

## Nghiên cứu tiềm năng của một số chiết xuất thực vật trong phòng trị vi khuẩn đa kháng kháng sinh gây bệnh trên cá rô đồng (*Anabas testudineus*)

### Research for the potential of some plant extracts in the prevention of many antibiotic resistance bacteria that cause disease on climbing perch (*Anabas testudineus*)

Trần Kiên Cường<sup>1</sup>, Phạm Thị Hải Hà<sup>1</sup>, Nguyễn Thành Luân<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

\*Tác giả liên hệ, Email: nt.luan@hutech.edu.vn

#### THÔNG TIN

DOI:10.46223/HCMCOUJS.tech.vi.18.2.2607.2023

Ngày nhận: 20/12/2022

Ngày nhận lại: 10/02/2023

Duyệt đăng: 07/06/2023

#### Từ khóa:

*Acrostichum aureum* L;  
*Anacardium occidentale* L; cá rô đồng *Anabas testudineus*; dược chất phối trộn thức ăn; *Jasminum subtriplinerve blume*; *Kosakonia sacchari*; *Vitex negundo*; *Vitex rotundifolia*

#### Keywords:

*Acrostichum aureum* L;  
*Anacardium occidentale* L; *Anabas testudineus*; natural compounds; *Jasminum subtriplinerve blume*; *Kosakonia sacchari*; *Vitex negundo*; *Vitex rotundifolia*

#### TÓM TẮT

Giới thiệu: Thức ăn chăn nuôi thương mại hiện tại mới chỉ đáp ứng được nhu cầu dinh dưỡng cần thiết mà chưa có khả năng hỗ trợ tăng sức đề kháng cho cá. Bên cạnh đó việc sử dụng kháng sinh không đúng liều lượng ảnh hưởng xấu tới môi trường cũng như sức khỏe con người. Giải pháp an toàn hướng tới là sử dụng nguồn dược liệu phong phú sẵn có tại Việt Nam phối trộn vào thức ăn chăn nuôi cá nhằm cải tiến chất lượng và nhắm tới mục tiêu an toàn.

Vật liệu và phương pháp: Chiết xuất EtOH lá cây Điều (*Anacardium occidentale* L) TD1, Ngũ trảo (*Vitex negundo*) TD2, Bình linh xoan (*Vitex rotundifolia*) TD3, Ráng (*Acrostichum aureum* L) TD4, và Vằng Sẻ (*Jasminum subtriplinerve blume*) TD5 thu thập tại tỉnh Vĩnh Long, Việt Nam dựa trên đánh giá kháng khuẩn *in vitro* bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch và MIC, đánh giá *in vivo* thử nghiệm độc lực bằng gây nhiễm nhân tạo vi khuẩn *Kosakonia sacchari* trên mô hình cá rô đồng *Anabas testudineus* thử nghiệm và khảo sát hoạt tính của chiết xuất thực vật khi phối trộn vào thức ăn.

Kết quả: Hiệu quả kháng khuẩn *in vitro* cho thấy chiết xuất EtOH lá Điều TD1 kháng khuẩn tốt nhất ở nồng độ 12.5 µg/ml. Thử nghiệm đánh giá mức độ độc lực của vi khuẩn *K. sacchari* gây chết 87.6% cá sau 24 giờ tiêm ở mức 10<sup>5</sup> CFU/ml, ngưỡng gây chết tối thiểu LD<sub>50</sub> đạt giá trị 3.16 × 10<sup>4</sup> CFU/ml. Trong đánh giá hoạt tính tiềm năng của chiết xuất thực vật TD1 khi phối trộn vào thức ăn có tác dụng bảo vệ cá khỏi tác nhân gây chết nhân tạo là khuẩn *K. sacchari* (tỉ lệ sống đạt 93%), và còn hỗ trợ làm tăng mức tăng trọng của cá lên tới 22.8g.

Kết luận: Chiết xuất EtOH lá Điều *A. occidentale* TD1 kháng khuẩn cao nhất và có khả năng bảo vệ cá khỏi vi khuẩn *K. sacchari* đa kháng với kháng sinh gây bệnh trên đối tượng cá rô đồng *A. testudineus*. Một số nhận định ban đầu về giá trị dược liệu của một số loại cây sẵn có tại Việt Nam dần thay thế kháng sinh, nhắm tới mục tiêu an toàn trong nuôi trồng, sản xuất thực phẩm và người tiêu dùng. Từ đó, đề tài mở rộng triển khai vào quy mô pilot hoặc thử nghiệm trên ao nuôi lớn hơn, hướng tới sản xuất thương mại.

---

**ABSTRACT**

**Introduction:** Industrial feed in fish farming merely covers nutritional demands and does not stimulate improved immunity in fish. Additionally, antibiotic misuse is hazardous to both the environment and human health. Therefore, for quality and safety, the most secure approach is to employ the huge supply of Vietnamese medicinal plants in fish farm food supplements.

**Materials and methods:** EtOH extract of the leaves of *A. occidentale* TD1, *V. negundo* TD2, *V. rotundifolia* TD3, *A. aureum* L TD4, *J. subtriplinerve* Blume TD5 collected in Vinh Long province, Vietnam based on *in vitro* antibacterial assessment by agar plate diffusion method and MIC, *in vivo* evaluation of virulence test by artificial infection with *Kosakonia sacchari* bacteria on the experimental fish model *Anabas testudineus* and investigate the activity of plant extracts when mixed into the feed.

**Result:** Antibacterial test by agar plate diffusion method showed that TD1 extract gave the best antibacterial result along with a concentration of 12.5 µg/ml. In the experiment to evaluate the virulence of the isolated *K. sacchari* strain, the result was that the strain was lethal to 87.6% of fish after 24 hours of injection at  $10^5$  CFU/ml, and the minimum lethality threshold  $LD_{50}$  was recorded in strains of  $3.16 \times 10^4$  CFU/ml. The results were obtained in the experiment to evaluate the activity of plant extracts when mixed into feed. Feed containing TD1 protected fish from the artificial lethal agent *K. sacchari* (survival rate reaches 93%) and also helped to increase the weight gain of fish up to 22.8g.

**Conclusion:** EtOH leaf extract of *A. occidentale* TD1 exhibits the strongest antibacterial activity and can protect perch *A. testudineus* against multi-antibiotic-resistant strains of *K. sacchari*. There is an initial assessment of the potential of Vietnamese medicinal plants to gradually replace antibiotics, aiming for safety in farming, food production, and consumption. Following that, the idea might be carried out on a bigger scale as pilot models or fish farms to become a new source of commercial animal fodder.

---

**1. Giới thiệu**

Cá rô đồng (*Anabas testudineus*) là loài động vật thủy sản thường sống trong môi trường nước ngọt. Cá phân bố chủ yếu tại các nước như Malaysia, Việt Nam, Lào, Campuchia, Thái Lan (Piwpong, Chiayvareesajja, & Chiayvareesajja, 2016), Philippines (Bernal, Aya, De Jesus-Ayson, & Gracia, 2015), Ấn Độ (Mandal, Kumar, & Jayasankar, 2016) và Bangladesh. Thịt cá mang giá trị hàm lượng dinh dưỡng cao và đem lại nguồn lợi về kinh tế cho người chăn nuôi (Duong, Duong, & Tran, 2014; Mai, 1978; Rainboth, 1996; Truong & Tran, 1993). Sự mở rộng của nghề nuôi cá rô đồng yêu cầu nguồn thức ăn hàm lượng dinh dưỡng đáp ứng đủ với nhu cầu của cá và quy trình kỹ thuật nuôi tiêu chuẩn để cá sinh trưởng tốt, đạt kích cỡ, đem lại hiệu quả kinh tế cao (Nguyen, 2004). Tuy nhiên, các thức ăn thương mại hiện tại mới chỉ cung cấp hàm lượng dinh dưỡng cần thiết nhưng chưa hiệu quả tăng cường sức đề kháng và hỗ trợ kháng một số bệnh nhiễm khuẩn trên

cá. Vì vậy, các hộ chăn nuôi vẫn bổ sung kháng sinh, gây tồn dư kháng sinh trong cá và môi trường nước nuôi, ô nhiễm môi trường và đe dọa sức khỏe con người. Trong những năm gần đây, tình trạng lạm dụng các loại kháng sinh trong việc phòng trị bệnh đặt ra nhiều thách thức, trở ngại lớn cho ngành nuôi trồng thủy sản (Cabello, 2006; FAO, 2003; Harikrishnan, Kim, Balasundaram, & Heo, 2012; Rao, Das, Jyotirmayee, & Chakrabarti, 2006). Việc sử dụng kháng sinh và các hóa chất kháng khuẩn khác phổ biến trong nuôi tôm cá cả ba miền Việt Nam, với hơn 20 loại kháng sinh đã được sử dụng, bao gồm cả các loại kháng sinh trong danh mục cấm. Vi khuẩn kháng kháng sinh có thể phát triển và lan truyền giữa thủy sản và con người, thông qua tiếp xúc trực tiếp hoặc qua chuỗi thức ăn, và môi trường (Luu & ctg., 2021).

Để hạn chế hoặc ngăn ngừa sự phụ thuộc kháng sinh theo ba tiêu chí CGE sạch, xanh, và đạo đức (Clean, Green, and Ethical - CGE) (Martin & Ferasyi, 2016), các nhà nghiên cứu và các hộ chăn nuôi đang hướng tới nguồn dược liệu tự nhiên sẵn có, nhằm từng bước thay thế kháng sinh, hóa chất kháng khuẩn, kháng nấm vào phòng trị bệnh thủy sản. Do đó, người chăn nuôi hiện nay có xu hướng sử dụng thức ăn chăn nuôi bổ sung dược liệu phòng trị bệnh, và không tác động xấu môi trường. Tại Việt Nam, đặc biệt ở các tỉnh Tây Nam Bộ, nguồn thực vật vô cùng phong phú, đa dạng với giá trị dược liệu cao, là nguồn nguyên liệu tiềm năng phòng trị bệnh cho con người, vật nuôi, và cả động vật thủy sản. Theo nghiên cứu một số chiết xuất từ các cây dược liệu, các chiết xuất tự nhiên chứa lượng lớn hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn, kháng oxy hóa, hỗ trợ động vật nuôi tăng trưởng nhanh, đạt kích thước chuẩn, chất lượng thịt cao, và sinh sản tốt (Ho & Nguyen, 2012; Reddy & ctg., 2020).

Năm 1991, Himejima và Kubo báo cáo, khả năng kháng khuẩn của 16 hợp chất phenol từ dầu vỏ hạt Điều *A. occidentale* và hầu hết kháng lại vi khuẩn *Brevibacterium ammoniagenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, và *Propionibacterium acnes* (Himejima & Kubo, 1991). Năm 2007, Valgas chỉ ra một số chiết xuất từ lá hoặc vỏ cây Điều hiệu quả kháng vi khuẩn *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, các loài *Enterobacter*, *Streptococcus pneumoniae*, *Corynebacterium pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* đa kháng, các loài *Acinetobacter* và *Pseudomonas aeruginosa* đa kháng trong phương pháp khuếch tán đĩa thạch 6 - 14 mm (Valgas, Souza, Smania, & Smania, 2007), cho thấy chiết xuất từ Điều có hoạt tính kháng khuẩn cao và có tiềm năng nghiên cứu.

Bên cạnh đó, các nghiên cứu sơ bộ về hoạt tính của các chiết xuất thực vật khác. Nhà nghiên cứu Kim (2009) sàng lọc được các hợp chất kháng oxy hóa mạnh trong chiết xuất toàn phần từ cành cây Bình linh xoan *V. rotundifolia* (Kim, 2009). Kết quả nghiên cứu năm 2018 của Chan, Wong, và Chan (2018), dịch sắc nước và dịch chiết cùi của cây Bình linh xoan *V. rotundifolia*, có tác dụng trên các vi khuẩn Gram dương như *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Sarcina lutea*, và ức chế tụ cầu vàng *Staphylococcus aureus* (Chan & ctg., 2018).

Năm 2020, Souto và cộng sự công bố, cao chiết methanol từ thân cây Cây Ngũ Trảo *V. negundo* có hoạt tính kháng oxy hóa mạnh bằng phương pháp DPPH (Souto & ctg., 2020). Hoạt động kháng khuẩn của lá và vỏ cây Ngũ trảo được đánh giá hiệu quả trên ba vi khuẩn Gram dương *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* và năm vi khuẩn Gram âm *Escherichia Coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus* (Bansod & Harle, 2009).

Chiết xuất thực vật của lá cây Ráng *A. aureum* cho thấy chiết xuất methanol của lá cây thể hiện nồng độ ức chế tối thiểu là 50 mg/ml và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu là 25 mg/ml đối với *P. aeruginosa*. Ngoài ra, flavonoid trong chiết xuất còn ngăn ngừa chất béo tích tụ trong cơ thể, hạn chế bệnh béo phì, bệnh tim mạch, và đái tháo đường, kháng oxy hóa kháng các gốc tự do trong cơ thể (Thomas, 2012).

Cây Vằng sẻ *J. subtriplinerve* blume hầu như chưa có nhiều công bố về hoạt tính kháng khuẩn. Công bố của Verma và cộng sự năm 2018 cho thấy, năm chiết xuất từ lá và thân cây Vằng sẻ với các dung môi ete dầu mỏ, ethyl axetate, ethanol, methanol, hoặc nước có hoạt tính kháng khuẩn, kháng oxy hóa, và gây độc tế bào. Tất cả các chiết xuất đều thể hiện hoạt tính kháng vi khuẩn, ngoại trừ chiết xuất từ nước (Verma & ctg., 2018).

Do đó, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu đánh giá hoạt tính các chiết xuất thực vật từ lá cây dược liệu gồm Điều (*A. occidentale*), Ngũ trảo (*V. negundo*), Bình linh xoắn (*V. rotundifolia*), Ráng (*A. aureum* L), và Vằng Sẻ (*J. subtriplinerve* blume) bằng phương pháp *in vitro* và *in vivo*. Kết quả này sẽ cung cấp thông tin cơ sở cho các nghiên cứu chuyên sâu và có thể áp dụng thực tế trên trang trại nuôi.

## 2. Vật liệu và phương pháp

### 2.1. Địa điểm thực hiện nghiên cứu

Các thử nghiệm trong nghiên cứu này được thực hiện tại phòng thí nghiệm Vi sinh vật của Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành.

### 2.2. Đối tượng, phạm vi nghiên cứu

Lá của các cây Điều (*A. occidentale*) TD1, Ngũ trảo (*V. negundo*) TD2, Bình linh xoắn (*V. rotundifolia*) TD3, Ráng (*A. aureum* L) TD4, Vằng sẻ (*J. subtriplinerve* blume) TD5 thu nhận tại tỉnh Vĩnh Long, Việt Nam sau khi thu nhận các mẫu lá được rửa sạch, cắt nhỏ, sấy khô kiệt ở nhiệt độ 50°C cho đến khi trọng lượng lá không đổi, tiến hành nghiền thành bột, và tách chiết cao tổng trong ethanol 96° (EtOH).

Các vi khuẩn đối chứng chuẩn bao gồm *Escherichia coli* (*E. coli*, ATCC 25922), *Bacillus cereus* (*B. cereus*, ATCC 10876), *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*, ATCC 13932) thương mại (American Tissue Culture Collection, ATCC; Manassas, VA, USA). Vi khuẩn *K. sacchari* đa kháng kháng sinh (kháng lại ampicillin, amoxicillin, và clindamycin) đã được phân lập, định danh từ đề tài của cùng nhóm nghiên cứu đã công bố trước đó (Nguyen & ctg., 2021).

### 2.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng khuẩn *in vitro* của chiết xuất thực vật

#### 2.3.1. Phương pháp khuếch tán đĩa thạch

Các vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường BHI (Brain Heart Infusion, Himedia), và độ đục của dịch khuẩn được điều chỉnh đến 0.5 MacFarland Standard ( $\sim 1.5 \times 10^8$  CFU/ml). Dịch huyền phù vi khuẩn được cho vào đĩa thạch MHA (Mueller Hinton Agar, Himedia) theo phương pháp Kirby-Bauer (kháng khuẩn bằng khuếch tán đĩa thạch) (Bauer, Perry, & Kriby, 1959; Schiller, Young, Schulze, Tripepi, & Pohlchoroder, 2022). Các lỗ được đục trên mặt đĩa môi trường đã trải vi khuẩn với đường kính 6mm, sau đó thêm dịch chiết vào. Đối chứng dương tính là ampicillin (Sigma Aldrich) thuộc nhóm beta-lactamase và đối chứng âm là DMSO (Sigma Aldrich). Các thử nghiệm kháng khuẩn trên đĩa thạch MHA được lặp lại ba lần.

Hiệu quả kháng khuẩn của chiết xuất được đánh giá bằng cách đo vùng ức chế vi khuẩn, theo công thức sau:

$$I = D - d \quad (1)$$

I (mm): số đo vùng kháng khuẩn của chiết xuất

D (mm): đường kính của vòng ức chế

d (mm): đường kính của đối chứng âm

### 2.3.2. Phương pháp kiểm tra nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Vi khuẩn được nuôi cấy và pha loãng trong môi trường MH (Muller Hilton) đến mật độ  $5 \times 10^6$  CFU/ml. Mỗi giếng được thêm vào 50 $\mu$ l dịch tăng sinh vi khuẩn và 50 $\mu$ l chiết xuất thực vật với các mức nồng độ pha loãng khác nhau trong DMSO. Đối chứng âm chỉ chứa gồm dịch vi khuẩn, môi trường, và DMSO. Các giếng nền (Blank) chứa môi trường và chiết xuất. Giếng làm đối chứng dương là kháng sinh ampicillin (Sigma Aldrich). Sau 24 giờ cho 20 $\mu$ l thuốc thử resazurin 0.1% cho vào mỗi giếng. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là mức nồng độ được xác định là mức thấp nhất trong nghiệm thức có khả năng không cho vi khuẩn tiếp tục tăng trưởng (chất chỉ thị không đổi màu) (Luong, Moon, Kim, Shibamoto, & Ahn, 2012). Các nghiệm thức được lặp lại ba lần.

## 2.4. Phương pháp đánh giá tiềm năng *in vivo* của chiết xuất thực vật bảo vệ cá khỏi các tác nhân gây chết nhân tạo

### 2.4.1. Xác định hình thái, đặc điểm, và sinh hóa

Việc tái định danh vi khuẩn được phân lập từ các mẫu cá bệnh trước đó được tái kiểm tra trên các môi trường chuyên biệt và bằng các phản ứng sinh hóa, nhằm xác định đúng với vi khuẩn phân lập ban đầu (qua các môi trường chọn lọc như môi trường MacConkey, Thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS, Himedia), môi trường thạch máu (BA), Kligler iron agar (KIA, Himedia), nhuộm Gram, các phản ứng sinh khí gas, H<sub>2</sub>S, Catalase, Oxidase, ... Nguyên lý, nguyên tắc, và các chỉ tiêu theo dõi theo hướng dẫn thực hành kỹ thuật xét nghiệm vi sinh lâm sàng của Bộ Y tế năm 2017 (Luong, Doan, & Nguyen, 2017).

### 2.4.2. Phương pháp gây nhiễm nhân tạo

Cá rô đồng *A. testudineus* giai đoạn con giống được thu nhận tại trại cung cấp cá giống trên địa bàn Thành phố Hồ Chí Minh, kích thước khoảng 7 - 8cm, trọng lượng 5 - 7 g/con được kiểm tra sức khỏe như màu sắc da, vảy tươi sáng và không có tổn thương ngoại thể, kích thước đều nhau, được nuôi thích nghi một tuần trong hồ nuôi, sục khí 24/24 giờ. Cá được bắt kiểm tra cảm quan ngẫu nhiên về bệnh tích bên ngoài và sự nhiễm khuẩn nội tạng trên đĩa TSA ủ 28°C, 24 giờ. Phương pháp tiêm xoang bụng với liều lượng 0.1 ml/cá trong các nghiệm thức: (N1) đối chứng được tiêm NaCl 0.85%, (N2) gây nhiễm vi khuẩn bệnh với các mức nồng độ vi khuẩn từ  $10^1$  -  $10^5$  CFU/ml. Thực hiện chế độ nuôi sục khí liên tục, thay mới 50% nước của hồ cá mỗi ngày (Ngoc & Tam, 2012).

### 2.4.3. Phương pháp xác định liều gây chết LD<sub>50</sub>

Quan sát tình trạng cá sau khi tiêm, nếu cá xuất hiện các biểu hiện bất thường như bơi không ổn định, bỏ ăn thì tiến hành ghi nhận số cá chết. Thống kê số cá chết và số cá sống trong từng nghiệm thức để tính giá trị LD<sub>50</sub> (Tu, Huynh, & Nguyen, 2013; Dang, Tran, & Nguyen, 2012; Ramakrishnan, 2016) theo công thức sau:

$$LD_{50} = 10^{(a+x)}, \text{ Với } x = \frac{(Pa - 50)}{(Pa - Pu)} \quad (2)$$

Trong đó:

$10^a$ : Nồng độ ghi nhận số lượng cá sống và cá chết sau thử nghiệm ở ngưỡng 50%

Pa, Pu: là giá trị cận trên và cận dưới được xác định của nồng độ gây chết 50%

Dựa vào kết quả thấy được từ phương pháp xác định giá trị LD<sub>50</sub> để xác định độc lực giữa các nhóm vi khuẩn.

#### 2.4.4. Phương pháp đánh giá tiềm năng in vivo trên mô hình cá

Trong thử nghiệm này, cá được bố trí ngẫu nhiên 15 con/hồ 20 lít, chia thành 05 nghiệm thức gồm: (NT1) đối chứng, cá tiêm NaCl 0.85% và cho ăn với thức ăn thương mại; (NT2) cá gây nhiễm với vi khuẩn gây bệnh định danh trước đó với liều lượng LD<sub>50</sub>/con ở xoang bụng và cho thức ăn bổ sung kháng sinh ampicillin (100 mg/kg trọng lượng cá); (NT3) cá gây nhiễm với vi khuẩn với liều lượng độc lực LD<sub>50</sub>/con ở xoang bụng và cho ăn thức ăn bổ sung kháng sinh erythromycin (100 mg/kg trọng lượng cá); (NT4) cá gây nhiễm nhân tạo với *K.sacchari* liều lượng LD<sub>50</sub>/con ở xoang bụng và cho thức ăn bổ sung thêm 1% chiết xuất TD1 (nồng độ chiết xuất được chọn cho hoạt tính kháng khuẩn mạnh trong thử nghiệm *in vitro*); (NT5) cá gây nhiễm với *K.sacchari* liều lượng LD<sub>50</sub>/con ở xoang bụng và cho ăn thức ăn thương mại (Hamid & ctg., 2022; Ho & Nguyen, 2012). Tỷ lệ sống chết ở các nhóm được ghi nhận. Các mẫu cá gây nhiễm nhân tạo sẽ được tái phân lập để khẳng định kết quả tác nhân của việc gây nhiễm nhân tạo trong khi thực hiện các nghiệm thức.

#### 2.4.5. Phương pháp chăm sóc và theo dõi

Các nghiệm thức được lặp lại ba lần và ghi nhận kết quả thường xuyên (2 lần/ngày). Trong thời gian bố trí các thử nghiệm, cá luôn được quan sát kỹ các hoạt động sinh lý, hoạt động bơi lội, và hoạt động ăn mồi của cá và theo dõi các yếu tố môi trường, nước nuôi để thu nhận số liệu và kịp thời giải quyết nếu có dấu hiệu bất thường. Các chỉ tiêu theo dõi được ghi nhận (Ho & Nguyen, 2012), gồm:

Kết thúc thử nghiệm/nghiệm thức: Toàn bộ cá ở các nghiệm thức được thu nhận và xác định một số chỉ tiêu:

- Xác định tỷ lệ sống (Survival rate) (Abdel-Latif & ctg., 2022) được thể hiện theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ sống} = \frac{\text{Tổng số cá thu được}}{\text{Tổng số cá lúc đầu}} \times 100 \quad (3)$$

- Tăng trọng (Weight Gain) (Abdel-Latif & ctg., 2022) được thể hiện theo công thức

$$\text{WG (g)} = \text{Wc} - \text{Wđ} \quad (4)$$

Trong đó:

WG: độ tăng trọng của cá (g)

Wc: Trọng lượng cá sau khi kết thúc thử nghiệm (g)

Wđ: Trọng lượng cá lúc đầu (g)

### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Hoạt tính kháng khuẩn in vitro của chiết xuất thực vật

Các dịch chiết xuất cao tổng EtOH từ lá cây Điều TD1 (*A. occidentale*), Ngũ Trảo TD2 (*V. negundo*), Bình Linh Xoan TD3 (*V. rotundifolia*), Ráng TD4 (*A. aureum*), và Văng Sẻ TD5 (*J. subtriplinerve*) được tiến hành xác định hoạt tính kháng khuẩn với các vi khuẩn *E.coli* ATCC 25922, *B.cereus* ATCC 10876, *L.monocytogenes* ATCC 13932, và vi khuẩn *K. sacchari* phân lập từ cá rô đồng *A.estudineus*, đã được định danh từ đề tài cùng nhóm nghiên cứu (Nguyen & ctg., 2021). Kết quả khuếch tán đĩa thạch cho thấy, chiết xuất lá cây Điều TD1 kháng khuẩn tốt nhất với *E.coli*, *B. Cereus*, *L. Monocytogenes*, *P. Aeruginosa*, và với *K. sacchari* (lần lượt là 15.6mm, 16mm, 15mm, 15.6mm, và 11.5mm, tương ứng). Bên cạnh đó, hai chiết xuất tổng EtOH của Bình Linh Xoan TD3 và Ngũ Trảo TD2 cũng kháng khuẩn với 05 vi khuẩn *B. cereus*, *L. monocytogene*, *P. aeruginosa*, *K. Sacchari* và không kháng khuẩn *E. Coli* tuy nhiên khi so sánh với cao Điều TD1

có đường kính vòng kháng khuẩn nhỏ hơn, ở hai chiết xuất còn lại là Ráng TD4 và Vàng Sẻ TD5 đều không ghi nhận vòng kháng khuẩn. Một số nghiên cứu trước đây cũng chỉ ra, nguồn dược liệu thu tại các khu vực địa lý khác nhau hay chiết xuất bằng dung môi khác nhau sẽ có hoạt tính khác nhau (Dai, Ho, Le, Poul, & Ole, 2008; Lopes & ctg., 2018). Như vậy, chiết xuất tổng EtOH từ lá Điều TD1 có hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất, và có tiềm năng rõ rệt hơn so với chiết xuất lá Ráng TD4 và Vàng Sẻ TD5.

**Bảng 1**

Hoạt tính kháng vi khuẩn của các dịch chiết xuất EtOH từ thực vật (mm)

Chủng khuẩn		<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Kosakonia sacchari</i> *
		ATCC 25922	ATCC 10876	ATCC 13932	ATCC 9027	
Cao chiết	Cao	15.6 ± 0.51	16 ± 0.21	15 ± 0.32	15.6 ± 0.27	11.5 ± 0.15
	Kháng sinh	11.6 ± 0.15	20.6 ± 0.20	23.3 ± 0.15	17 ± 0.03	9 ± 0.10
Điều TD1	Cao	0 ± 0.00	8.3 ± 0.10	7.6 ± 0.21	10.6 ± 0.15	7.3 ± 0.25
	Kháng sinh	12.6 ± 0.12	10.3 ± 0.17	27.6 ± 0.21	20.6 ± 0.10	12.7 ± 0.15
Ngũ Trảo TD2	Cao	0 ± 0.00	10.6 ± 0.21	11.6 ± 0.10	10.3 ± 0.20	9.4 ± 0.21
	Kháng sinh	12.3 ± 0.15	9 ± 0.15	25 ± 0.21	22.6 ± 0.06	16.3 ± 0.15
Bình Linh Xoan TD3	Cao	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00
	Kháng sinh	13 ± 0.00	10.3 ± 0.17	25.5 ± 0.10	20.3 ± 0.10	14.2 ± 0.15
Ráng TD4	Cao	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00
	Kháng sinh	12.3 ± 0.17	11 ± 0.02	24.6 ± 0.10	23 ± 0.10	13.6 ± 0.12
Vàng Sẻ TD5	Cao	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00
	Kháng sinh	12.3 ± 0.17	11 ± 0.02	24.6 ± 0.10	23 ± 0.10	13.6 ± 0.12

\* Vi khuẩn phân lập và định danh trong đề tài cùng nhóm nghiên cứu

Nguồn: Nguyen và cộng sự (2021)

Bên cạnh đó, hoạt tính kháng lại vi khuẩn của các dịch chiết xuất EtOH thực vật còn được đánh giá bằng phương pháp MIC. Kết quả ghi nhận, chiết xuất EtOH lá Điều TD1 có giá trị IC<sub>50</sub> tốt nhất khoảng 12.5 µg/ml, cao hơn giá trị IC<sub>50</sub> của các chiết xuất còn lại Ngũ Trảo TD2 và Bình Linh Xoan TD3 (giá trị IC<sub>50</sub> tương ứng là 25 µg/ml, và 50 µg/ml).

Từ kết quả đánh giá tiềm năng kháng khuẩn *in vitro*, chiết xuất EtOH lá Điều TD1 được lựa chọn làm nguồn nguyên liệu nghiên cứu cho các thử nghiệm sau nhằm đánh giá hoạt tính của chiết xuất thực vật trong việc bảo vệ cá trên mô hình *in vivo* với nồng độ sử dụng là mức IC<sub>50</sub> 12.5 µg/ml.

### 3.2. Mức độ gây độc lực của vi khuẩn *K. sacchari* phân lập

Tình trạng cá khi bị nhiễm vi khuẩn *K. sacchari* được ghi nhận như sau: Cá nhiễm vi khuẩn bơi thành từng đám ở đáy bể cá, thải nhiều phân ra ngoài. Sau khi tiêm 03 ngày, da cá đỏ sậm, xuất hiện tình trạng huyết dưới da, vây mang, vây đuôi, và vây bụng có những tia máu nổi rõ, mang xuất huyết, nội tạng chuyển màu đen (**Hình 1**). Dấu hiệu bệnh tích khi gây nhiễm vi khuẩn

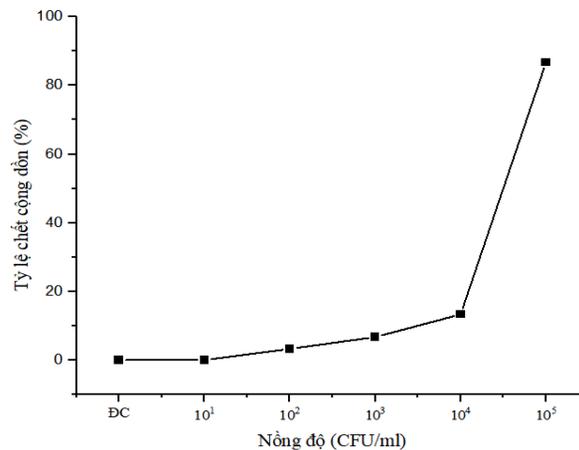
*K. sacchari* ít khi được ghi nhận từ trước đến nay và khác với tình trạng bệnh của một số vi khuẩn gây xuất huyết trên cá như *Aeromonas* spp. Các đặc điểm bệnh tích bên ngoài của cá bệnh gồm các triệu chứng như mắt cá lồi so với hốc mắt, da cá có các đốm xuất huyết nhưng thường chỉ tập trung nhiều ở các vùng xung quanh miệng, mắt, quanh các gốc vây bơi, và phần hậu môn. Đặc biệt, phía bên trong xoang ổ bụng có dịch tiết màu hồng và các nội tạng như gan, thận, và tỳ tạng có hiện tượng xuất huyết hay phình to, và có thể bị mềm nhũn như những mô tả của Tu và cộng sự (2008); Ly, Nguyen, Vo, và Doan (2009); Crumlish, Pham, Koesling, Vo, và Gravigen (2010). Ngoài ra, kết quả gây nhiễm vi khuẩn *A. hydrophila* trên cá nheo xanh/lục (blue catfish, *Ictalurus furcatus*) của Li, Beck, Su, Terhune, và Peatman (2013) cũng có các biểu hiện bệnh bên ngoài như da cá xuất huyết và mắt bị lồi. So sánh với các đặc điểm của vi khuẩn thường gây xuất huyết trên cá nhận thấy, đối với vi khuẩn *K. sacchari* phân lập có các đặc điểm khác biệt và đặc trưng hơn hẳn, như xuất huyết dưới da toàn thân chứ không phải cục bộ trên một vài vị trí. Dấu hiệu nhiễm bệnh của vi khuẩn *K. sacchari* trong nghiên cứu này cũng là một điểm mới cần lưu ý và đánh giá kĩ hơn trong những nghiên cứu tiếp theo về sau.



**Hình 1.** Hình ảnh chụp dấu hiệu ngoại thể và nội tạng của cá khi gây nhiễm nhân tạo với vi khuẩn *K. sacchari* phân lập

Tình trạng độc lực của cá sau khi lây nhiễm nhân tạo bằng vi khuẩn *K. sacchari* nhận thấy, cá bị lây nhiễm chết toàn bộ ở nồng độ tiêm  $10^5$  CFU/ml sau 24 giờ tiêm (**Hình 2**). Tỷ lệ cá chết này cũng giảm dần theo nồng độ tiêm cá sau ba lần thực hiện nghiệm thức từ  $10^5$  CFU/ml (87.6%) đến  $10^1$  CFU/ml (0%) và so với đối chứng chỉ tiêm với NaCl 0.85% thì không ghi nhận tình trạng cá chết. Tỷ lệ cá chết 50% ( $LD_{50}$ ) cũng được xác định ở mức  $3.16 \times 10^4$  CFU/ml, giá trị  $LD_{50}$  này cho thấy đây là vi khuẩn mang độc lực cao. Tương tự như các dấu hiệu bệnh tích ngoại thể và nội tạng thì khả năng gây bệnh của vi khuẩn *K. sacchari* trên đối tượng cá rô đồng cũng chưa từng được công bố trên bất kì phương tiện nào trước đó. Vi khuẩn *K. sacchari* từ trước đến nay chỉ được biết đến là vi khuẩn thuộc Gram âm, hiếu khí, không có khả năng sinh bào tử, hình que di động, có khả năng cố định đạm, được phát hiện trong các vườn canh tác mía (Chen & ctg., 2014). Tuy nhiên, việc định danh sinh lý, sinh hóa và hình thái vi khuẩn trước đó trong nghiên cứu của cùng nhóm tác giả (Nguyen & ctg., 2021) đã xác định, vi khuẩn *K. sacchari* có khả năng gây ra bệnh tích trên cá rô đồng và có mức độ độc lực cao khi so sánh với các nghiên cứu các vi khuẩn gây bệnh khác. Crumlish và cộng sự (2010) đã thực hiện gây nhiễm trên cá tra bằng hai cách là tiêm và ngâm với vi khuẩn *E. ictaluri* ở hai mức nồng độ là  $1 \times 10^6$  và  $1 \times 10^8$  CFU/ml. Kết quả thu nhận được sau 12 ngày thử nghiệm, tỷ lệ cá chết trong nghiệm thức tiêm là 95%, còn trong nghiệm thức ngâm là 80%. Nghiên cứu về mức độ gây độc lực của vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh trên cá tra ở khu vực Đồng bằng sông Cửu Long. Dang và Nguyen (2009) cho thấy, độc lực cao nhất là  $< 10^2$  CFU/ml và thấp nhất là  $10^6$  CFU/ml. Nghiên cứu năm 2020, tại Ấn Độ, nhóm tác giả

Haque, Bandyopadhyay, và Modal (2020) chỉ ra, nguy cơ gây bệnh của vi khuẩn *Pseudomonas* trên cá rô đồng *A. testudineus*, ở các ngưỡng nồng độ bao gồm  $2 \times 10^2$  CFU/ml,  $2 \times 10^3$  CFU/ml,  $2 \times 10^4$  CFU/ml,  $2 \times 10^5$  CFU/ml, và  $2 \times 10^6$  CFU/ml được tiêm vào cá gây bệnh cao và gây chết 100% ở nồng độ  $2 \times 10^6$  CFU/ml và đạt giá trị LD<sub>50</sub> là  $2 \times 10^{4.59}$  CFU/ml. Như vậy, có thể thấy *K. sacchari* là vi khuẩn độc lực cao được tiếp tục dùng cho các thử nghiệm *in vivo* xác định hoạt tính của chiết xuất thực vật bảo vệ cá khỏi tác nhân gây chết nhân tạo.



**Hình 2.** Các mức tỷ lệ cá bị chết sau khi gây nhiễm nhân tạo theo từng nồng độ tiêm từ  $10^1$  -  $10^5$  CFU/ml và đối chứng cá tiêm NaCl 0.85%

### 3.3. Tiềm năng *in vivo* của chiết xuất thực vật bảo vệ cá khỏi tác nhân *K. sacchari*

#### 3.3.1. Tỷ lệ bảo vệ cá khỏi tác nhân gây chết nhân tạo

Hoạt tính của EtOH từ lá cây Điều (1% chiết xuất TD1) bảo vệ cá khỏi các tác nhân gây chết nhân tạo và nhận được kết quả về tỷ sống của cá rô đồng trong **Bảng 2**.

**Bảng 2**

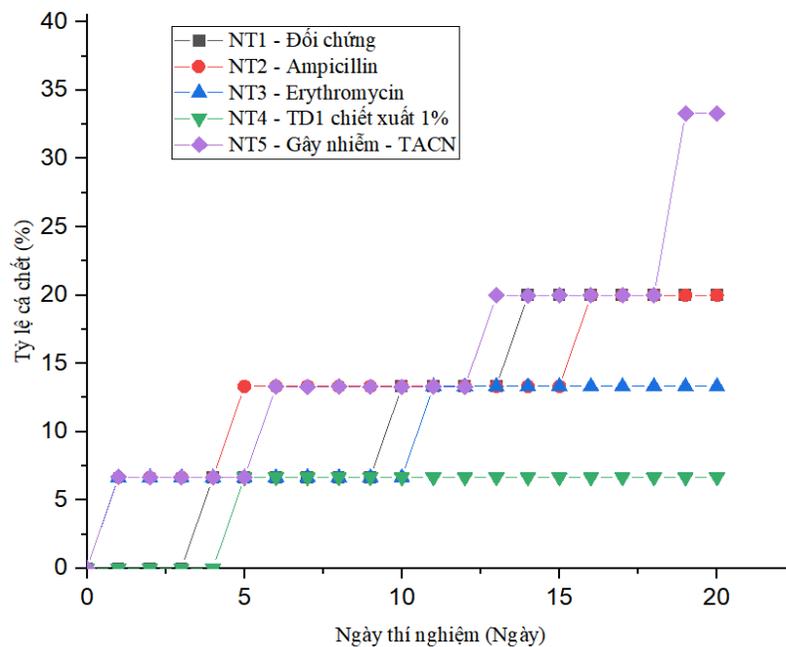
Tỷ lệ bảo vệ cá khỏi các tác nhân gây chết nhân tạo

Nghiệm thức	Số cá chết (con)	Số cá sống (con)	Tỷ lệ sống (%)	Tỷ lệ chết (%)	Tỷ lệ chết cộng dồn (%)
(NT1) Đối chứng	3.0 <sup>b</sup>	12.0 <sup>c</sup>	80.0 <sup>c</sup>	20.0 <sup>b</sup>	22 <sup>b</sup>
(NT2) Ampicillin	2.6 <sup>bc</sup>	12.3 <sup>bc</sup>	82.3 <sup>bc</sup>	17.3 <sup>bc</sup>	18 <sup>bc</sup>
(NT3) Erythromycin	2.0 <sup>c</sup>	13.0 <sup>b</sup>	87.0 <sup>b</sup>	13.0 <sup>c</sup>	16 <sup>c</sup>
(NT4) chiết xuất TD1	1.0 <sup>d</sup>	14.0 <sup>a</sup>	93.0 <sup>a</sup>	7.0 <sup>d</sup>	9 <sup>d</sup>
(NT5) Gây nhiễm - TACN	4.0 <sup>a</sup>	11.0 <sup>d</sup>	73.0 <sup>d</sup>	27.0 <sup>a</sup>	29 <sup>a</sup>

NT1 đối chứng và cho ăn thức ăn thương mại; NT2 và NT3 gây nhiễm và cho ăn thức ăn bổ sung kháng sinh ampicillin và erythromycin; NT4 gây nhiễm và cho ăn thức ăn bổ sung 1% TD1 chiết xuất; NT5 gây nhiễm và cho ăn thức ăn thương mại.

Đánh giá hiệu quả của các chiết xuất thực vật trong việc bảo vệ cá bị nhiễm sẵn vi khuẩn, thử nghiệm cá bệnh gây nhiễm nhân tạo và cho ăn thức ăn bổ sung thêm chiết xuất TD1 1% và kháng sinh ampicillin, erythromycin, thức ăn thương mại thể hiện trong **Hình 3** và **Bảng 2** thể hiện, các loại thức ăn của từng nghiệm thức đều ảnh hưởng tỷ lệ sống của cá rô đồng dưới tác nhân gây chết cá từ vi khuẩn *K. sacchari*. Nghiệm thức cá cho ăn thức ăn bổ sung chiết xuất TD1 1% (NT4) đạt tỷ lệ sống sót của cá cao nhất 93%, và nghiệm thức cá cho ăn thức ăn thương mại

gây nhiễm vi khuẩn *K. sacchari* (NT5) chỉ có 73%. Các nghiệm thức cá cho ăn thức ăn đối chứng (NT1) và cá cho ăn thức ăn sử dụng thêm kháng sinh ampicillin (NT2), và erythromycin (NT3) có tỷ lệ cá sống lần lượt 80%, 82.3%, và 87%. Từ nghiệm thức đối chứng (NT1) và nghiệm thức cho ăn thức ăn thương mại gây nhiễm vi khuẩn *K. sacchari* gây bệnh (NT5) có tỷ lệ sống thấp nhất (73% - 80%) so sánh với các nghiệm thức cá cho thức ăn bổ sung chất kháng khuẩn là kháng sinh và chiết xuất TD1 1% (NT2, NT3, và NT4) chứng tỏ, không sử dụng các chất phòng và trị bệnh, cá bị nhiễm bệnh cao. Nghiệm thức cá cho ăn thức ăn phối trộn chiết xuất TD1 1% (NT4) có tỷ lệ sống ở mức cao nhất 93% và sự khác biệt trong nghiệm thức có ý nghĩa thống kê ( $p < 0.05$ ) khi so sánh với nghiệm thức gây nhiễm và cho ăn thức ăn bổ sung kháng sinh (NT2, NT3). Qua đó, tiềm năng kháng khuẩn của các loại cây dược liệu trong việc điều trị cá nhiễm vi khuẩn gây bệnh được thể hiện, chiết xuất TD1 1% được đánh giá cao trong thử nghiệm này, có khả năng bảo vệ cá khỏi vi khuẩn gây bệnh.



**Hình 3.** Tỷ lệ sống (%) trong thử nghiệm cá gây chết nhân tạo đánh giá tiềm năng hoạt tính của TD1 khi phối trộn vào thức ăn (NT1 đối chứng và cho ăn thức ăn thương mại; NT2 và NT3 gây nhiễm và cho ăn thức ăn bổ sung kháng sinh ampicillin và erythromycin; NT4 gây nhiễm và cho ăn thức ăn bổ sung 1% TD chiết xuất; NT5 gây nhiễm và cho ăn thức ăn thương mại)

Ngoài ra, mức độ nhạy cảm với kháng sinh và chiết xuất TD1 của vi khuẩn được tái phân lập từ mô nội tạng (thận) của cá chết ở nghiệm thức đối chứng cũng được kiểm tra, phù hợp với kết quả cá sống ở nghiệm thức cá ăn có bổ sung thêm kháng sinh, các vi khuẩn tái phân lập từ cá chết tự nhiên cho thấy chúng kháng lại với các loại kháng sinh như erythromycin, ampicillin nhưng có vòng kháng khuẩn thể hiện nhạy cảm với chiết xuất TD1 (**Hình 3**). Các công bố trong nước về việc phối trộn các chiết xuất tự nhiên vào thức ăn thủy sản cụ thể là năm 2012, nghiên cứu ảnh hưởng của dịch chiết từ nấm Linh Chi lên tăng trưởng và tỷ lệ sống của cá rô đầu vuông giai đoạn cá. Thử nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên có bổ sung dịch chiết nấm Linh Chi với liều lượng khác nhau: 2 ml/kg thức ăn (NT2), 4 ml/kg thức ăn (NT3), 6 ml/kg thức ăn (NT4), 8 ml/kg thức ăn (NT5), 10 ml/kg thức ăn (NT6), mỗi nghiệm thức được lặp lại ba lần. Kết quả thu được, tỷ lệ sống của cá rô đầu vuông ở nghiệm thức đối chứng bằng (48.3%) thấp hơn so với NT2 (60.8%), NT3 (58.3%), NT4 (75%), NT5 (85%), NT6 (76.6%). Tỷ lệ sống của cá rô đầu vuông ở NT5 bằng (85%) khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0.05$ ) so với nghiệm thức đối chứng, NT2,

NT3. Như vậy, khi bổ sung dịch chiết từ nấm Linh chi vào thức ăn với liều lượng 8 ml/kg thức ăn có tác dụng làm tăng tỷ lệ sống và tốc độ tăng trưởng của cá rô đầu vuông giai đoạn cá giống là tốt nhất (Ho & Nguyen, 2012). Kết quả cho thấy, chiết xuất thực vật chiết xuất TD1 1% có tiềm năng sử dụng để bảo vệ cá khỏi các tác nhân gây bệnh nhân tạo.

### 3.3.2. Mức tăng trọng của cá Rô đồng khởi tác nhân gây chết nhân tạo

Hoạt tính của EtOH từ lá cây Điều (chiết xuất TD1, 1%) bảo vệ cá khỏi các tác nhân gây chết tự nhiên và ghi nhận mức tăng trọng của cá Rô đồng trong **Bảng 3**.

**Bảng 3**

Mức tăng trọng của cá Rô đồng khởi các tác nhân gây chết nhân tạo

Nghiệm thức	Trọng lượng trung bình của cá (g)		Mức tăng trọng (g)
	Trước thử nghiệm (g)	Sau thử nghiệm (g)	
(NT1) Đối chứng	70	83.4 <sup>c</sup>	13.4 <sup>c</sup>
(NT2) Ampicillin	70	86.4 <sup>b</sup>	16.4 <sup>b</sup>
(NT3) Erythromycin	70	87.7 <sup>b</sup>	17.7 <sup>b</sup>
(NT4) chiết xuất TD1 1%	70	92,8 <sup>a</sup>	22.8 <sup>a</sup>
(NT5) Gây nhiễm - TACN	70	79.1 <sup>d</sup>	9.1 <sup>d</sup>

NT1 đối chứng và cho ăn thức ăn thương mại; NT2 và NT3 gây nhiễm và cho ăn thức ăn có bổ sung kháng sinh ampicillin và erythromycin; NT4 gây nhiễm và cho ăn thức ăn bổ sung thêm 1% TD1 chiết xuất; NT5 gây nhiễm và sử dụng thức ăn thương mại.

Bảng 3 thể hiện, các loại thức ăn của từng nghiệm thức đều xuất hiện sự ảnh hưởng lên mức tăng trọng của cá Rô đồng dưới tác nhân gây chết cá từ vi khuẩn *K. sacchari*. Nghiệm thức cho ăn thức ăn bổ sung chiết xuất TD1 1% và gây nhiễm vi khuẩn *K. sacchari* (NT4) cho mức tăng trọng cao nhất 22.8g và nghiệm thức cá cho ăn thức ăn thương mại gây nhiễm vi khuẩn *K. sacchari* (NT5) chỉ đạt 9.1g. Các nghiệm thức đối chứng cá cho ăn thức ăn thương mại (NT1), nghiệm thức cá cho ăn thức ăn bổ sung kháng sinh ampicillin và erythromycin (NT2, và NT3) có mức tăng trọng lần lượt là 13.4g, 16.4g và 17.8g. Ở nghiệm thức cá cho ăn thức ăn thương mại và lây nhiễm vi khuẩn *K. sacchari* (NT5) chỉ đạt mức tăng trọng 9.1g cho thấy, khi không sử dụng các chất kháng khuẩn, cá bị vi khuẩn *K. sacchari* tấn công, dẫn đến tình trạng cá chết nhiều. Nghiệm thức đối chứng (NT1) và nghiệm thức cá cho ăn thức ăn thương mại gây nhiễm vi khuẩn *K. sacchari* (NT5) so với nghiệm thức gây nhiễm và cho ăn thức ăn bổ sung kháng sinh và chiết xuất TD1 1% (NT2, NT3, NT4), khác biệt về ý nghĩa thống kê ( $p < 0.05$ ), cho thấy mức độ tăng trọng của cá Rô đồng chịu tác động của các chất kháng khuẩn là kháng sinh và chiết xuất TD1 1%. Bên cạnh đó, nhóm gây nhiễm cá cho ăn thức ăn phối trộn TD1 chiết xuất TD1 1% (NT4) có mức tăng trọng cao nhất 22.8g khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0.05$ ) so với nghiệm thức cá cho ăn thức ăn bổ sung ampicillin và erythromycin (NT2, và NT3), nhận thấy khi cá cho ăn thức ăn bổ sung thêm chiết xuất TD1 1% có thể được mức tăng trọng cao hơn các loại chất kháng sinh.

## 4. Kết luận

Từ nguồn dược liệu bao gồm lá cây Điều TD1 (*A. occidentale*), cây Ngũ Trảo TD2 (*V. negundo*), cây Bình Linh Xoan TD3 (*V. rotundifolia*), Ráng TD4 (*A. aureum*) và Vằng Sẻ TD5 (*J. subtripplinerve*), nghiên cứu thu nhận được chiết xuất EtOH từ lá cây Điều TD1 có giá trị kháng khuẩn tốt nhất đạt ngưỡng MIC 12.5 µg/ml được chọn để thực hiện thử nghiệm khảo sát trên mô

hình cá được gây nhiễm vi khuẩn *K. sacchari* đa kháng kháng sinh có nồng độ LD<sub>50</sub> đạt  $3.16 \times 10^4$ . Kết quả thử nghiệm cho thấy, thức ăn bổ sung chiết xuất EtOH từ lá cây Điều TD1 1% có tác dụng bảo vệ cá khỏi tác nhân gây chết nhân tạo và làm tăng trọng lượng của cá sau khi nuôi 20 ngày thử nghiệm. Điều này chứng tỏ, dược chất tự nhiên khi phối trộn vào thức ăn dùng cho thủy sản có tiềm năng thay thế cho các loại chất kháng sinh thương mại đang sử dụng trên thị trường và là một nguồn nguyên liệu sẵn có phong phú hướng đến tương lai sản xuất an toàn, bảo vệ cho sức khỏe người chăn nuôi và người tiêu dùng, đảm bảo cho việc phát triển bền vững và thân thiện với môi trường. Từ đó, các định hướng tiếp theo sẽ nghiên cứu sâu hơn về khả năng hỗ trợ kháng khuẩn khi phối trộn vào thức ăn của chiết xuất TD1 1% và sử dụng trên quy mô mô hình pilot với số lượng cá lớn hơn để làm bước tiền cho việc ứng dụng sử dụng vào ao nuôi quy mô lớn.

## LỜI CẢM ƠN

Chân thành cảm ơn Quỹ nghiên cứu đề tài Khoa học và Công nghệ cấp cơ sở Trường đại học Nguyễn Tất Thành tài trợ cho nghiên cứu này với mã số 2022.01.123/HĐ-KHCN.

## Tài liệu tham khảo

- Abdel-Latif, H. M., Ahmed, H. A., Shukry, M., Chaklader, M. R., Saleh, R. M., & Khallaf, M. A. (2022). Astragalus Membranaceus Extract (AME) enhances growth, digestive enzymes, antioxidant capacity, and immunity of *Pangasianodon hypophthalmus* juveniles. *Fishes*, 7(6), 319-337.
- Bansod, M. S., & Harle, U. N. (2009). *Vitex negundo* L: Phytochemical constituents, traditional uses and pharmacological properties: Comprehensive review. *Pharmacologyonline Newsletter*, 1, 286-302.
- Bauer, A. W., Perry, D. M., & Kirby, W. M. (1959). Single-disk antibiotic-sensitivity testing of staphylococci: An analysis of technique and results. *AMA Archives of Internal Medicine*, 104(2), 208-216.
- Bernal, R. A. D., Aya, F. A., De Jesus-Ayson, E. G. T., & Garcia, L. M. B. (2015). Seasonal gonad cycle of the climbing perch *Anabas testudineus* (Teleostei: Anabantidae) in a tropical wetland. *Ichthyological Research*, 62(4), 389-395.
- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8(7), 1137-1144.
- Chan, E. W. C., Wong, S. K., & Chan, H. T. (2018). Casticin from *Vitex* species: A short review on its anticancer and anti-inflammatory properties. *Journal of Integrative Medicine*, 16(3), 147-152.
- Chen, M., Zhu, B., Lin, L., Yang, L., Li, Y., & An, Q. (2014). Complete genome sequence of *Kosakonia sacchari* type strain SPI<sup>T</sup>. *Standards in Genomic Sciences*, 9, 1311-1318.
- Crumlish, M., Pham, T. C., Koesling, J., Vo, T. T., & Gravingen, K. (2010). Experimental challenge studies in Vietnamese catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage), exposed to *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases*, 33(9), 717-722.
- Dai, N. H., Ho, H. T. C., Le, H. M., Poul, E. H., & Ole, V. (2008). Bioactivities and chemical constituents of a Vietnamese medicinal plant Che Vang, *Jasminum subtriplinerve* Blume (Oleaceae). *Natural Product Research*, 22(11), 942-949.

- Dang, O. T. H., & Nguyen, T. P. (2009). Độc lực của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* phân lập từ cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bị bệnh mũ gan [Virulence of *Edwardsiella ictaluri* bacteria isolated from pangasius (*Pangasianodon hypophthalmus*) with pyogenic liver disease]. *Tạp chí Nông Nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 12, 64-70.
- Dang, O. T. H., Tran, Q. N., & Nguyen, H. D. (2012). Phân lập và xác định khả năng gây bệnh xuất huyết trên cá rô đồng (*Anabas testudineus*) của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* [Isolation and determination of hemorrhagic disease in perch (*Anabas testudineus*) of *Streptococcus agalactiae*]. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 22c, 194-202.
- Duong, Y. T., Duong, L. N., & Tran, P. T. (2014). Ảnh hưởng của tuổi và kích cỡ cá bố mẹ chọn lọc lên sinh trưởng của cá rô đầu vuông (*Anabas testudineus*) giai đoạn từ cá bột lên cá giống [Effect of age and size of selected broodstock on growth of square-headed perch (*Anabas testudineus*) from fry to fingerlings]. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 2014(1), 92-100.
- Food & Agriculture Organization of the United States (FAO). (2003). *FAO Rome Italy*. Truy cập ngày 22/11/2022 tại <https://www.fao.org/3/bq500e/bq500e.pdf>
- Hamid, N. K. A., Somdare, P. O., Harashid, K. A. M., Othman, N. A., Kari, Z. A., Wei, L. S., & Dawood, M. A. (2022). Effect of papaya (*Carica papaya*) leaf extract as dietary growth promoter supplement in red hybrid tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*) diet. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(5), 3911-3917.
- Haque, S., Bandyopadhyay, P. K., & Mondal, K. (2020). Studies on growth, behavior and blood profile in *Anabas testudineus* infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the Zoological Society*, 74, 19-27.
- Harikrishnan, R., Kim, J. S., Balasundaram, C., & Heo, M. S. (2012). Protection of *Vibrio harveyi* infection through dietary administration of *Pueraria thunbergiana* in kelp grouper, *Epinephelus bruneus*. *Aquaculture*, 324, 27-32.
- Himejima, M., & Kubo, I. (1991). Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(2), 418-421.
- Ho, N. T. B., & Nguyen, T. T. (2012). Ảnh hưởng của dịch chiết nấm linh chi (*Ganoderma lucidum*) lên tăng trưởng và tỷ lệ sống của cá rô đầu vuông (*Anabas* sp.) [Effect of *Ganoderma lucidum* extract on growth and survival rate of square-headed perch (*Anabas* sp.)]. *Hue University Journal of Science: Agriculture and Rural Development*, 79(1), 13-16.
- Kim, D. K. (2009). Antioxidative constituents from the twigs of *Vitex rotundifolia*. *Biomolecules & Therapeutics*, 17(4), 412-417.
- Li, C., Beck, B., Su, B., Terhune, J., & Peatman, E. (2013). Early mucosal responses in blue catfish (*Ictalurus furcatus*) skin to *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 34(3), 920-928.
- Lopes, C. L., Pereira, E., Soković, M., Carvalho, A. M., Barata, A. M., Lopes, V., ... Ferreira, I. C. F. R. (2018). Phenolic composition and bioactivity of *lavandula pedunculata* (Mill.) Cav. Samples from different geographical origin. *Molecules*, 23(5), 1037-1056.
- Luong, K. N., Doan, P. M., & Nguyen, T. V. (2017). *Hướng dẫn thực hành kỹ thuật xét nghiệm vi sinh lâm sàng [Practical guide to clinical microbiology testing techniques]*. Hà Nội, Việt Nam: NXB Y học.

- Luong, N. T. M., Moon, J. K., Kim, J. H., Shibamoto, T., & Ahn, Y. J. (2012). Growth-inhibiting effects of *Paeonia lactiflora* root steam distillate constituents and structurally related compounds on human intestinal bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1575-1583.
- Luu, Q. H., Nguyen, T. B. T., Nguyen, T. L. A., Do, T. T. T., Dao, T. H. T., & Padungtod, P. (2021). Antibiotics use in fish and shrimp farms in Vietnam. *Aquaculture Reports*, 20, 100711-100719.
- Ly, L. T. T., Nguyen, D. N., Vo, P. H., & Doan, C. V. (2009). Hemorrhage Disease of Cultured Catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Mekong Delta (Vietnam). *The Israeli Journal of Aquaculture*, 61(1/4), 215-224.
- Mai, Y. D. (1978). *Định loại cá nước ngọt miền Bắc Việt Nam [Identification of freshwater fish in the North of Vietnam]*. Hà Nội, Việt Nam: NXB Khoa học và Kỹ thuật.
- Mandal, B., Kumar, R., & Jayasankar, P. (2016). Efficacy of exogenous hormone (GnRH $\alpha$ ) for induced breeding of climbing perch *Anabas testudineus* (Bloch, 1792) and influence of operational sex ratio on spawning success. *Animal Reproduction Science*, 171, 114-120.
- Martin, G. B., & Ferasyi, T. R. (2016). 1. Clean, Green, Ethical (CGE) Management: What research do we really need. *The International Journal of Tropical Veterinary and Biomedical Research*, 1(1), 1-8.
- Nguyen, T. H. (2004). *Hướng dẫn kỹ thuật nuôi cá nước ngọt [Technical guide to freshwater fish farming]*. Hà Nội, Việt Nam: NXB Lao Động.
- Nguyen, L. T., Tran, C. K., Nguyen, N. T. T., Nguyen, L. P. H., Tran, N. T., Mai, H. T. N., & Pham, H. T. H. (2021). Identification of multi-antibiotic resistant bacteria isolated from Vietnamese climbing perch (*Anabas testudineus*) on fish farms in Ho Chi Minh City, Vietnam. *In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 947(1), 012036-012044.
- Pham, Y. T. H., Do, N. M., Huynh, V. V., & Tran, V. Q. K. (2013). Nghiên cứu độc lực của vi khuẩn *Aeromonas* sp. trên cá rô phi vằn (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) và tác dụng của vacxin bất hoạt trong phòng trị bệnh [The virulence of *Aeromonas* sp. on tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) and the effect of inactivated vaccine in the prevention and treatment of disease]. *Kỷ yếu hội nghị khoa học trẻ thủy sản toàn quốc lần thứ 4, khoa Thủy sản, Đại học Nông Lâm TP.HCM*, 453-464.
- Piwpong, N., Chiayvareesajja, J., & Chiayvareesajja, S. (2016). Growth and survival of a diallel cross for five strains of climbing perch (*Anabas testudineus* Bloch, 1792) in Thailand. *Agriculture and Natural Resources*, 50(5), 351-356.
- Rainboth, W. J. (1996). *Fishes of the Cambodian Mekong*. Rome: Food & Agriculture Organization of the United States.
- Ramakrishnan, M. A. (2016). Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World Journal of Virology*, 5(2), Article 85.
- Rao, Y. V., Das, B., Jyotirmayee, P., & Chakrabarti, R. (2006). Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(3), 263-273.
- Reddy, P. R. K., Elghandour, M. M. M. Y., Salem, A. Z. M., Yayaswini, D., Reddy, P. P. R., Reddy, A. N., & Hyder, I. (2020). Plant secondary metabolites as feed additives in calves for antimicrobial stewardship. *Animal Feed Science and Technology*, 264, 114469-114488.

- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 27(3), 493-497.
- Schiller, H., Young, C., Schulze, S., Tripepi, M., & Pohlschroder, M. (2022). A twist to the Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test: An accessible laboratory experiment comparing *Haloflex volcanii* and *Escherichia coli* antibiotic susceptibility to highlight the unique cell biology of archaea. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 23(1), Article e00234-21.
- Souto, E. B., Durazzo, A., Nazhand, A., Lucarini, M., Zaccardelli, M., Souto, S. B., ... Santini, A. (2020). *Vitex agnus-castus* L.: Main features and nutraceutical perspectives. *Forests*, 11(7), Article 761.
- Thomas, T. (2012). *In vitro* evaluation of antibacterial activity of *Acrostichum aureum* Linn. *NIScPR Online Periodicals Repository*, 3(1), 135-138.
- Trieu, H. T. T., Nguyen, T. C., Cao, D. T., & Le, V. T. T. (2018). Khả năng kháng một số loài vi khuẩn gây bệnh trên động vật thủy sản của dịch trích từ lá và hạt cây trâm bầu (*Combretum quadrangulare*) trong điều kiện *in vitro* [Resistance against some bacterial species causing diseases in aquatic animals of extracts from leaves and seeds of *Combretum quadrangulare* under *in vitro* conditions]. *Can Tho University-Journal of Science*, 54(2), 151-157.
- Truong, K. T., & Tran, H. T. T. (1993). *Định loại các loài cá nước ngọt vùng đồng bằng sông Cửu Long* [Identification of freshwater fish species in the Mekong Delta]. Cần Thơ, Việt Nam: Đại học Cần Thơ.
- Tu, D. T., Huynh, T. T. N., & Nguyen, K. D. (2013). *Streptococcus iniae*, tác nhân gây bệnh “đen thân” trên cá rô đồng (*Anabas testudineus*) [*Streptococcus iniae*, the causative agent of “black body” disease in perch (*Anabas testudineus*)]. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 26, 96-103.
- Tu, D. T., Nguyen, N. T. N., Nguyen, T. Q., Dang, T. T. M., Nguyen, T. A., Shinn, A., & Crumlish, M. (2008). Common diseases of Pangasius Catfish farmed in Vietnam. *Global Aquaculture Advocate*, 11(4), 76-77.
- Uddin, S., Hasan, M. H., Iqbal, M. M., & Hossain, M. A. (2017). Study on the reproductive biology of Vietnamese climbing perch (*Anabas testudineus*, Bloch). *Journal of Chemical Information and Modeling*, 32(1), 1-7.
- Valgas, C., Souza, S. M. de, Smania, E. F. A., & Smania, A., Jr. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 369-380.
- Van Meervenne, E., Van Coillie, E., Kerckhof, F. M., Devlieghere, F., Herman, L., De Gelder, L. S., & Boon, N. (2012). Strain-specific transfer of antibiotic resistance from an environmental plasmid to foodborne pathogens. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1-8.
- Verma, R. K., Kumari, P., Maurya, R. K., Kumar, V., Verma, R. B., & Singh, R. K. (2018). Medicinal properties of turmeric (*Curcuma longa* L.): A review. *International Journal of Chemical Studies*, 6(4), 1354-1357.

