

## ẢNH HƯỞNG CỦA TỶ LỆ THAY THẾ BỘT CÁ BẰNG BỘT ẤU TRÙNG RUỒI LÍNH ĐEN (*Hermetia illucens*) TRONG THÀNH PHẦN THỨC ĂN ĐẾN MỘT SỐ CHỈ TIÊU MIỄN DỊCH CỦA ÉCH THÁI LAN (*Rana rugosa*)

Trương Thị Hoa\*, Hoàng Nghĩa Mạnh, Trần Thị Thu Suong, Võ Đức Nghĩa, Lê Minh Tuệ, Phạm Thị Phương Lan, Nguyễn Thị Thanh Thủy, Lê Đức Ngoan, Nguyễn Duy Quỳnh Trâm

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

\*Tác giả liên hệ: truongthihoa@huaf.edu.vn

Nhận bài: 16/10/2023 Hoàn thành phản biện: 29/11/2023 Chấp nhận bài: 30/11/2023

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này đánh giá ảnh hưởng của việc thay thế bột cá bằng bột ấu trùng ruồi lính đen trong khẩu phần đến một số chỉ tiêu miễn dịch của ếch Thái Lan. Khẩu phần thí nghiệm được xây dựng trong đó bột cá được thay thế một phần bột ấu trùng ruồi lính đen từ 10% (NT 10), 20% (NT 20), 30% (NT 30) và 40% (NT 40). Tổng số 3.600 con ếch được thả ngẫu nhiên vào 15 lồng lưới kín (thể tích 9 m<sup>3</sup>/lồng), tương đương 240 con/lồng. Máu ếch được thu mẫu ở ngày thứ 1, 30 và 60 ngày thí nghiệm để xác định số lượng hồng cầu, tổng bạch cầu và hoạt tính lysozyme trong huyết thanh. Sau 60 ngày thí nghiệm, số lượng hồng cầu trong máu ếch Thái Lan biến động từ 1,1 x 10<sup>6</sup> tế bào/mm<sup>3</sup> đến 1,37 x 10<sup>6</sup> tế bào/mm<sup>3</sup> trong đó cao nhất ở NT 20 (1,37 x 10<sup>6</sup> tb/mm<sup>3</sup>). Số lượng tổng bạch cầu trong máu ếch Thái Lan ở các nghiệm thức từ 3,4 x 10<sup>4</sup> tế bào/mm<sup>3</sup> đến 3,62 x 10<sup>4</sup> tế bào/mm<sup>3</sup>. Sau 60 ngày thí nghiệm, số lượng tổng bạch cầu trong máu ếch Thái Lan ở nghiệm thức NT 0 và NT 10 lần lượt là 3,6 x 10<sup>4</sup> tb/mm<sup>3</sup> và 3,62 x 10<sup>4</sup> tb/mm<sup>3</sup>, cao hơn có ý nghĩa thống kê (p<0,05) so với các nghiệm thức thay thế bột cá bằng bột ấu trùng ruồi lính đen với tỷ lệ 20%; 30% và 40%. Hoạt tính lysozyme trong huyết thanh dao động từ 364 đến 594 U/phút/mg. Kết quả nghiên cứu ghi nhận việc thay thế bột cá bằng bột ấu trùng ruồi lính đen trong khẩu phần ăn của ếch không ảnh hưởng đến các thông số miễn dịch tự nhiên của ếch Thái Lan.

**Từ khóa:** Éch Thái Lan, Bạch cầu, Hồng cầu, Lysozyme, Ruồi lính đen

## EFFECTS OF THE SUBSTITUTING PROPORTION OF FISH MEAL WITH BLACK SOLDIER FLY (*Hermetia illucens*) LARVAE MEAL ON THE IMMUNE PARAMETERS OF THAI BULLFROGS (*Rana rugosa*)

Trương Thị Hoa\*, Hoàng Nghĩa Mạnh, Trần Thị Thu Suong, Võ Đức Nghĩa, Lê Minh Tuệ, Phạm Thị Phương Lan, Nguyễn Thị Thanh Thủy, Lê Đức Ngoan, Nguyễn Duy Quỳnh Trâm

University of Agriculture and Forestry, Hue University

### ABSTRACT

This study assesses the effects of replacing fishmeal with black soldier fly larvae in the diet on some immune parameters of Thai frogs (*Rana rugosa*). Experimental diets were formulated in which fishmeal was partially replaced by black soldier fly larvae at 0% (NT0), 10% (NT 10), 20% (NT 20), 30% (NT 30), and 40% (NT 40). A total of 3,600 frogs were randomly placed in 15 enclosed mesh cages (9 m<sup>3</sup>/cage), equivalent to 240 frogs/cage. Frog blood samples were collected on days 1, 30, and 60 of the experiment to determine erythrocyte count, total leukocyte count, and lysozyme activity in the serum. After 60 days of the experiment, the erythrocyte count in Thai frogs ranged from 1.1 x 10<sup>6</sup> cells/mm<sup>3</sup> to 1.37 x 10<sup>6</sup> cells/mm<sup>3</sup>, with the highest count observed in NT 20 (1.37 x 10<sup>6</sup> cells/mm<sup>3</sup>). The total leukocyte count in Thai frogs across treatments ranged from 3.4 x 10<sup>4</sup> cells/mm<sup>3</sup> to 3.62 x 10<sup>4</sup> cells/mm<sup>3</sup>. Furthermore, after 60 days, the total leukocyte count in the blood of Thai bullfrogs in the NT 0 and NT 10 treatments were 3.6 x 10<sup>4</sup> cells/mm<sup>3</sup> and 3.62 x 10<sup>4</sup> cells/mm<sup>3</sup>, respectively, significantly higher (p<0.05) than the substitute treatments replacing fish meal with black soldier fly larvae meal at rates of 20%, 30%, and 40%. Serum lysozyme activity varied from 364 to 594 U/min/mg. In conclusion, the findings of the study indicate that substituting fishmeal with black soldier fly larvae in the frog diet has no effects on the natural immune parameters of Thai frogs.

**Keywords:** Erythrocyte, Leukocyte, Black soldier, Lysozyme, Thai frogs

## 1. MỞ ĐẦU

Ếch Thái Lan (*Rana rugosa*) là đối tượng đang được quan tâm phát triển nuôi do chất lượng thịt thơm ngon (Casali và cs., 2005). Thức ăn cho ếch Thái Lan cần có hàm lượng protein cao và ếch có thể sử dụng thức ăn viên (Lê Văn Bình và Ngô Thị Thu Thảo, 2016). Tuy nhiên thức ăn viên có tỷ lệ phối trộn bột cá (fishmeal - FM) cao nên giá thành thức ăn cao, hơn nữa nguồn cá khai thác không ổn định (Olsen và Hasan, 2012). Theo Cammack và Tomberlin (2017), nghề nuôi trồng thủy sản cần tìm kiếm thêm nguồn thức ăn giàu protein để thay thế bột cá. Do vậy, để phát triển nuôi thâm canh ếch Thái Lan cần có nguồn nguyên liệu sản xuất thức ăn công nghiệp và cần tìm các nguồn protein thay thế protein bột cá trong khẩu phần ăn.

Ấu trùng ruồi lính đen (black soldier fly larvae - BSFL) có hàm lượng protein trung bình 55% (vật chất khô) với đầy đủ axit amin thiết yếu; chất béo trung bình là 35% (vật chất khô) và có thể giảm xuống còn 5% đến 9% bằng quy trình khử chất béo (Bußler và cs., 2016). Ngoài ra, ấu trùng còn cung cấp nguồn khoáng chất như kali, canxi, sắt, magiê, selen và một số vitamin (Henry và cs., 2015). Ấu trùng ruồi lính đen được coi là nguồn nguyên liệu thay thế quan trọng làm thức ăn chăn nuôi (Lê Đức Ngoan và cs., 2021). Hiện nay, ấu trùng ruồi lính đen đã được nghiên cứu sử dụng để thay thế bột cá trong khẩu phần ăn cho một số loài động vật thủy sản và cho kết quả tăng trưởng tốt, hệ số chuyển đổi thức ăn thấp như ở ếch Thái Lan (Nghia và cs. 2023), cá chêm châu Âu (Seabass - *Dicentrarchus labrax*) (Zarantoniello và cs., 2023) và cá chêm Châu Á (Barramundi - *Lates calcarifer*) (Hender và cs., 2021; Lan và cs. 2022), cá chình Nhật Bản (Japanese eel - *Anguilla japonica*) (Kuo và cs., 2022) và cá da trơn (African catfish - *Clarias gariepinus*) (Mundida và cs., 2023). Ngoài ra, nghiên cứu ảnh hưởng của việc sử dụng

bột ấu trùng ruồi lính đen làm thức ăn đến các chỉ tiêu miễn dịch của cá chêm châu Âu (Seabass - *Dicentrarchus labrax*), cá chêm Châu Á (Barramundi - *Lates calcarifer*) cho thấy không có sự sai khác về các chỉ tiêu miễn dịch đặc hiệu của cá khi thay thế bột cá bằng bột ấu trùng ruồi lính đen (Hender và cs., 2021; Zarantoniello và cs., 2023). Trong các chỉ tiêu miễn dịch không đặc hiệu, một số đặc điểm huyết học và lysozyme là các chỉ số quan trọng để đánh giá tình trạng sức khỏe của động vật (Xiong và cs., 2018; Ballester và cs., 2020).

Tế bào máu ếch Thái Lan thường rất nhạy cảm với những thay đổi sinh lý bên trong của động vật, các kích thích từ môi trường bên ngoài, và số lượng các loại tế bào máu khác nhau có thể phản ánh tình trạng sức khỏe của động vật thủy sản (Chen và cs., 2022). Cấu trúc hồng cầu của ếch Thái Lan được đặc trưng bởi kích thước khá lớn, có đường kính lên đến 23  $\mu\text{m}$  và chúng đảm nhận vai trò vận chuyển chất dinh dưỡng và hô hấp của ếch (Chen và cs., 2022). Có nhiều loại tế bào tham gia vào đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu, tuy nhiên giữ vai trò quan trọng nhất là tế bào bạch cầu tham gia vào thực bào, chúng có khả năng nuốt và tiêu hóa các vi sinh vật (Przybylska và Nielsen, 2012). Lysozyme là enzyme phân bố rộng trong cơ thể và có nhiều trong huyết thanh (Crosbie, 2001). Hoạt tính diệt khuẩn của lysozyme có liên quan đến việc phá hủy cấu trúc peptidoglycan của vách tế bào vi khuẩn, gây dung giải tế bào. Mặt khác, enzyme này cũng đóng vai trò là opsonin làm hoạt hóa hệ thống bổ thể và các tế bào thực bào. Trên ếch *Rana pipiens*, lysozyme được tìm thấy trong mô gan, thận, lách, buồng trứng và huyết thanh trong đó trên buồng trứng chứa lượng lysozyme cao nhất và lysozyme có khả năng tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh. Lysozyme cũng được tìm thấy trong da của ếch *Rana pipiens*. Lysozyme tiêu diệt vi khuẩn bằng cách thủy phân liên kết  $\beta$ -1,4-

glycosid giữa N-acetylglucosamine và axit N-acetylmuramic của lớp peptidoglycan trong thành tế bào vi khuẩn (Zhao và cs. 2016)

Theo Henry và cs. (2020), khi sử dụng nguyên liệu mới thay thế bột cá trong khẩu phần ăn của động vật thủy sản cần có những nghiên cứu đánh giá các chỉ tiêu miễn dịch. Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có các nghiên cứu về ảnh hưởng của việc sử dụng bột ấu trùng ruồi lính đen thay thế bột cá trong khẩu phần ăn đến một số chỉ tiêu miễn dịch của ếch Thái Lan. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định ảnh hưởng của việc thay thế bột cá bằng bột ấu trùng ruồi lính đen trong khẩu phần ăn đến số lượng tế bào hồng cầu, tổng bạch cầu và hoạt tính lysozyme trong huyết thanh của ếch Thái Lan.

## 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Éch giống thí nghiệm

Ếch Thái Lan giống (3.600 con có khối lượng trung bình 21 g/con) được mua từ cơ sở giống trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế. Con giống khoẻ mạnh, không xây xát, được nuôi trong lồng lưới kín (thể tích 9 m<sup>3</sup>/lồng), trong 5 đến 7 ngày cho thích nghi với điều kiện nuôi thí nghiệm.

### 2.2. Giai thí nghiệm

Giai thí nghiệm có thể tích 9 m<sup>3</sup> (3x2x1,5 m), số lượng 15 giai. Giai được làm bằng lưới cước (kích thước mắt lưới 2a = 2mm), được cắm trong ao nuôi thủy sản (ao có diện tích 5000 m<sup>2</sup>) tại Hương Trà, Thừa Thiên Huế. Mức nước trong giai luôn duy trì từ 30 – 50 cm, khoảng cách cắm giữa các giai là 30 cm.

### 2.3. Nguyên liệu phối trộn thức ăn và khẩu phần thức ăn

Nguyên liệu phối trộn thức ăn bao gồm: bột cá, bột BSFL, bột ngô, bột khô đậu nành, bột mì, dầu cá, vitamin, khoáng và các chất kết dính. Bột cá, bột bắp, khô đậu nành, dầu đậu nành, dầu cá, vitamin, khoáng và các chất kết dính được cung cấp từ các chợ trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế. Nguồn trứng ruồi lính đen được mua từ Hợp tác xã Công nghệ cao Hưng Điền (Củ Chi – Hồ Chí Minh). Sau khi trứng nở, ấu trùng được cho ăn hỗn hợp cám gà đẻ (CP524) ở nhiệt độ 30°C và độ ẩm 70% cho đến khi ấu trùng được 5 ngày tuổi mới sử dụng. Việc xử lý và sơ chế ấu trùng sau thu hoạch được thực hiện theo Kroeckel và cs. (2012). Thành phần hóa học của bột ấu trùng ruồi lính đen và các nguyên liệu làm thức ăn thể hiện ở Bảng 1.

**Bảng 1.** Thành phần hóa học của nguyên liệu làm thức ăn cho ếch Thái Lan

| Thành phần hóa học (% vật chất khô) | Nguyên liệu thức ăn |          |         |         |        |                  |
|-------------------------------------|---------------------|----------|---------|---------|--------|------------------|
|                                     | Bột cá              | Bột BSFL | Cám gạo | Bột ngô | Bột mì | Bột khô đậu nành |
| Vật chất khô                        | 90,5                | 87,9     | 87,1    | 88,4    | 87,6   | 88,8             |
| Chất hữu cơ                         | 85,7                | 90,8     | 91,6    | 98,3    | 99,5   | 90,6             |
| Protein                             | 56,4                | 58,7     | 13,7    | 9,75    | 13,5   | 52,7             |
| Lipid                               | 8,25                | 18,8     | 15,4    | 4,75    | 1,27   | 1,19             |
| Xơ                                  | 6,05                | 10,8     | 4,9     | 3,04    | 0,97   | 4,63             |
| Khoáng                              | 14,3                | 9,20     | 8,4     | 1,70    | 0,50   | 9,40             |
| Năng lượng (kcal/kg)                | 4.822               | 5.672    | 4843,5  | 4.480   | 4.395  | 4.587            |

Căn cứ xây dựng khẩu phần thức ăn cho ếch thí nghiệm và công thức xây dựng khẩu phần thức ăn đối chứng theo Lê Văn Bình và Ngô Thị Thu Thảo, (2016). Sử dụng phần mềm Excel - Solver để thiết lập khẩu phần ăn với tỷ lệ thay thế bột cá bằng bột BSFL ở các mức khác nhau (0, 10, 20, 30 và 40%). Chuẩn bị khẩu phần: Tất cả các nguyên liệu và các bước phối trộn nguyên liệu của khẩu phần được chuẩn bị theo hướng dẫn của Ngô Hữu Toàn và Mạc Như

Bình (2021). Các nguyên liệu được trộn theo tỷ lệ trong khẩu phần (Bảng 2). Sau đó, hỗn hợp được đùn qua tấm khuôn có đường kính 3 mm bằng máy đùn (MDV-01, Bình Minh, Việt Nam). Thức ăn được sấy khô ở 45°C trong 24 giờ và bảo quản trong túi plastic ở nhiệt độ phòng để sử dụng dần trong thời gian thí nghiệm. Thành phần hóa học của thức ăn trong các khẩu phần được trình bày trong Bảng 1.

**Bảng 2.** Nguyên liệu và tỷ lệ phối trộn nguyên liệu trong các khẩu phần

| Nguyên liệu  | Tỷ lệ phối trộn nguyên liệu trong các khẩu phần (% VCK) |        |        |        |        |
|--|---|--------|--------|--------|--------|
|  | NT 0  | NT 10  | NT 20  | NT 30  | NT 40  |
| Bột cá   | 14  | 12,6   | 11,2   | 9,8    | 8,4    |
| Bột mì   | 15,1  | 15,1   | 15,2   | 15,2   | 15,2   |
| Cám gạo  | 25  | 25     | 24     | 24     | 24     |
| Bột ngô  | 24,9  | 24,4   | 24,8   | 24,4   | 23,9   |
| Khô đậu nành   | 13  | 13     | 13     | 13     | 13     |
| Dầu cá   | 1   | 1      | 1      | 1      | 1      |
| Khoáng và vitamin (*)  | 4   | 4      | 4      | 4      | 4      |
| Chất kết dính (CMC)  | 3   | 3      | 3      | 3      | 3      |
| Bột ấu trùng ruồi lính đen   | 0   | 1,9    | 3,8    | 5,6    | 7,5    |
| Tổng   | 100   | 100    | 100    | 100    | 100    |
| <i>Thành phần hóa học các khẩu phần (% vật chất khô) (***) và năng lượng (kcal/kg)</i> |   |        |        |        |        |
| Vật chất khô   | 95,1  | 94,7   | 94,2   | 95,6   | 93,6   |
| Chất hữu cơ  | 90,5  | 90,5   | 90,6   | 90,6   | 90,5   |
| Protein  | 32,5  | 32,3   | 32,6   | 32,5   | 32,8   |
| Lipid  | 7,5   | 7,7    | 7,9    | 8,1    | 8,2    |
| Xơ   | 3,6   | 3,7    | 3,8    | 3,9    | 4,0    |
| Khoáng   | 9,5   | 9,5    | 9,4    | 9,4    | 9,5    |
| Năng lượng (kcal/kg)   | 4632,5  | 4640,7 | 4660,8 | 4670,5 | 4676,2 |

(\*) Thành phần khoáng và vitamin trong 1kg gồm: Vitamin A (6.000.000 IU), D3(1.000.000 IU), E (2.000 IU), K3 (1.000 mg), B1 (2.000 mg), B2 (3.000 mg), B6 (500mg), B12 (1.000 mcg), Niacin Amide (6.000 mg), Na (2.520 mg), Ca-Pantothenate (5.000 mg), DL-Methionine (16.000 mg), Co (220 mg), Mn (140 mg), Fe (2.140 mg), K (3.740 mg), Zn (130 mg), L-Lysine (5.000 mg),

Folic Acid (400 mg);

(\*\*) Kết quả phân tích tại phòng thí nghiệm Phân tích thức ăn và Sản phẩm Chăn nuôi thuộc Viện Chăn nuôi quốc gia, Hà Nội)

## 2.4. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp ngẫu nhiên hoàn toàn gồm 5 nghiệm thức tương ứng với 5 tỷ lệ thay thế bột cá bằng bột ấu trùng ruồi lính đen khác nhau (0, 10, 20, 30 và 40%) trong khẩu phần ăn nuôi ếch Thái Lan. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Trong đó, khẩu phần ăn không sử dụng bột ấu trùng ruồi lính đen là nghiệm thức đối chứng. Ếch giống được thả ngẫu nhiên vào các giai thí nghiệm ở mật độ 40 con/m<sup>3</sup>. Thí nghiệm được tiến hành trong 60 ngày.

Quản lý và chăm sóc: ếch được cho ăn 4 lần/ngày (7 giờ - 11 giờ - 15 giờ - 19 giờ) và cho ăn thỏa mãn nhu cầu. Toàn bộ thức ăn thừa (nếu có) sẽ được vớt ra khỏi giai sau 1 giờ 30 phút sau khi cho ăn. Thực hiện chế độ vệ sinh giai nuôi định kỳ 15 ngày/lần. Một số yếu tố môi trường trong quá trình thí nghiệm được duy trì trong khoảng thích hợp cho ếch phát triển như hàm lượng oxy hòa tan trung bình 4,2 ± 0,1 mg/L; pH dao động 7,1 – 7,5; nhiệt độ trung bình 27,5 ± 1,3°C.

Máu ếch được thu mẫu ở ngày thí nghiệm thứ 1, 30 và 60 để xác định số lượng hồng cầu, tổng bạch cầu và hoạt tính lysozyme trong huyết thanh. Mỗi lần thu mẫu ở 05 nghiệm thức và mỗi nghiệm thức thu 09 con (mỗi giai thu 03 con). Mẫu ếch sau khi thu được đóng trong túi ni lông và vận chuyển mẫu sống về phòng thí nghiệm Bệnh thủy sản, khoa Thủy sản, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế để phân tích ngay.

## 2.5. Phương pháp xác định số lượng hồng cầu

Cách lấy mẫu máu: Dùng còng 70° sát trùng trên bề mặt da ếch, dùng dùi giải phẫu huyệt tủy của ếch. Sau đó tiến hành giải phẫu và lấy máu ở tim. Máu sau khi lấy từ ếch

được sử dụng ngay để đếm hồng cầu và tổng bạch cầu. Mẫu máu được pha loãng 200 lần bằng cách dùng pipette lấy 10μL máu cho vào ống eppendorf có chứa 1990 μL dung dịch Natt và Herrick, lắc nhẹ. (Natt và Herrick, 1952). Mật độ hồng cầu được đếm trên buồng đếm tế bào hồng cầu Neubauer thông qua quan sát dưới kính hiển vi (XSZ-107T, Trung Quốc) ở vật kính 40X và được tính như sau:

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

Trong đó:

HC: Hồng cầu (tb/mm<sup>3</sup>)

C: Tổng số hồng cầu trong 5 vùng đếm

10: Khoảng giữa lam và buồng đếm là 0,1 mm

5: Diện tích mỗi vùng đếm là 0,2 mm<sup>2</sup>

200: Độ pha loãng hồng cầu

## 2.6. Phương pháp xác định số lượng tổng bạch cầu

Sau khi lấy máu, nhỏ một giọt máu (30 μL) lên lam kính, cho lamen chạm vào giọt máu, đẩy lamen ngược về phía trước. Mẫu máu sau khi khô được cố định bằng cách ngâm trong methanol 01 phút. Để mẫu khô tự nhiên và nhuộm bằng Wright và Giemsa. (Hrubec và cs., 2000). Các bước nhuộm như sau: nhuộm với dung dịch Wright trong 5 phút; ngâm trong dung dịch pH 6,2-6,8 trong 6 phút; nhuộm với dung dịch Giemsa trong 30 phút; ngâm trong dung dịch pH 6,2 trong 30 phút; rửa sạch lại bằng nước cất, để mẫu khô tự nhiên. Số lượng tổng bạch cầu trong máu được xác định theo phương pháp của Hrubec và cs. (2000), (không đếm tiểu cầu). Cách tính số lượng tổng bạch cầu như sau:

$$\text{TBC (tb/mm}^3\text{)} = \frac{\text{Số bạch cầu trong 1.500 tế bào x R}}{\text{Số hồng cầu trong 1.500 tế bào}}$$

Trong đó: TBC: mật độ tổng bạch cầu (tb/mm<sup>3</sup>).

R: mật độ hồng cầu trên buồng đếm hồng cầu (tb/mm<sup>3</sup>).

### 2.7. Phương pháp xác định hoạt tính lysozyme trong huyết thanh

Sử dụng vi khuẩn *Micrococcus luteus* (Himedia, Ấn Độ) và xác định hoạt tính lysozyme trong huyết thanh của ếch Thái Lan theo phương pháp của Ellis (1990). Xác định đường chuẩn lysozyme với các nồng độ 0, 2, 4, 8 và 16 µg/mL. 10 µL dung dịch từ các nồng độ pha loãng được cho vào đĩa 96 giếng, tiếp theo cho 200 µL/giếng dịch huyền phù vi khuẩn *Micrococcus luteus*. Đối với mẫu huyết thanh ếch Thái Lan, cho 10 µL vào đĩa 96 giếng, thêm 200 µL/giếng vi khuẩn *Micrococcus luteus*. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ 28°C và đo ở bước sóng 495 nm. Hoạt tính lysozyme được tính dựa vào đường chuẩn lysozyme.

### 2.8. Phương pháp xử lý số liệu

Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng SPSS 20, phân tích phương sai (ANOVA) và sự sai khác giữa các giá trị trung bình được xác định theo phương pháp Tukey với độ tin cậy 95%.

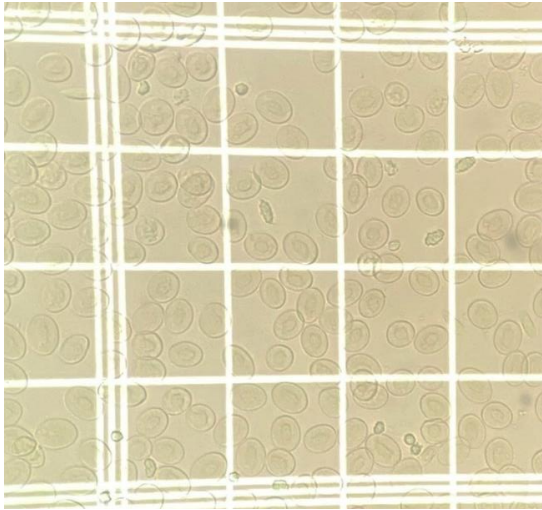
## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả xác định số lượng hồng cầu

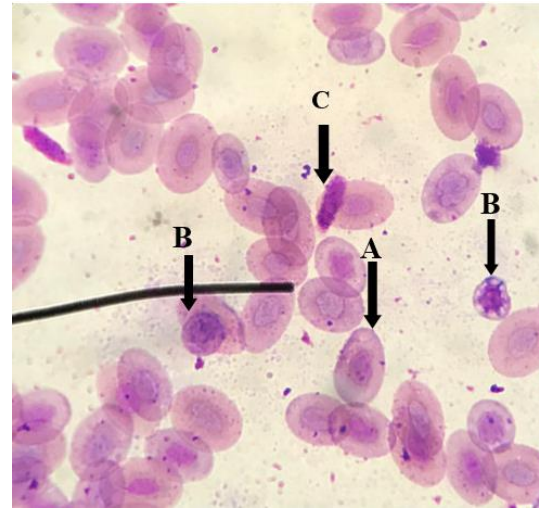
Kết quả thu mẫu, xác định số lượng hồng cầu trong máu ếch Thái Lan trên buồng đếm hồng cầu (Hình 1) cho thấy số lượng tế bào hồng cầu trong máu ếch Thái Lan giao động từ 1,1 x 10<sup>6</sup> tb/mm<sup>3</sup> đến 1,37 x 10<sup>6</sup> tb/mm<sup>3</sup>. Số lượng hồng cầu của ếch Thái Lan có xu hướng tăng dần theo thời

gian nuôi. Số lượng tế bào hồng cầu ở ngày 1 dao động từ 1,06 x 10<sup>6</sup> tb/mm<sup>3</sup> đến 1,15 x 10<sup>6</sup> tb/mm<sup>3</sup> và sai khác không có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức thí nghiệm. Đến ngày 30, số lượng tế bào hồng cầu ở nghiệm thức NT 20 (1,27 x 10<sup>6</sup> tb/mm<sup>3</sup>) cao hơn và sai khác không có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Đến 60 ngày thí nghiệm, số lượng tế bào hồng cầu ở nghiệm thức NT 20 là 1,37 x 10<sup>6</sup> tb/mm<sup>3</sup>, cao hơn và sai khác không có ý nghĩa thống kê (p>0,05) so với các nghiệm thức khác. (Hình 3). Kết quả cho thấy, việc thay thế 20% bột cá bằng bột ấu trùng ruồi lính đen trong khẩu phần ăn của ếch Thái Lan làm tăng số lượng tế bào hồng cầu so với các nghiệm thức khác. Theo Nghĩa và cs. (2023), khi thay thế 20% bột cá bằng bột BSFL giúp cho ếch tăng trưởng tốt và hệ số chuyển đổi thức ăn thấp hơn so với các khẩu phần thay thế 30% và 40% bột cá bằng bột BSFL. Ngoài ra, số lượng tế bào hồng cầu trung bình trong máu của ếch Thái Lan thu từ tự nhiên là 1,33 x 10<sup>6</sup> tb/mm<sup>3</sup> (Chen và cs., 2022). Sự tăng số lượng hồng cầu trong máu giúp cho sự vận chuyển ô xy và chất dinh dưỡng đến các cơ quan trong cơ thể của ếch tốt hơn, điều này giúp ếch tăng trưởng tốt hơn và có thể nâng cao sức khỏe của ếch Thái Lan. Nghiên cứu này cho thấy khi thay thế một phần bột cá bằng bột ấu trùng ruồi lính đen không làm giảm số lượng hồng cầu của ếch Thái Lan, điều này đảm bảo các hoạt động hô hấp của ếch Thái Lan.

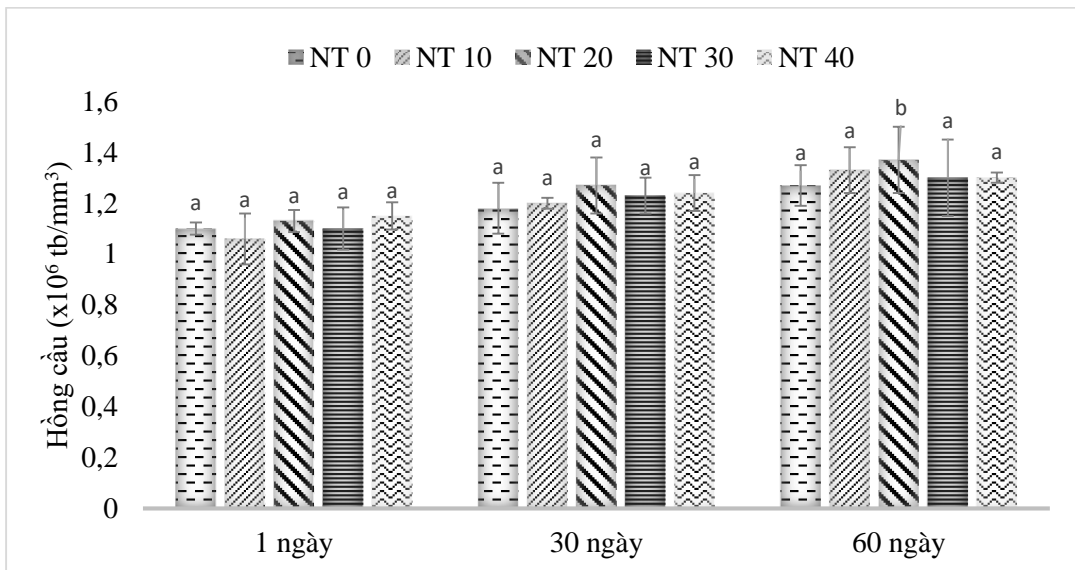




**Hình 1.** Hình ảnh tế bào hồng cầu trong máu ếch Thái Lan trên buồng đếm hồng cầu (X40)



**Hình 2.** Hình ảnh các loại tế bào máu ếch Thái Lan (nhuộm bằng dung dịch Wright và Giemsa (X100); A - hồng cầu; B - bạch cầu; C - tiểu cầu))

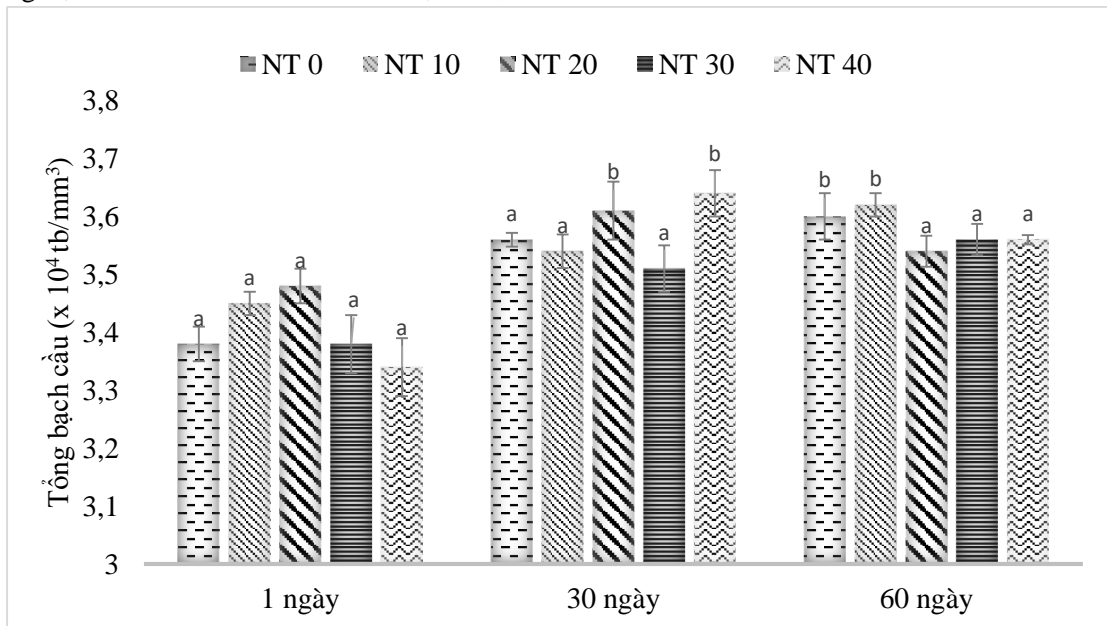


**Hình 3.** Biến động số lượng hồng cầu trong máu ếch Thái Lan ở các nghiệm thức tại thời điểm 1 ngày, 30 ngày và 60 ngày nuôi

**3.2. Kết quả xác định số lượng tổng bạch cầu**

Số lượng tổng bạch cầu trong máu ếch Thái Lan ở các nghiệm thức dao động từ  $3,34 \times 10^4$  tế bào/mm<sup>3</sup> đến  $3,62 \times 10^4$  tế bào/mm<sup>3</sup>. Trong đó, số lượng tổng bạch cầu ở ngày đầu thí nghiệm (ngày 1) dao động từ  $3,34 \times 10^4$  tế bào/mm<sup>3</sup> đến  $3,48 \times 10^4$  tế bào/mm<sup>3</sup> và sai khác không có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức thí nghiệm. Đến ngày 30, số lượng tổng bạch cầu trong máu ếch Thái Lan ở NT 0, NT 10 và NT 30 lần lượt là  $3,56 \times 10^4$  tb/mm<sup>3</sup>;  $3,54 \times 10^4$  tb/mm<sup>3</sup> và  $3,51 \times 10^4$  tb/mm<sup>3</sup> thấp hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với NT 20 ( $3,61 \times 10^4$  tb/mm<sup>3</sup>) và NT 40 ( $3,64 \times 10^4$  tb/mm<sup>3</sup>). Đến 60 ngày thí nghiệm, số lượng tổng bạch cầu trong máu ếch Thái Lan ở nghiệm thức NT 0 và NT 10 lần lượt là  $3,6$

$\times 10^4$  tb/mm<sup>3</sup> và  $3,62 \times 10^4$  tb/mm<sup>3</sup>, cao hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với các nghiệm thức còn lại (Hình 4). Kết quả nghiên cứu cho thấy sau 60 ngày thí nghiệm, số lượng tổng bạch cầu trong máu ếch ở nghiệm thức thay thế bột cá bằng bột ấu trùng ruồi lính đen với tỷ lệ 10% (NT 10) so với đối chứng (NT 0) sai khác không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Trong khi đó số lượng tổng bạch cầu ở NT 0 và NT 10 cao hơn và sai khác có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn lại ( $p < 0,05$ ). Theo Chen và cs. (2022), số lượng tổng bạch cầu trung bình trong máu của ếch Thái Lan thu từ tự nhiên là  $3,73 \times 10^4$  tb/mm<sup>3</sup> và số lượng tổng bạch cầu biến động do những thay đổi sinh lý bên trong, do các kích thích từ môi trường bên ngoài và đặc biệt là do các tác nhân gây bệnh truyền nhiễm.



**Hình 4.** Biến động số lượng tổng bạch cầu trong máu ếch Thái Lan ở các nghiệm thức tại thời điểm 1 ngày, 30 ngày và 60 ngày nuôi

**3.3. Hoạt tính lysozyme trong huyết thanh**

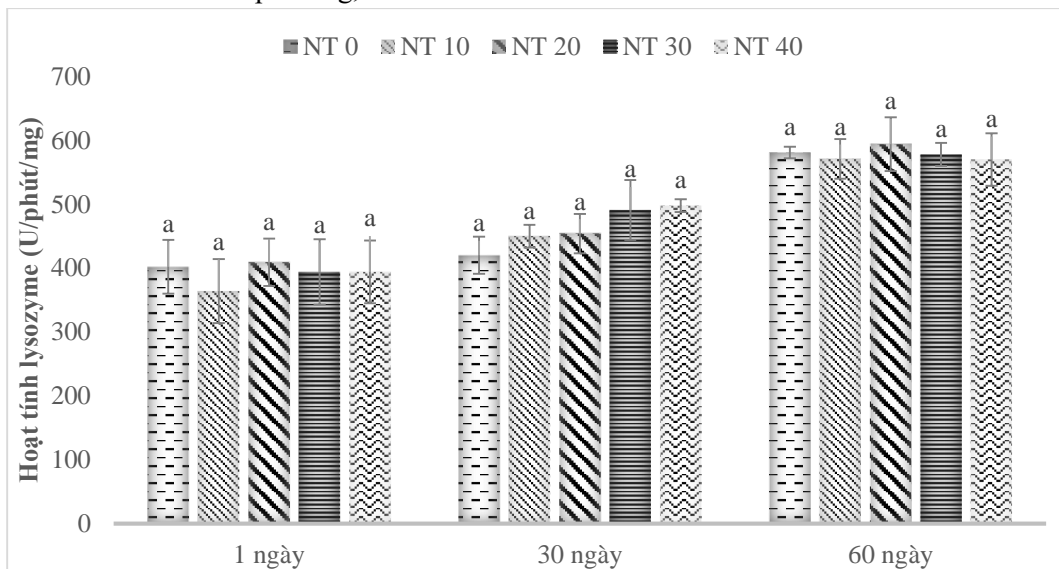
Hoạt tính lysozyme trong huyết thanh ếch Thái Lan dao động từ 364 đến 594 U/phút/mg. Ngày đầu thí nghiệm hoạt tính

lysozyme trong huyết thanh ếch Thái Lan dao động từ 364 đến 402 U/phút/mg và đến ngày 30, dao động từ 420 đến 498 U/phút/mg và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở các nghiệm thức ở các



ngày 1 và 30. Đến 60 ngày thí nghiệm, hoạt tính lysozyme trong huyết thanh ở nghiệm thức NT 20 là 594 U/phút/mg, cao hơn so

với các nghiệm thức khác nhưng không có ý nghĩa thống kê ( $p>0,05$ ) (Hình 5).



**Hình 5.** Hoạt tính lysozyme trong huyết thanh ếch Thái Lan ở các nghiệm thức tại thời điểm 1 ngày, 30 ngày và 60 ngày nuôi

Kết quả cho thấy hoạt tính lysozyme trong huyết thanh tăng ở ngày 30 và 60 so với ngày đầu thí nghiệm. Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Foyisal và cs. (2019), việc thay thế bột cá bằng bột ấu trùng ruồi lính đen trong khẩu phần ăn của tôm càng (*Cherax cainii*) làm tăng hoạt tính lysozyme của huyết thanh. Kết quả này ghi nhận việc thay thế bột cá bằng bột ấu trùng ruồi lính đen làm tăng hoạt tính lysozyme trong huyết thanh ếch Thái Lan theo thời gian nuôi. Mặc khác, lysozyme có vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch của động vật thủy sản và chống lại các tác nhân vi khuẩn gây bệnh (Kumar và cs., 2007), việc tăng hoạt tính lysozyme trong huyết thanh có ý nghĩa nâng cao miễn dịch của cơ thể chống lại các tác nhân vi khuẩn gây bệnh trên ếch. Theo Hender và cs. (2021), kết quả nghiên cứu một số chỉ tiêu miễn dịch không đặc hiệu của cá chêm (*Lates calcarifer*) khi thay thế bột cá bằng bột ấu trùng ruồi lính đen trong khẩu phần thức ăn ghi nhận sự gia tăng hoạt động tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh trên cá ở các nghiệm thức

thay thế bột cá bằng bột ấu trùng ruồi lính đen trong khi đó hoạt tính lysozyme trong huyết thanh cá chêm ở các nghiệm thức không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p>0,05$ ).

#### 4. KẾT LUẬN

Trong phạm vi nghiên cứu thay thế bột cá bằng bột ấu trùng ruồi lính đen trong khẩu phần ăn của ếch Thái Lan từ 10% (NT 10), 20% (NT 20), 30% (NT 30) và 40% (NT 40), ghi nhận số lượng hồng cầu trong máu ếch Thái Lan cao nhất ở NT 20 ( $1,37 \times 10^6$  tb/mm<sup>3</sup>) và sai khác không có ý nghĩa thống kê ( $p>0,05$ ). Số lượng tổng bạch cầu trong máu ếch Thái Lan ở các nghiệm thức dao động từ  $3,4 \times 10^4$  tế bào/mm<sup>3</sup> đến  $3,62 \times 10^4$  tế bào/mm<sup>3</sup>. Sau 60 ngày thí nghiệm, số lượng tổng bạch cầu trong máu ếch Thái Lan ở nghiệm thức NT 0 và NT 10 lần lượt là  $3,6 \times 10^4$  tb/mm<sup>3</sup> và  $3,62 \times 10^4$  tb/mm<sup>3</sup>, cao hơn có ý nghĩa thống kê ( $p<0,05$ ) so với các nghiệm thức thay thế bột cá bằng bột ấu trùng ruồi lính đen với tỷ lệ 20%; 30% và 40%. Hoạt tính lysozyme trong huyết thanh dao động từ 364 đến 594 U/phút/mg. Hoạt

tính lysozyme trong huyết thanh ở các thời điểm kiểm tra sai khác không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) giữa các nghiệm thức. Từ kết quả nghiên cứu này có thể thay thế bột cá bằng bột ấu trùng ruồi lính đen trong khẩu phần ăn của ếch Thái Lan từ 10% (NT 10), 20% (NT 20), 30% (NT 30) và 40% (NT 40).

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự tài trợ của dự án: “Sản xuất và sử dụng ấu trùng ruồi lính đen (*Hermetia illucens* Linnaeus, 1758) làm thức ăn cho một số đối tượng thủy sản nước ngọt có giá trị kinh tế tại Thừa Thiên Huế”; Mã số: TTH.2021-KC.26.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### 1. Tài liệu tiếng Việt

Lê Văn Bình và Ngô Thị Thu Thảo. (2016). Ảnh hưởng của việc giảm mức độ đậm trong thức ăn đến tăng trưởng và tỷ lệ sống của ếch Thái Lan (*Rana rugulosa*) nuôi trong giai lưới. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, (1), 106-112.

Phạm Thị Phương Lan, Châu Ngọc Phi, Nguyễn Duy Quỳnh Trâm, Lê Đức Ngoan và Nguyễn Văn Huy (2023). tỷ lệ tiêu hóa chất dinh dưỡng, axit amin và năng lượng của bột ấu trùng ruồi lính đen nguyên mỡ và tách mỡ trên cá chêm giống (*Lates calcarifer* BLOCH, 1790) nuôi trong nước ngọt. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế*, 132(3), 45–59.

Lê Đức Ngoan, Nguyễn Hải Quân, Phạm Thị Phương Lan, Nguyễn Duy Quỳnh Trâm (2021). Tổng quan về sử dụng ấu trùng ruồi lính đen (*Hermetia illucens*) làm thức ăn trong chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, (2), 141-150.

Ngô Hữu Toàn và Mạc Như Bình. (2021). *Giáo trình dinh dưỡng và thức ăn thủy sản*. NXB Đại học Huế, 318 trang.

### 2. Tài liệu tiếng nước ngoài

Ballester, M., Ramayo, C.Y, González, R.O., Pascual, M., Reixach, J., Díaz, M., Quintanilla, R. (2020). Genetic parameters and associated genomic regions for global immunocompetence and other health-related traits in pigs. *Scientific Reports*, 10(1), 1–15.

Bußler, S., Rumpold, B. A., Jander, E., Rawel, H. M. and Schlüter, O. K. (2016), Recovery and

technofunctionality of flours and proteins from two edible insect species: Meal worm (*Tenebrio molitor*) and black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae, *Heliyon*, 2, e00218.

Casali, A.P., Moura, O.M., & Lima, S.L.L. (2005). Commercial food and the carcass yield and by-products of bullfrog. *Ciência Rural*, 35(5), 1172-1178.

Cammack, J. A., & Tomberlin, J. K., (2017), The Impact of Diet Protein and Carbohydrate on Select Life-History Traits of the Black Soldier Fly *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae), *Insects*, 8, 56

Chen, X., Wu, Y., Huang, L., Cao, X., Hanif, M., Peng, F., Wu, X. and Zhang, S. (2022). Morphology and cytochemical patterns of peripheral blood cells of tiger frog (*Rana rugulosa*). *PeerJ*, 10: 13915. DOI: 10.7717/peerj.13915. eCollection 2022.

Crosbie, P. (2001). Immune response of barramundi (*Lates calcarifer*) to *Vibrio harveyi* bacterin. Thesis of doctor philosophy. University of Tasmania, Launceston.

Ellis, A.E. (1990). Lysozyme activity. In: T.C. Stolen, P.D. Fletcher, B.S. Anderson, B.S. Roberson, W.B. Muiswinkel (editors). *Technique in Fish Immunology*. New York: SOS Publications, p101-103.

Foyosal, M.J., Fotedar, R., Tay, C.Y., & Gupta, S.K. (2019). Dietary supplementation of black soldier fly (*Hermetica illucens*) meal modulates gut microbiota, innate immune response and health status of marron (*Cherax cainii*, Austin 2002) fed poultry-by-product and fishmeal based diets. *PeerJ*, 7, 6891. DOI: 10.7717/peerj.6891

Hender, A., Siddik, M.A.B., Howieson, J., & Fotedar, R. (2021). Black soldier fly, *Hermetia illucens* as an alternative to fishmeal protein and fish oil: Impact on growth, immune response, mucosal barrier status, and flesh quality of juvenile Barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790). *Biology*, 10(6), 505-514.

Henry, M.A., Gasco, L., Piccolo, G., & Fountoulaki, E. (2015). Review on the use of insects in the diet of farmed fish: Past and future, *Animal Feed Science and Technology*, 203, 1–22.

Henry, M.A., Fountoulaki, E., Vasilaki, A., Rigos, G., Kokou, F., & Karalazos, V. (2020). Dietary micronutrient supplementation in low fishmeal based diets for optimum growth and

- immune status of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 528(15), 735479.
- Hrubec, T.C., Cardinale, J.L., & Smith, S.A. (2000). Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured Tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Veterinary Clinical Pathology*, 29(1), 7-16.
- Kuo, I.P., Ching, S.L., Shuenn, D.Y., Shih, H.L., Yeh, F.H., & Fan, H.N. (2022). Effects of replacing fishmeal with defatted black soldier fly (*Hermetia illucens* Linnaeus) larvae meal in Japanese eel (*Anguilla japonica*) diet on growth performance, fillet texture, serum biochemical parameters, and intestinal histomorphology. *Aquaculture Nutrition*, 1-14.
- Khuyen, T.D., Syaghalirwa, N.M., Valérie, C., Jessica, D., Stéphane, B., Peter, B., Felipe, E.R., Lluís, T., & Patrick, K. (2017). Physiological and immune response of juvenile rainbow trout to dietary bovine lactoferrin. *Fish and Shellfish Immunology*, 71, 359-371.
- Kumar, V., Sahu, N.P., Pal, A.K. and Kumar, S. (2007). Immunomodulation of *Labeo rohita* juveniles due to dietary gelatinized and non-gelatinized starch. *Fish and Shellfish Immunology*, 23(2), 341-53.
- Kroeckel, S., Harjes, A.G.E., Roth, I., Katz, H., Wuertz, S., Susenbeth, A., & Schulz, C. (2012). When a turbot catches a fly: Evaluation of a pre-pupae meal of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) as fish meal substitute - Growth performance and chitin degradation in juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 364,345-352.
- Olsen, R. L., & Hasan, M. R. (2012), A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production, *Trends in Food Science and Technology*, 27, 120–128.
- Lan, P.T.P., Ngoan, L.D., Quan, N.H., &Tram, N.D.Q. (2022). Effect of replacement of fishmeal-based diet by full-fat or defatted black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) meal in diets on performance of Asian seabass (*Lates calcarifer*) juvenile in fresh and brackish water. *Livestock Research for Rural Development*, 34, <http://www.lrrd.org/lrrd34/11/34102ngye.html>
- Mundida, G.B., Manyala, J.O., Madzimure, J., & Rono, K. (2023). Growth performance and carcass composition of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) fed on black soldier fly (*Hermetia illucens* Linnaeus, 1758) larvae based diets. *African Journal of Agricultural Research*, 19(3), 216-225.
- Natt, M.P. and Herrick, C.A. (1952). A new blood diluent for counting erythrocytes and leukocytes of the chicken. *Poultry Science*, 31(4),735-738.
- Nghia, V.D., Lan, P.T.P., & Tram, N.D.Q. (2023). Effect of replacement of fishmeal by black soldier fly larvae meal in diets on growth performance, carcass traits and meat chemical composition of Thai frog (*Rana rugosa* Temminck and Schelegel, 1838). *Livestock Research for Rural Development*, 35, <http://www.lrrd.org/lrrd35/8/3576ndqt.html>
- Przybylska, D.A., & Nielsen, M.E. (2012). Mucosal immune response in common carp (*Cyprinus carpio* L.) - host pathogen interactions in relation to  $\beta$ -glucan stimulation. National Food Institute Biological Quality Research Group Technical University of Denmark, 128pp
- Xiong, J., Zhang, Y., Sun, Y., Liu, Q., Fan, C., Min, Y., Gou, J.P., & Chen, W. (2018). Comparison of hematological parameters in two different high altitudinal populations of *Batrachuperus pinchonii* (Amphibian: Urodela). *Amphibia-Reptilia*, 39(1),11–20.
- Zarantoniello, M., Oliveira, A.A., Sahin, T., Freddi, L., Torregiani, M., Tucciarone, I., Chemello, G., Cardinaletti, G., Gatto, E., & Parisi, G. (2023). Enhancing rearing of European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) in aquaponic systems: Investigating the effects of enriched black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae meal on fish welfare and quality traits. *Animals*, 13.
- Zhao, Y., Yang, J., Lee, W.H., & Zhang, Y. (2016). Purification of a lysozyme from skin secretions of *Bufo andrewsi*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*,142, 1–2, 46-52.