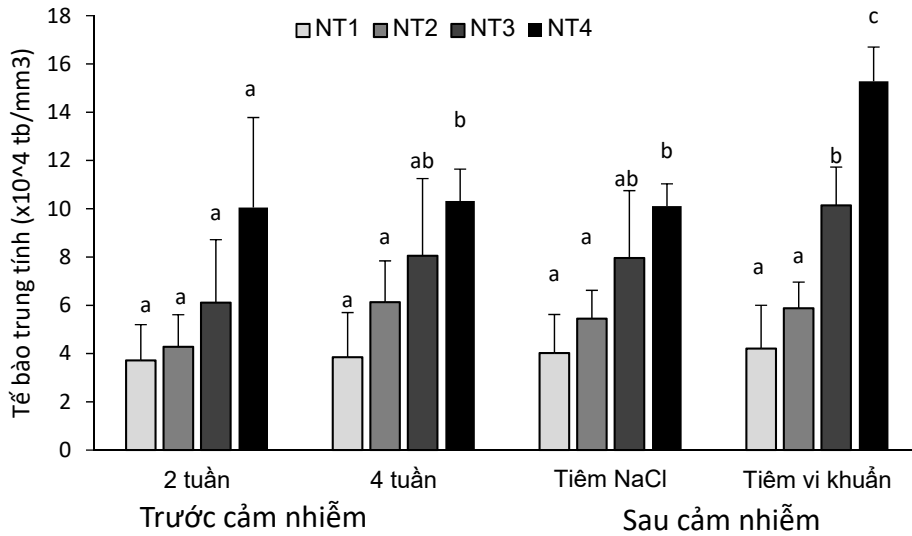
Hình 1: Biểu đồ mật độ tế bào đơn nhân ($tb \times 10^4 / mm^3$) ở cá điều hòa khi cho ăn thức ăn bổ sung *B. subtilis* và FOS

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

3.1.4 Tế bào trung tính

Sau 2 tuần bổ sung *B. subtilis* và FOS, mật độ bạch cầu trung tính gia tăng ở các nghiệm thức được bổ sung nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức. Mật độ tế bào trung tính tiếp tục tăng sau 4 tuần bổ sung *B. subtilis* và FOS, nghiệm thức NT4 cho kết quả mật độ tế bào trung

tính cao nhất ($10,47 \times 10^4$ tb/mm³) và có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng NT1 ($3,82 \times 10^4$ tb/mm³). Sau 3 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*, mật độ tế bào trung tính tăng cao ở các nghiệm thức được tiêm vi khuẩn. Nghiệm thức NT4 có mật độ bạch cầu trung tính cao nhất ($15,33 \times 10^4$ tb/mm³), khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$) (Hình 2).



Hình 2: Biểu đồ mật độ tế bào trung tính ($tb \times 10^4 / mm^3$) ở cá điêu hồng khi cho ăn thức ăn bổ sung *B. subtilis* và FOS

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

Tương tự, Guerreiro *et al.* (2014) thực hiện thí nghiệm bổ sung FOS (0; 0,5; 1 và 2%) vào thức ăn cho cá *Scophthalmis maximus* trong 9 tuần. Kết quả cho thấy, FOS làm gia tăng mật độ tổng bạch cầu nhưng không tác động lên mật độ tế bào trung tính. Một nghiên cứu khác tiến hành bổ sung 2 loại vi khuẩn có lợi *Enterococcus faecium* và *Carnobacterium divergens* vào thức ăn cho cá chép trong 60 ngày. Cá ở các nghiệm thức được bổ sung chế phẩm sinh học cho thấy có sự gia tăng hoạt tính của tế bào trung tính, đồng thời cao nâng cao tỉ lệ sống của cá chép khi cảm nhiễm với vi khuẩn gây bệnh *Aeromonas hydrophila*. Tỉ lệ bảo hộ cho cá lên đến 78% (Ayyaru and Arul, 2011). Bổ sung chế phẩm vi sinh vào thức ăn cá đồng nghĩa với việc kích hoạt các dòng tế bào bạch cầu có hạt như tế bào trung tính trong quá trình đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu của cá nhằm tiêu diệt các tác nhân gây bệnh (Wang *et al.*, 2008).

3.1.5 Tế bào lympho

Sau 2 đợt thu mẫu, tế bào lympho có tăng nhẹ ở các nghiệm thức bổ sung *B. subtilis* và FOS, tuy nhiên mật độ lympho của cá ở NT2 và NT3 không khác biệt so với nghiệm thức đối chứng. Kết quả tế bào lympho ở NT4 ($8,09 \times 10^3$ tb/mm³) là cao nhất, tăng gấp 2 lần so với nghiệm thức đối chứng ($3,11 \times 10^3$ tb/mm³) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$). Đợt thu mẫu ở tuần thứ 4 cho thấy mật độ tế bào lympho ở các nghiệm thức đều tăng cao hơn so với đợt thu mẫu của tuần thứ 2 ngoại trừ NT4, nhưng sự khác

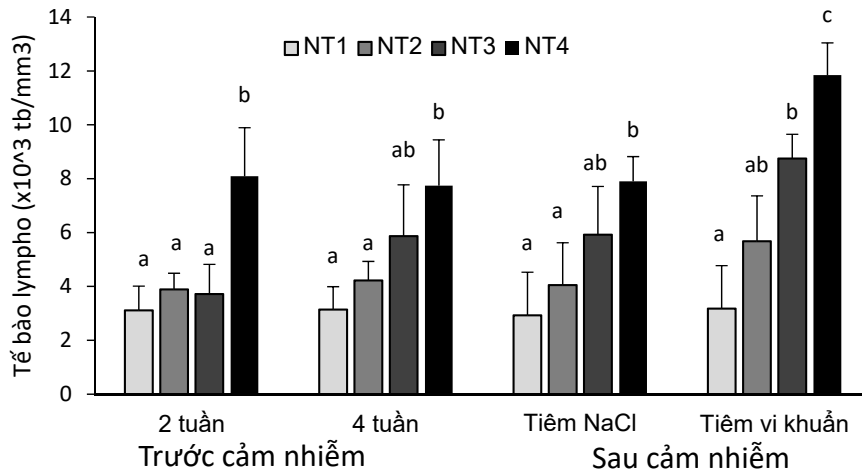
biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) (Hình 3).

Sau khi gây cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*, mật độ tế bào lympho của cá ở các nghiệm thức tiêm vi khuẩn ($3,18 - 11,84 \times 10^3$ tb/mm³) cao hơn nghiệm thức tiêm nước muối sinh lý ($2,93 - 7,90 \times 10^3$ tb/mm³). Tế bào lympho ở các nghiệm thức NT3, NT4 ($8,75$ và $11,84 \times 10^3$ tb/mm³) tăng cao có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), tuần tự gần gấp 3 và 4 lần so với nghiệm thức đối chứng ($3,18 \times 10^3$ tb/mm³) (Hình 3). Qua đó cho thấy, khi bổ sung *B. subtilis* kết hợp với FOS vào thức ăn đã kích thích sự gia tăng số lượng tế bào lympho, từ đó kích thích hoạt động của bạch cầu và nâng cao đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu ở cá.

Kết quả thí nghiệm này tương tự với kết quả nghiên cứu của Maryam and Masood (2014) khi bổ sung *B. subtilis* vào thức ăn của cá hồi, làm tăng tỉ lệ tế bào lympho trong máu của cá. Tế bào lympho là một trong những tế bào miễn dịch quan trọng để kháng lại tác nhân gây bệnh là vi sinh vật thông qua việc kích hoạt tế bào Th2, kích thích tiết ra các cytokine bao gồm interleukin 4, tăng cường sự phát triển của các tế bào tiền thân của tế bào máu, biệt hóa các dòng tế bào gốc và tăng cường hoạt động của đại thực bào (Vojgani, 2001). Sự gia tăng tế bào lympho trong máu cá cũng gián tiếp làm tăng khả năng đáp ứng miễn dịch của cá, làm cá trở nên khỏe mạnh, có sức đề kháng tốt với nhiều tác nhân gây bệnh, các yếu tố kích thích, gây stress của môi trường, điều này sẽ cải thiện tăng trưởng, giảm tỉ lệ

chết ở cá nuôi (Aly *et al.*, 2008). Ngoài ra, Hoseinifar *et al.* (2011) cũng quan sát và ghi nhận một số chỉ tiêu huyết học, bao gồm chỉ số hemoglobin, tổng bạch cầu và nồng độ tế bào lympho tăng cao ở cá *Huso huso* ăn thức ăn có bổ

sung FOS. Tuy nhiên nghiên cứu bổ sung Mannan oligosaccharide cho cá *H. huso* giai đoạn giống lại không ảnh hưởng đến các chỉ tiêu huyết học (Razeghi *et al.*, 2012)



Hình 3: Biểu đồ mật độ tế bào lympho ($\times 10^3$ tb/mm³) ở cá điều hồng sau khi cho ăn thức ăn bổ sung *B. subtilis* và FOS

Ghi chú: Các giá trị có ký tự giống nhau (a, b, c) thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê trong cùng đợt thu mẫu ($p > 0,05$).

3.1.6 Tế bào tiểu cầu

Sau 2 và 4 tuần bổ sung *B. subtilis* và FOS, mật độ tế bào tiểu cầu ở các nghiệm thức đều không thể hiện sự khác biệt với nghiệm thức đối chứng ($p > 0,05$). Sau cảm nhiễm với vi khuẩn, tế bào tiểu cầu của cá ở tất cả các nghiệm thức đều tăng cao so với các nghiệm thức tiêm nước muối. Trong đó, nghiệm thức NT3, NT4 ($1,47$ và $1,24 \times 10^3$ tb/mm³) tăng rất cao, gấp 3 và 2 lần (tuần tự) và có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($0,52 \times 10^3$ tb/mm³).

Sự gia tăng tế bào tiểu cầu của cá ở thí nghiệm này cũng tương đồng với thí nghiệm của Pereira *et al.* (2016) khi bổ sung vi khuẩn có lợi *Weissella cibaria* vào thức ăn cho cá lai (*Pseudoplatystoma reticulatum* ♀ x *P. corruscans* ♂) làm tăng số lượng tế bào tiểu cầu trong máu của cá. Jatoba *et al.* (2011) cũng cho biết có sự gia tăng số lượng tế bào tiểu cầu ở cá rô phi khi sử dụng thức ăn có bổ sung vi khuẩn lactic *L. plantarum*. Tiểu cầu có vai trò quan trọng trong việc đông máu, tuy nhiên một vài báo cáo cho biết tiểu cầu còn có chức năng thực bào tiêu diệt tác nhân gây bệnh ở một số loài cá xương (Stosik *et al.*, 2002).

3.1.7 Hoạt tính lysozyme

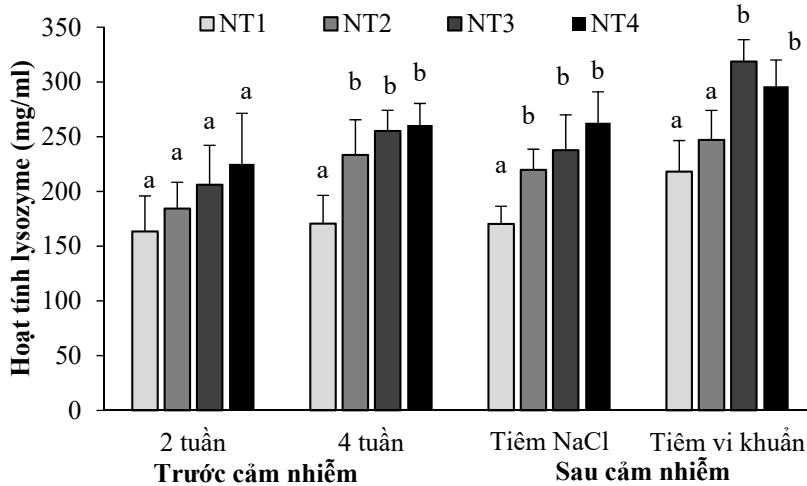
Sau 2 tuần bổ sung *B. subtilis* và FOS, hoạt tính lysozyme trong huyết thanh của cá ở các nghiệm thức có bổ sung *B. subtilis* và FOS đều tăng so với

nghiệm thức đối chứng, nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Tuy nhiên, sau 4 tuần bổ sung *B. subtilis* và FOS, hoạt tính lysozyme ở các nghiệm thức NT2, NT3, NT4 ($233,3$; $255,4$ và $260,7$ mg/mL) tăng đáng kể và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng ($170,2$ mg/mL) (Hình 5). Sau cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*, hoạt tính lysozyme của cá ở các nghiệm thức tiêm vi khuẩn tăng cao hơn so với cá ở các nghiệm thức tiêm nước muối. Nghiệm thức NT3, NT4 tiêm vi khuẩn có hoạt tính lysozyme ($318,7$ và 296 mg/mL) cao hơn và có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($218,2$ mg/mL) ($p < 0,05$).

Lysozyme là một protein có vai trò quan trọng trong hệ miễn dịch. Protein này có khả năng phá vỡ vách tế bào vi khuẩn và được tìm thấy trong dịch nhầy, máu và các cơ quan có chứa tế bào bạch cầu của cá (Lie *et al.*, 1989). Hoạt tính lysozyme của cá được bổ sung chế phẩm vi sinh tăng cao cũng đã được mô tả trong nhiều thí nghiệm trước đây (Aly *et al.*, 2008; Marzouk *et al.*, 2008; Akrami *et al.*, 2013). Guilherme *et al.* (2014) bổ sung *B. subtilis* vào thức ăn cho cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) nuôi ở nhiều mật độ khác nhau. Kết quả cho thấy hoạt tính lysozyme tăng cao ở những cá nuôi ở mật độ cao có bổ sung *B. subtilis*, trong khi những cá sử dụng thức ăn đối chứng, sống ở mật độ cao lại cho hoạt tính lysozyme thấp nhất. Maryam and Masood (2014) cho biết cá hồi sử dụng thức ăn bổ sung *B.*

subtilis trong 30 ngày cũng gia tăng hoạt tính lysozyme, mật độ bạch cầu, albumin của huyết thanh và tổng kháng thể so với cá ở nghiệm thức đối chứng. Ngoài ra, bổ sung FOS và *Bacillus licheniformis* cho cá *Megalobrama terminalis* cũng làm tế bào bạch cầu, hoạt tính lysozyme và hoạt tính

bỏ thể tăng cao (Zhang *et al.*, 2014). Sự gia tăng của hoạt tính lysozyme ở cá được bổ sung vi khuẩn có lợi là do các vi khuẩn này kích thích tế bào bạch cầu tăng cao bởi lysozyme trong huyết thanh của cá được giải phóng từ các tế bào bạch cầu (Lie *et al.*, 1989).



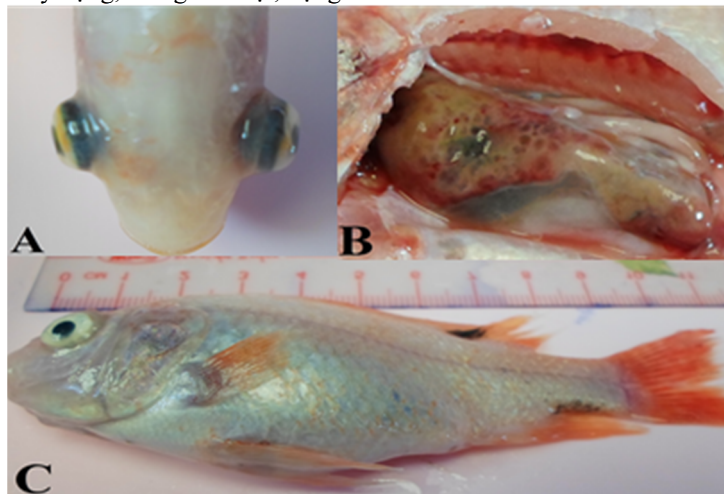
Hình 5: Hoạt tính lysozyme ở cá điều hồng được bổ sung *B. subtilis* và FOS.

Ghi chú: Các giá trị có ký tự giống nhau (a, b, c) thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê trong cùng đợt thu mẫu ($p > 0,05$).

3.2 Ảnh hưởng của bổ sung FOS và vi khuẩn *B. subtilis* đến khả năng kháng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* trên cá điều hồng

Cá sau khi tiêm, vi khuẩn bơi lơ lờ, mất phương hướng, mắt lờ và đục, trên thân có những đốm xuất huyết ở vây ngực và vây bụng, mang tái nhạt, bụng

trương to, xoang bụng có chứa dịch màu vàng, nội tạng bị xuất huyết và hoại tử. Các dấu hiệu nêu trên giống với kết quả đã được ghi nhận trên cá điều hồng (*Oreochromis sp.*) nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* (Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012) (Hình 6).



Hình 6: Dấu hiệu bệnh lý của cá. A. Mắt lờ; B. Gan xuất huyết và hoại tử; C. Bụng trương to

Sau 14 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*, nghiệm thức đối chứng (NT1) và nghiệm thức bổ sung vi khuẩn *B. subtilis* đơn (NT2) bắt đầu có cá chết vào ngày thứ 2 và tỉ lệ chết tăng

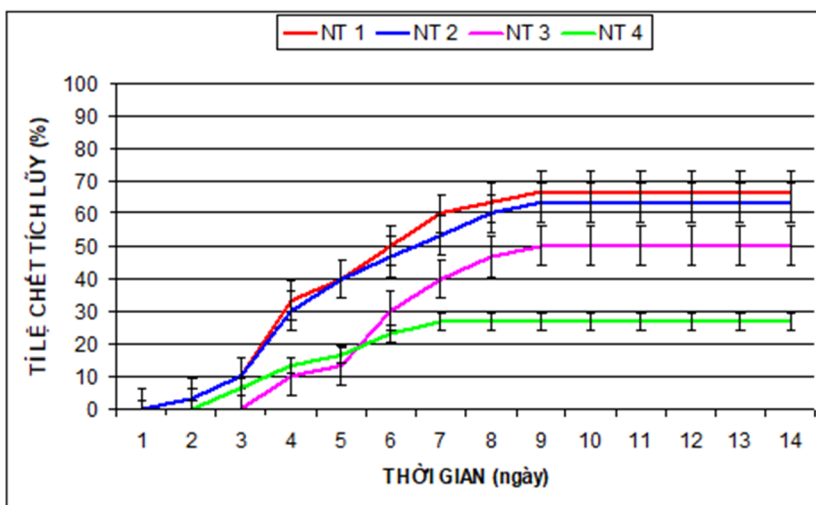
nhanh từ ngày thứ 4 đến ngày thứ 7. Nghiệm thức NT1 có tỉ lệ chết tích lũy cao nhất 67%, nghiệm thức NT2 có tỉ lệ chết 60%. Trong khi đó, nghiệm thức NT3 chỉ xuất hiện cá chết ở ngày thứ 4, sau đó tỉ lệ chết tăng nhanh ở ngày thứ 6 và thứ 7 và kết thúc

vào ngày thứ 10, tỉ lệ chết tích lũy là 46,7%. Ở nghiệm thức NT4, cá bắt đầu chết vào ngày thứ 3 và kết thúc vào ngày thứ 8 sau cảm nhiễm. Tỉ lệ chết tích lũy ở nghiệm thức này là 26,7%, thấp nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ($p < 0,05$). Các nghiệm thức đối chứng tiêm nước muối sinh lý không xuất hiện cá chết (Hình 7).

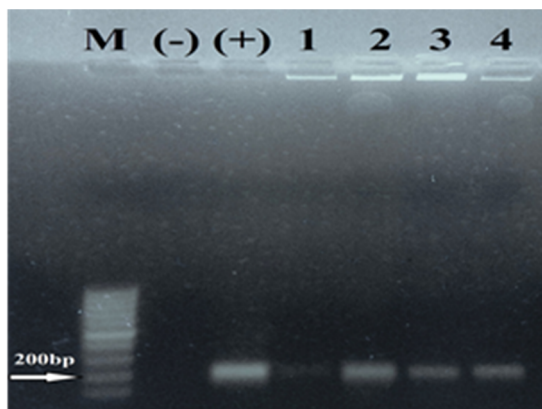
Kết quả thí nghiệm cũng tương đồng với kết quả được mô tả bởi Zhang *et al.* (2014) khi bổ sung FOS và *B. licheniformis* cho cá *Megalobrama terminalis* và cảm nhiễm với vi khuẩn *Aeromonas hydrophila*. Tỉ lệ sống của cá ở nghiệm thức bổ sung FOS và *B. licheniformis* cao hơn so với cá ở nghiệm thức đối chứng, trong đó tỉ lệ sống của cá đạt cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 0,3% FOS và 10^7 B.

licheniformis. Faramazi *et al.* (2011) cũng cho biết bổ sung *Lactobacillus acidophilus* vào thức ăn cá hồi (*Oncorhynchus mykiss*) làm nâng cao sức đề kháng của cá và tăng tỉ lệ sống của cá khi cảm nhiễm với vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*. Một báo cáo trước đây cho biết vi khuẩn *Bacillus* hạn chế phát triển các loài vi khuẩn khác thông qua việc cạnh tranh thức ăn và môi trường sống, đồng thời chúng cũng có thể tiêu diệt các loài vi khuẩn khác do chúng có thể tạo ra độc tố (Aly *et al.*, 2008).

Kết quả tái định danh vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* cho thấy sản phẩm PCR của 4 mẫu cảm nhiễm vi khuẩn cùng với đối chứng dương đều xuất hiện vạch ở vị trí 220 bp đặc hiệu của vi khuẩn *S. agalactiae* (Hình 8).



Hình 7: Tỉ lệ chết tích lũy của cá sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*



Hình 8: Kết quả điện di sản phẩm PCR

(Giếng M: thang đo ADN 1 kb plus (Invitrogen); Giếng (-): đối chứng âm; Giếng (+): đối chứng dương; Giếng 1: NT1; Giếng 2: NT2; Giếng 3: NT3; Giếng 4: NT4)

4 KẾT LUẬN

Bổ sung *B. subtilis* 10^7 CFU/g đơn hay kết hợp với FOS đều kích thích gia tăng sự đáp ứng miễn

dịch của cá điều hồng thông qua việc gia tăng mật độ tổng hồng cầu, tổng bạch cầu, tế bào lympho, bạch cầu trung tính, bạch cầu đơn nhân, tiểu cầu, hoạt tính lysozyme và bổ thể. Cá sử dụng thức ăn có bổ sung *B. subtilis* và FOS trong 4 tuần cho kết quả đáp ứng miễn dịch tốt hơn ở cá được bổ sung trong 2 tuần. Bổ sung *B. subtilis* 10^7 CFU/g và 0,5% FOS vào thức ăn kích thích các chỉ tiêu miễn dịch tốt nhất và làm tăng khả năng kháng khuẩn (*Streptococcus agalactiae*) của cá điều hồng cao nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ai, Q., Xu, H., Mai, K., Xu, W. and Wang, J., 2011. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *Aquaculture*. 317: 155–161.
- Akhter, N., Wu, B., Memon, A. M. and Mohsin, M., 2015. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish & Shellfish Immunology*. 45(2):733-741.

- Akrami, R., Iri Y., Rostami H.K. and M.R. Mansour, 2013. Effect of dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) on growth performance, survival, lactobacillus bacterial population and hematoimmunological parameters of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) juvenile. *Fish & Shellfish Immunology*. 35: 1235–1239.
- Aly, S.M., Ahmed, Y.A.G., Ghareeb, A.A.A. and Mohamed, M.F., 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology*. 25: 128-136.
- Ayyaru, G. and Arul, V., 2011. Inhibitory activity of probiotic *Enterococcus faecium* MC13 against *Aeromonas hydrophila* confers protection against hemorrhagic septicemia in common carp *Cyprinus carpio*. *Aquacult Int*. 19:973–985.
- Buentello, A.J., W.H. Neill, and D.M. Gatlin, III. 2010. Effects of dietary prebiotics on growth, feed efficiency and non-specific immunity of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus* fed soybean-based diets. *Aquaculture Research*. 41:411–418.
- Capkin, E. and Altinok I., 2009. Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/ treatment of yersiniosis disease. *J. Applied Microbiol*. 106: 1147– 1153.
- Cerezuela, R., Guardiola, F.A., Gonzalez, P., Meseguer, J. and Esteban, A., 2012. Effects of dietary *Bacillus subtilis*, *Tetraselmis chuii*, and *Phaeodactylum tricornerutum*, singularly or in combination, on the immune response and disease resistance of sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*. 33: 342-349.
- Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012. Phân lập và xác định đặc điểm của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* từ cá điêu hồng (*Oreochromis* sp.) bệnh phù mắt và xuất huyết. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 22c: 203-212.
- Ellis, A.E., 1990. Lysozyme Assays: In *Stolen Aal; SOS*. Tech. *Fish Immunology*, 101-103.
- Faramazi, M.S., Lashkarbolooki M. and Iranshahi F., 2011. The investigation of *Lactobacillus acidophilus* as probiotics on growth performance and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *American-Eurasian Journal of Scientific Research*. 6(1):32-38.
- Guerreiro, I., Amalia, P., Benjamin, C. and Aires, O.T., 2014. Effect of temperature and short chain fructooligosaccharides supplementation on the hepatic oxidative status and immune response of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish & Shellfish Immunology*. 40: 570-576.
- Guilherme, S.T., Ranzani-Paiva, M.J., Dias, D.C., Sussel, F.R., Ishikawa, C.M. and Tachibana, L., 2014. Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. *Fish & Shellfish Immunology*. 39(2):305-311.
- Hoseinifar, SH, Mirvaghefi, A, Merrifield, DL, Mojazi, A.B., Yelghi, S. and Darvish, B.K., 2011. The study of some haematological and serum biochemical parameters of juvenile beluga (*Huso huso*) fed oligofructose. *Fish Physiology and Biochemistry*. 37:91-6.
- Hrubec, T.C., J. L. Cardinale and S. A. Smith, 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Vet Clin Pathol*. 29:7-12.
- Jatoba, A., Vieira, F.N. and Buglione, N.C.C., 2011. Diet supplemented with probiotic for Nile tilapia in polyculture system with marine shrimp. *Fish Physiol. Biochem*. 37, 725-732.
- Khattab, YAE, Shalaby, AME, Sharof, S.M., El-Marakby, H.I. and Rizkalla, E.H., 2004. The physiological changes and growth performance of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after feeding with Biogen as growth promoter. *Egypt J. Aquat. Bio. and Fish*. 8: 145-158.
- Lalumera, G.M., Calamari, D., Galli, P., Castgiloni, S., Crosa, G. and Fanelli, R., 2004. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere*. 54:661–668.
- Lie O., Evensen O., Sorensen A. and Froysadal E., 1989. Study of lysozyme activity in some fish species. *Dis Aquat Org*. 6:1-5.
- Mahious, A.S., Gatesoupe F.J., Hervi M., Metailler R. and Ollevier F., 2006. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). *Aquacult. Int*. 14: 219–229.
- Maita M., 2007. Fish health assessment. In: Nakagawa H., Sato M., Gatlin III D.M. (Eds.). *Dietary supplements for the health and quality of cultured fish*. CAB International. Oxon, UK, pp 10–34.
- Maryam, K., and Masood, G., 2014. Studies on *Bacillus subtilis*, as potential probiotics, on the hematological and biochemical parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Applied & Environmental Microbiology*. 2(5): 203-207.
- Marzouk, M.S., Moustafa, M.M., and Mohamed, M.M., 2008. Evaluation of immunomodulatory effects of some probiotics on cultured *Oreochromis niloticus*. 8th International symposium on Tilapia in Aquaculture 2008, 1043-1058.
- Mohapatra, S., Chakraborty, T., Prusty, A.K., Das, P., Paniprasad, K. and Mohanta, K.N. 2012. Use of different microbial probiotics in the diet of rohu, *Labeo rohita* fingerlings: effects on growth, nutrient digestibility and retention,

- digestive enzyme activities and intestinal microflora. *Aquaculture Nutrition*. 18: 1–11.
- Moheb, A.P., Hossein, K., Reza, S., Mohammad, A.Y.S., Mohammad, S.A., 2015. Influence of *Lactobacillus plantarum* Inclusion in the Diet of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) on performance and hematological parameters. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, DOI: 10.4194/1303-2712-v17_1_01.
- 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.
- Nayak, S.K., 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish and Shellfish immunology*. 29: 2-14.
- Pereira, I.G.V., Gabriel, F.A.J., Felipe, N.V., *et al.*, 2016. Probiotic supplementation in diet and vaccination of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* ♀ x *P. corruscans* ♂). *Ciência Rural, Santa Maria*. 46 (2), 348-353.
- Razeghi-Mansour M., Akrami R., Ghobadi S.H., Amani-Denji K., Ezatrahimi N., Gharaei A., 2012. Effect of dietary mannan oligosaccharide (MOS) on growth performance, survival, body composition, and some hematological parameters in giant sturgeon juvenile (*Huso huso* Linnaeus, 1754). *J. Fish Physiol Biochem*. 38: 829–835.
- Ringo, E., Olsen, R.E., Gifstad, T.O., Dalmo, R.A., Amlund, H., Hemre, G.I. and Bakke, A.M. 2010. Prebiotics in aquaculture: A review. *Aquaculture Nutrition*. 16: 117-136.
- Shah, S.Q., Colquhoun, D.J., Nikuli, H.L., Sorum, H., 2012. Prevalence of antibiotic resistance genes in the bacterial flora of integrated fish farming environments of Pakistan and Tanzania. *Environ. Sci. Technol.* Epub ahead of print.
- Soleimani, N., Hoseinifar, S.H., Merrifield, D.L., Barati, M. and HassanAbadi, Z., 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 & Shellfish Immunology*. 32: 316–321.
- Standen, B.T., Rawling, M.D., Davies, S.J., Castex, M., Foey, A., Gioacchini, G., Carnevali, O., Merrifield, D.L., 2013. Probiotic *Pediococcus acidilactici* modulates both localised intestinal and peripheral-immunity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*. 35: 1097-1104.
- Stosik M., Deptula W., Travnicek M., Baldy-chudzik K., 2002. Phagocytic and bactericidal activity of blood thrombocytes in carps (*Cyprinus carpio*). *Vet. Med.-Czech*. 1: 21-25.
- Trần Thị Tuyết Hoa, Dương Thành Long và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2014. Phát triển quy trình PCR phát hiện vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* trực tiếp từ mô cá điêu hồng. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 35b: 121-127.
- Vojgani, M., 2001. *Immunology*. Jahad Daneshgahi Publication. Iran, Tehran. 4:196.
- Wang, Y.B., Tim, Z.Q., Yao, J.T. and Li, W.F., 2008. Effects of probiotics *Enterococcus faecium* on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture*. 277: 203–207.
- Zhang, C.N., Li X.F., Jiang G.Z., *et al.*, 2014. Effects of dietary fructooligosaccharide levels and feeding modes on growth, immune responses, antioxidant capability and disease resistance of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Fish & Shellfish Immunology*. 41: 560–569.