

NGHIÊN CỨU HIỆU QUẢ SỬ DỤNG CÁC LOẠI CAO THẢO DƯỢC ĐỂ PHÒNG VÀ TRỊ BỆNH DO VI KHUẨN *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* GÂY RA TRÊN CÁ RÔ PHI (*OREOCHROMIS SP.*)

Nguyễn Ngọc Phước*, Nguyễn Thị Xuân Hồng,
Nguyễn Thị Huệ Linh, Nguyễn Đức Quỳnh Anh

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

*Tác giả liên hệ email: nguyennngocphuoc@hueuni.edu.vn

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá ảnh hưởng của 4 loại cao chiết: xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*), kinh giới (*Elsholtzia ciliata*), tía tô (*Perilla frutescens*) và cỏ mực (*Eclipta prostrata*) bằng dung môi methanol, bổ sung vào thức ăn đến khả năng phòng và trị bệnh do *Streptococcus agalactiae* gây ra trên cá rô phi (*Oreochromis sp.*). Những chủng vi khuẩn *S. agalactiae* dùng trong nghiên cứu này đã được phân lập từ cá rô phi nhiễm bệnh ở tỉnh Đồng Tháp (kiểu huyết thanh III) và ở tỉnh Thừa Thiên-Huế (kiểu huyết thanh Ib). Cao chiết thảo dược được bổ sung riêng biệt vào mỗi kg thức ăn với các tỷ lệ 156 mg (xuyên tâm liên), 1.250 mg (kinh giới), 2.500 mg (tía tô) và 2.500 mg (cỏ mực). Cá thí nghiệm được gây cảm nhiễm bệnh bằng phương pháp tiêm xoang bụng với 0,1 mL vi khuẩn *S. agalactiae* kiểu huyết thanh III hoặc Ib với mật độ là 10^4 CFU/mL. Kết quả nghiên cứu cho thấy, việc bổ sung cao chiết các loại thảo dược nêu trên vào thức ăn đã cho hiệu quả phòng bệnh cao đặc biệt là khi tăng tần suất cho ăn hai lần/tuần. Cao chiết xuyên tâm liên, tía tô và cỏ mực là loại cao thảo dược tiềm năng có thể sử dụng trong phòng và trị bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi.

Từ khoá: *Andrographis paniculata*, *Elsholtzia ciliata*, *Perilla frutescens*, *Eclipta prostrata*, *Oreochromis sp.*, *Streptococcus agalactiae*.

Study on the effect of herbal extracts on the prevention and treatment of disease caused by *Streptococcus agalactiae* in tilapia (*Oreochromis sp.*)

Nguyen Ngoc Phuoc, Nguyen Thi Xuan Hong,
Nguyen Thi Hue Linh, Nguyen Duc Quynh Anh

SUMMARY

This study was conducted to evaluate the effect of herbal extracts in methanol from bitterweed (*Andrographis paniculata*), lemon balm (*Elsholtzia ciliata*), perilla (*Perilla frutescens*) and white elicta (*Eclipta prostrata*), these herbal extracts were mixed into feed for prevention and treatment of *Streptococcus agalactiae* infection in tilapia (*Oreochromis sp.*). This bacteria strain was isolated from the infected tilapia in Dong Thap (serotype III) and in Thua Thien-Hue province (serotype Ib) used in this study. Bitterweed (*Andrographis paniculata*), lemon balm (*Elsholtzia ciliata*), perilla (*Perilla frutescens*) and white elicta (*Eclipta prostrata*) extracts were mixed separately into feed with doses of 156 mg bitterweed; 1,250 mg lemon balm; 2,500 mg perilla and 2,500 mg white elicta per one kg feed. Fish were infected experimentally by intraperitoneal injection with 0.1 mL of 10^4 CFU/mL of *S. agalactiae* serotype III or serotype Ib. The studied results showed that the above herbal extracts proved the high prevention of *S. agalactiae* infection in tilapia, especially when increasing the feeding rhythm twice per week. The extract of bitterweed, perilla or white elicta can be considered as potential herbal extracst for the prevention and treatment of disease caused by *S. agalactiae* in tilapia.

Keywords: *Andrographis paniculata*, *Elsholtzia ciliata*, *Perilla frutescens*, *Eclipta prostrata*, *Oreochromis sp.*, *Streptococcus agalactiae*.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá rô phi (*Oreochromis sp.*) là đối tượng nuôi phổ biến và xếp thứ hai trên thế giới, chỉ sau những loài cá chép (Fitzsimmons, 2004). Tại Việt Nam, cá rô phi được nuôi ở cả ba miền Bắc, Trung và Nam Bộ với sản lượng cao thứ hai (sau cá tra) và đã được Thủ tướng Chính phủ đưa vào quyết định “Ban hành Chương trình quốc gia phát triển nuôi trồng thủy sản giai đoạn 2021-2030” để sản xuất hàng hoá cho tiêu thụ nội địa và xuất khẩu (Quyết định số 985/QĐ-TTg). Thách thức lớn nhất cho việc phát triển nghề nuôi cá rô phi trong những năm gần đây là dịch bệnh do vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) gây ra và có thể gây tỷ lệ chết lên đến 60 -70% trong vòng 5 - 7 ngày, đưa đến thiệt hại kinh tế nặng nề cho người nuôi (Nguyễn Ngọc Phước và cs., 2019). Trong các năm gần đây, Việt Nam ghi nhận các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi chủ yếu thuộc kiểu huyết thanh III ở đồng bằng sông Cửu Long và kiểu huyết thanh Ib ở Thừa Thiên-Huế (Phuoc *et al.*, 2021; FAO, 2021). Đặc biệt, các nghiên cứu gần đây cũng chỉ ra rằng *S. agalactiae* kiểu huyết thanh III không những gây bệnh trên cá rô phi mà còn gây bệnh trên người (FAO, 2021; Siriminapong *et al.*, 2023). Kháng sinh thường được sử dụng để phòng và trị bệnh do vi khuẩn gây ra trên động vật thủy sản, tuy nhiên việc sử dụng kháng sinh có thể gây ra hiện tượng kháng kháng sinh, ô nhiễm môi trường và mất vệ sinh an toàn thực phẩm (Novais *et al.*, 2018). Nhiều nghiên cứu về việc sử dụng các chất sinh học nhằm thay thế kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản đã được tiến hành. Trong đó, việc sử dụng thảo dược nhằm đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm, thân thiện với môi trường là xu thế đang được nghiên cứu trong nuôi trồng thủy sản hiện nay (Zhu, 2020; Li *et al.*, 2022). Khả năng kháng các loại vi khuẩn gây bệnh trên các đối tượng thủy sản từ dịch chiết của các loại thảo dược như: vỏ quế (*Cinnamomum verum*) (Nguyễn Thị Trúc Quyên và cs., 2019), cây xoan (*Melia azedarach* L), sài đất (*Wedelia chinensis*), tỏi (*Allium sativum* L.), xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*), cỏ mực (*Eclipta alba* Hassk), trám bầu (*Combretum quadrangulare*) đã được nghiên cứu trong điều kiện *in vitro* (Trương Thị Mỹ Hạnh và cs., 2017; Hoàng Mộng Huyền và

cs., 2020; Châu Thuý Phương và cs., 2023) hay *in vivo* (Nguyễn Thị Trúc Quyên và cs., 2023; Trần Nguyễn Ngọc và cs., 2023).

Kết quả nghiên cứu của Châu Thuý Phương và cs. (2023) đã xác định cao chiết 4 loại thảo dược gồm tía tô (*Perilla frutescens*), kinh giới (*Elsholtzia ciliata*), xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*), cỏ mực (*Eclipta prostrata*) trong dung môi methanol có khả năng đối kháng mạnh với vi khuẩn *S. agalactiae* ở cả hai kiểu huyết thanh III và Ib gây bệnh lồi mắt, xuất huyết trên cá rô phi và cũng đã xác định được ngưỡng an toàn của 4 loại cao chiết thảo dược này trên cá. Vì vậy trong nghiên cứu này, 4 loại cao chiết thảo dược trên được sử dụng để đánh giá khả năng phòng và trị bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi. Nghiên cứu được tiến hành từ ngày 1 tháng 3 đến 31 tháng 7 năm 2023 tại Khoa Thủy sản, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Nguồn vi khuẩn

Chủng vi khuẩn *S. agalactiae* phân lập từ cá rô phi bị bệnh lồi mắt, xuất huyết tại Đồng Tháp (thuộc Sequence Type (ST) 283, kiểu huyết thanh III), và Thừa Thiên-Huế (ST 1395, kiểu huyết thanh Ib) được cung cấp từ phòng thí nghiệm Bệnh thủy sản, Khoa Thủy sản, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế (Phuoc *et al.*, 2021). Mẫu vi khuẩn được phục hồi trên môi trường Tryptic Soy agar (TSA, Himedia, Ấn Độ) và nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C từ 18 đến 24 giờ sau thời gian bảo quản trong dung dịch glycerol 15% ở nhiệt độ -20°C. Sau đó, chủng vi khuẩn thí nghiệm được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường Tryptic Soy Broth (TSB, Himedia, Ấn Độ) và đặt trong tủ ấm (GFL 3032, Đức) ở 28°C với tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 24 giờ. Mật độ vi khuẩn được xác định theo phương pháp đo mật độ quang học (Optical density- OD) ở bước sóng 600 nm trên máy quang phổ UV-VIS (U2900, Hitachi, Nhật Bản) và được pha loãng về giá trị OD=1 (tương đương mật độ vi khuẩn là 10⁸ CFU/mL). Mật độ vi khuẩn sau đó được pha loãng về 10⁶ CFU/mL (là liều LD₅₀ được xác định từ nghiên cứu

của Phuoc *et al.*, 2021) để gây bệnh thực nghiệm cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.1.2. Cá thí nghiệm

Cá rô phi (*Oreochromis* sp.) có kích cỡ trung bình từ 8-10 g được mua từ Trung tâm giống Thủy sản Thừa Thiên-Huế và được nuôi cách ly ở trong bể composite 1.000L tại phòng thí nghiệm Bệnh thủy sản, Khoa Thủy sản, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế trong 14 ngày (hình 1). Cá thí nghiệm được cho ăn bằng thức ăn Cargill 7414 (Việt Nam) hai lần/ngày ở mức 3% khối lượng thân vào lúc 8 giờ sáng và 2 giờ chiều. Sục khí liên tục 24 giờ/ngày. Trước khi bố trí thí nghiệm, đàn cá được đảm bảo không có sự hiện diện vi khuẩn *S. agalactiae* bằng cách cấy trực tiếp mẫu mô lấy từ não của 5 cá ngẫu nhiên lên môi trường TSA và ủ ở nhiệt độ 28°C trong 24 giờ để kiểm tra sự phát triển của vi khuẩn (Phuoc *et al.*, 2021).



Hình 1. Cá rô phi được nuôi cách ly trước khi thí nghiệm

2.1.3. Nguồn cao chiết

Cao chiết 4 loại thảo dược: tía tô, kinh giới, xuyên tâm liên, cỏ mực cho thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vào thức ăn lên khả năng phòng, trị bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi được chiết xuất bằng phương pháp tách chiết với dung môi là methanol 99,8% theo mô tả của Châu Thủy Phương và cs. (2023).

Các loại thảo dược được thu gom nguyên cây ở Thừa Thiên-Huế, được đem về phòng thí nghiệm, sau đó đưa đi rửa sạch với nước và thu lá cắt nhỏ và sấy khô ở nhiệt độ 60-70°C trong 6 giờ trước

khi chiết xuất cao chiết. Nghiền nhỏ riêng từng loại thảo dược khô bằng máy xay sinh tố đa năng Philips HR2221/00 (Hà Lan). Cân mỗi loại thảo dược 100g và trộn với dung môi methanol 99,8% với tỷ lệ 1:10 (tương đương 100 g thảo dược và 1.000 mL dung môi). Sau đó đem chưng cách thủy ở nhiệt độ 60-70°C trong vòng 120 phút, lọc để loại bỏ phần bã thảo dược. Dịch chiết được cô quay ở nhiệt độ 60°C, áp suất chân không để loại bỏ hết dung môi, sau đó cho nước cất đủ 200 mL (bằng 1/5 thể tích ban đầu) thu được cao chiết thí nghiệm.

2.2. Chuẩn bị thức ăn thí nghiệm

Cao chiết các loại thảo dược được phun và trộn đều lên thức ăn viên cho cá rô phi (thức ăn Cargill 7414) theo các tỷ lệ 1.250 mg. kg⁻¹ với kinh giới, 2.500 mg. kg⁻¹ với tía tô và 2.500 mg. kg⁻¹ với cỏ mực; đây là các nồng độ tiêu diệt tối thiểu (MBC) theo kết quả nghiên cứu của Châu Thủy Phương và cs. (2023) và an toàn với cá. Riêng với xuyên tâm liên, chúng tôi sử dụng ½ nồng độ MBC (156 mg/kg), do khi sử dụng nồng độ MBC trộn vào thức ăn thì vị đắng của xuyên tâm liên dẫn đến cá không bắt mồi. Thức ăn sau khi trộn với thảo dược được để khô tự nhiên trong vòng 4 giờ, sau đó được phủ 1% dầu mực trong 15 phút bằng máy trộn để kích thích cá bắt mồi và hạn chế sự hoà tan của thảo dược vào nước khi cho ăn và tiếp tục để khô tự nhiên trong 8 giờ ở nhiệt độ phòng. Thức ăn được bảo quản ở 4°C trong suốt quá trình thí nghiệm.

2.3. Đánh giá khả năng phòng bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi của các loại cao chiết thảo dược

Để đánh giá vai trò của cao chiết các loại thảo dược đến khả năng phòng bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá rô phi, có 2 thí nghiệm được bố trí đồng thời:

Thí nghiệm 1: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 nghiệm thức bao gồm 1 nghiệm thức đối chứng (thức ăn trộn với 1% dầu mực) và 4 nghiệm thức cho ăn thức ăn trộn các loại thảo dược: xuyên tâm liên (nghiệm thức 1), kinh giới (nghiệm thức 2), tía tô (nghiệm thức 3) và cỏ mực (nghiệm thức 4). Mỗi nghiệm thức được bố trí trong bể 120L với 20 cá rô phi giống và được lặp lại 3 lần, tổng cộng có 15 bể (bảng 1).

Bảng 1. Các nghiệm thức của thí nghiệm xác định khả năng phòng bệnh của cao chiết các loại thảo dược

Nghiệm thức	Ký hiệu	Thức ăn	Gây bệnh thực nghiệm
Đối chứng	ĐC	Thức ăn không bổ sung thảo dược	Nhóm 1: 50% cá thí nghiệm các nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn <i>S. agalactiae</i> kiểu huyết thanh III
Bổ sung thảo dược	NT1	Bổ sung cao chiết xuyên tâm liên (156 mg/kg thức ăn)	Nhóm 2: 50% cá thí nghiệm các nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn <i>S. agalactiae</i> kiểu huyết thanh Ib
	NT2	Bổ sung cao chiết kinh giới (1.250 mg/kg thức ăn)	
	NT3	Bổ sung cao chiết tía tô (2.500 mg/kg thức ăn)	
	NT4	Bổ sung cao chiết cỏ mực (2.500 mg/kg thức ăn)	

Cá được cho ăn thức ăn có hoặc không có thảo dược trong 7 ngày liên tục với khẩu phần 3% khối lượng thân, chia thành 2 lần/ngày, nhiệt độ duy trì trong khoảng 28-30°C. Sau 7 ngày, 50% cá mỗi nghiệm thức được cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* ST 283 và 50% cá còn lại được cảm nhiễm *S. agalactiae* ST 1395 bằng phương pháp tiêm vào xoang bụng với liều lượng 0,1mL dung dịch vi khuẩn mật độ 10^6 CFU/mL (liều LD_{50}) (Phuoc *et al.*, 2021) (hình 2). Sau khi cảm nhiễm các nhóm được tách riêng từng bể theo chủng vi khuẩn cảm nhiễm. Tổng cộng có 30 bể cho 2 nhóm. Các chỉ tiêu về chất lượng nước trong hệ thống gồm pH, nhiệt độ được theo dõi 1 lần/ngày vào 8 giờ sáng bằng máy đo pH và nhiệt độ cầm tay (Hanna, Đài Loan); chỉ tiêu DO, NH_3 và NO_2 được đo 2 lần/tuần bằng test kit Serra. Thí nghiệm kết thúc sau khi cảm nhiễm 14 ngày.



Hình 2. Gây bệnh thực nghiệm trên cá bằng phương pháp tiêm

Cá sau khi cảm nhiễm được cho ăn bằng thức ăn bình thường (không có thảo dược) với mức 3% khối lượng thân, 2 lần mỗi ngày. Theo dõi tỷ lệ chết trong 14 ngày.

Thí nghiệm 2: Được bố trí hoàn toàn giống với thí nghiệm 1, tuy nhiên cá được cho ăn thức ăn có chứa cao chiết các loại thảo dược trong 2 đợt, mỗi đợt kéo dài 7 ngày liên tục. Thời gian giữa hai đợt cho ăn thảo dược là 7 ngày, sau đó 50% cá mỗi nghiệm thức được cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* ST 283 và 50% cá còn lại được cảm nhiễm *S. agalactiae* ST 1395 bằng phương pháp tiêm vào xoang bụng với liều lượng 0,1mL dung dịch vi khuẩn mật độ 10^6 CFU/mL (liều LD_{50}). Sau khi cảm nhiễm các nhóm được tách riêng từng bể theo chủng vi khuẩn cảm nhiễm. Tổng cộng có 30 bể cho 2 nhóm. Các chỉ tiêu về chất lượng nước trong hệ thống được theo dõi tương tự thí nghiệm 1. Thí nghiệm kết thúc sau khi cảm nhiễm 14 ngày.

2.4. Đánh giá khả năng trị bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi của các loại cao chiết thảo dược

Thí nghiệm bố trí trên 5 nghiệm thức bao gồm 1 nghiệm thức đối chứng và 4 nghiệm thức thí nghiệm. Mỗi nghiệm thức được bố trí trong bể 120L với 20 cá và được lặp lại 3 lần. Cá sau khi đưa vào các nghiệm thức được cho ăn với thức ăn không có thảo dược trong 7 ngày với liều 3% khối lượng thân, 2 lần mỗi ngày. Sau 7 ngày, cá thí nghiệm được chia làm 2 nhóm gồm: 50% cá mỗi nghiệm thức được cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* ST 283 và 50% cá còn lại được cảm nhiễm *S. agalactiae* ST 1395 bằng

phương pháp tiêm vào xoang bụng với liều lượng 0,1mL dung dịch vi khuẩn mật độ 10^6 CFU/mL (liều LD₅₀). Sau khi cảm nhiễm các nhóm được tách riêng từng bể theo chủng vi khuẩn cảm nhiễm (tổng cộng 30 bể) (bảng 2), cá được cho ăn bằng thức ăn bình thường (không có thảo dược- nghiệm thức đối chứng) hoặc cho ăn thức ăn trộn các loại thảo dược

xuyên tâm liên (nghiệm thức 1), kinh giới (nghiệm thức 2), tía tô (nghiệm thức 3) và cỏ mực (nghiệm thức 4) với liều 3% khối lượng thân trong 7 ngày sau đó cho ăn thức ăn không chứa thảo dược trong 7 ngày tiếp theo. Các chỉ tiêu về chất lượng nước trong hệ thống được theo dõi tương tự thí nghiệm 1. Theo dõi dấu hiệu bệnh lý và tỷ lệ chết trong 14 ngày.

Bảng 2. Nghiệm thức của thí nghiệm xác định khả năng phòng bệnh của cao chiết các loại thảo dược

Nghiệm thức	Ký hiệu	Gây bệnh thực nghiệm	Thức ăn trong 7 ngày sau cảm nhiễm
Đối chứng	ĐC	Sau 7 ngày cho ăn thứ ăn không có bổ sung thảo dược:	Thức ăn không bổ sung thảo dược
Bổ sung thảo dược	NT1	- Nhóm 1: 50% cá thí nghiệm ở các nghiệm thức cảm nhiễm <i>S. agalactiae</i> kiểu huyết thanh III	Bổ sung cao chiết xuyên tâm liên (156 mg/kg thức ăn)
	NT2	- Nhóm 2: 50% cá thí nghiệm ở các nghiệm thức cảm nhiễm <i>S. agalactiae</i> kiểu huyết thanh Ib	Bổ sung cao chiết kinh giới với tỷ lệ (1.250 mg/kg thức ăn)
	NT3		Bổ sung cao chiết tía tô (2.500 mg/kg thức ăn)
	NT4		Bổ sung cao chiết cỏ mực (2.500 mg/kg thức ăn)

Hiệu quả bảo vệ của các loại dịch chiết thảo dược được đánh giá thông qua chỉ số tỷ lệ sống tương đối (RPS) theo công thức của Amend (1981):

$$RPS (\%) = (1 - \frac{\text{Số cá chết ở nghiệm thức thí nghiệm}}{\text{Số cá chết ở nghiệm thức đối chứng}}) \times 100$$

2.5. Xử lý số liệu

Tất cả các số liệu được nhập và lưu trữ bằng Excel. Các số liệu (trừ RPS) được xử lý thống kê

bằng phần mềm SPSS 20.0, trắc nghiệm One-way ANOVA bằng phép thử Tukey với độ tin cậy 95%.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả đánh giá khả năng phòng bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi của các loại cao chiết thảo dược

Trong suốt thời gian thí nghiệm, các yếu tố môi trường nước đều nằm trong khoảng giới hạn phù hợp cho sự phát triển của cá (bảng 3) nên không ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm thảo dược.

Bảng 3. Giá trị các thông số môi trường nước trong thí nghiệm đánh giá khả năng phòng bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi của các loại cao chiết thảo dược

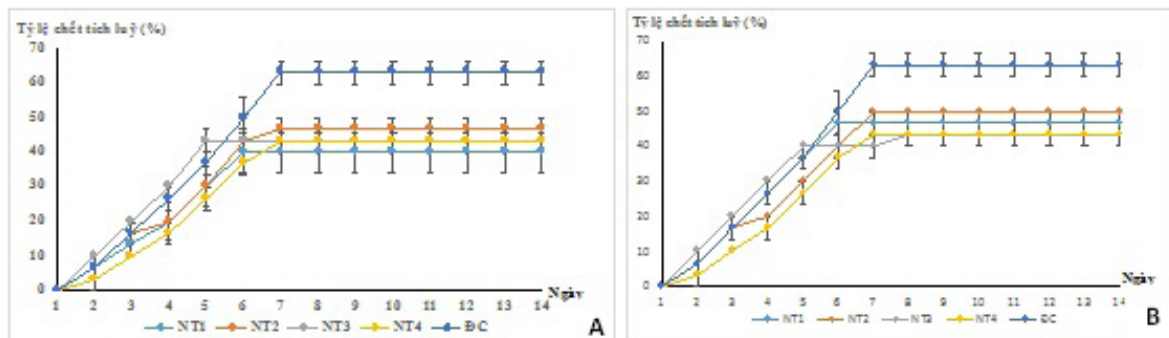
Thông số	Thí nghiệm 1: Cho ăn thảo dược 1 đợt (7 ngày liên tục)	Thí nghiệm 2: Cho ăn thảo dược 2 đợt (7 ngày liên tục)	Giá trị thích hợp (QCVN02-26:2017/ BNNPTNT)
pH	6,5-7,2	6,5-7,5	6,5-8
DO (mg/L)	4,5 -6	4,7-5,2	≥ 3
NH ₃ (mg/L)	< 0,1	< 0,1	< 0,1
NO ₂	0	0	0

Tỷ lệ cá chết tích lũy theo ngày sau cảm nhiễm bằng vi khuẩn *S. agalactiae* kiểu huyết thanh III (hình 3A) hoặc Ib (hình 3B) của các

nghiệm thức được bổ sung các loại cao chiết thảo dược trong thức ăn đều thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Sau 24 giờ

cảm nhiễm, cá ở các nghiệm thức bắt đầu chết mà chưa thể hiện dấu hiệu bệnh lý và hiện tượng

chết kéo dài đến ngày thứ 8 ở tất cả các nghiệm thức (hình 3).



Hình 3. Tỷ lệ cá chết cộng dồn sau ngày cảm nhiễm với chủng *S. agalactiae* kiểu huyết thanh III (A) và kiểu huyết thanh Ib (B) khi cho ăn thảo dược 1 đợt trong 7 ngày

Dấu hiệu bệnh lý khi cảm nhiễm với các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* có kiểu huyết thanh khác nhau ở các nghiệm thức chỉ thể hiện ở ngày thứ 3 sau cảm nhiễm với các biểu hiện bệnh lý như: bỏ ăn, bơi lơ dờ trên mặt nước, mắt cá lồi và đục (hình 4) như mô tả của Phuoc *et al.* (2021). Cả hai chủng với kiểu huyết thanh khác nhau đều gây chết cá với tỷ lệ lên đến 66,3% ở lô đối chứng.



Hình 4. Cá biểu hiện lồi mắt và xuất huyết (mũi tên) sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*

Hiệu quả bảo vệ của cao chiết các loại thảo dược với cá rô phi sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* được trình bày ở bảng 4. Thực tế cho thấy khi sử dụng cao chiết xuyên tâm liên với nồng độ MBC (312 mg. kg⁻¹ thức ăn), cá hoàn toàn không sử dụng thức ăn. Điều này có thể do các thành phần có vị đắng như androgaphiolide và neoandrographiolide trong cao chiết xuyên tâm liên (Đỗ Tất Lợi, 2000). Tuy nhiên khi dùng

liều thấp hơn (½ nồng độ MBC) cao chiết xuyên tâm liên có hiệu quả bảo vệ cá rô phi chống lại vi khuẩn *S. agalactiae* cao nhất; đạt tỷ lệ bảo hộ (RPS) là 36,8% khi cá thí nghiệm cảm nhiễm chủng vi khuẩn có kiểu huyết thanh III và 26,3% khi cảm nhiễm chủng vi khuẩn có kiểu huyết thanh Ib. Các thành phần androgaphiolide và neoandrographiolide có trong cao chiết xuyên tâm liên có vị đắng (Đỗ Tất Lợi, 2000) làm cho cá ăn ít hơn thức ăn chứa các loại cao chiết khác, nên hiệu quả bảo vệ của cao chiết xuyên tâm liên thấp hơn. Cao chiết tía tô, cỏ mực với hàm lượng 2.500 mg. kg⁻¹ thức ăn và kinh giới với hàm lượng 1.250 mg. kg⁻¹ thức ăn cho hiệu quả bảo vệ cao (đều đạt 31,6%) ở cả hai nghiệm thức khi cá cảm nhiễm với chủng vi khuẩn có kiểu huyết thanh III (nhóm 1) hay kiểu huyết thanh Ib (nhóm 2). Tỷ lệ bảo hộ của cao chiết kinh giới lên cá rô phi khi cảm nhiễm chủng vi khuẩn kiểu huyết thanh III hay Ib lần lượt đạt 26,3% và 21,1%. Hiệu quả bảo vệ cá rô phi trong thí nghiệm của chúng tôi cao hơn kết quả khi bổ sung 10 g. kg⁻¹ và 20 g. kg⁻¹ thức ăn cao chiết vỏ quế được bổ sung giai đoạn trước khi cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*, giá trị RPS lần lượt thu được là 17,1% và 21,4% được thực hiện bởi Nguyễn Thị Trúc Quyên và cs. (2023) nhưng thấp hơn kết quả nghiên cứu của Guo *et al.* (2019) khi sử dụng cây kê huyết đằng (*Spatholobus suberectus*) và cây thanh đại (*Isatis indigotica*) bổ sung vào thức ăn để khảo sát khả năng kháng vi khuẩn *S. agalactiae* ở cá rô phi cho giá trị RPS lần lượt là 75 và 62,5%. Điều này cho thấy cao chiết

các loại thảo dược xuyên tâm liên, tía tô, kinh giới và cỏ mực có tính kháng *S. agalactiae* cao hơn cao

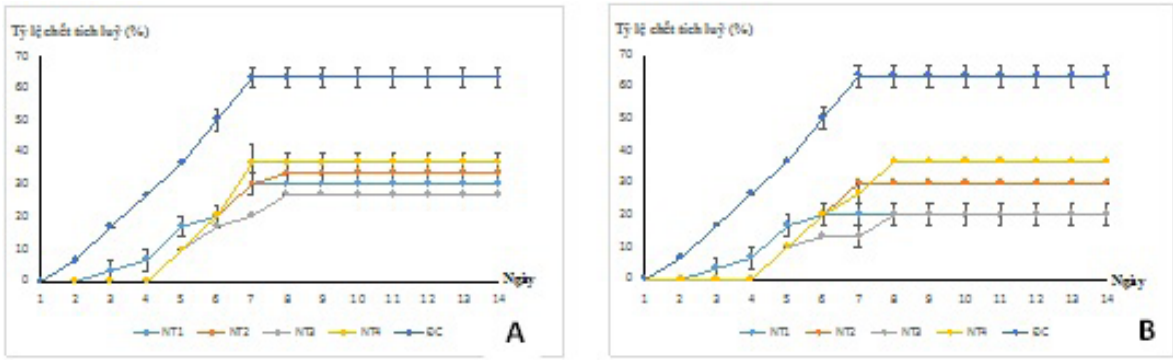
chiết vô quế, tuy nhiên thấp hơn cây kê huyết đằng và cây thanh đại.

Bảng 4. Hiệu quả phòng bệnh của các loại cao chiết thảo dược với cá rô phi cho ăn 1 đợt liên tục trong 7 ngày khi cảm nhiễm với các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* khác kiểu huyết thanh

Loại cao chiết thảo dược (/kg thức ăn)	RPS (%)	
	<i>S. agalactiae</i> kiểu huyết thanh III	<i>S. agalactiae</i> kiểu huyết thanh Ib
Xuyên tâm liên (156 mg)	36,8	26,3
Kinh giới (1.250 mg)	26,3	21,1
Tía tô (2.500 mg)	31,6	31,6
Cỏ mực (2.500 mg)	31,6	31,6

Nhằm nâng cao hiệu quả phòng bệnh của cao chiết các loại thảo dược trong nghiên cứu, chúng tôi đã tiến hành tăng nhịp điệu sử dụng các loại cao chiết lên 2 lần với tần suất sử dụng cao chiết

thảo dược trong 7 ngày liên tục và khoảng cách giữa hai lần cho ăn là 7 ngày. Tỷ lệ chết của cá khi gây bệnh thực nghiệm sau hai lần cho ăn cao chiết thảo dược được thể hiện ở hình 5.



Hình 5. Tỷ lệ cá chết cộng dồn sau ngày cảm nhiễm với chủng *S. agalactiae* kiểu huyết thanh III (A) và kiểu huyết thanh Ib (B) khi sử dụng thảo dược với tần suất 2 lần cho ăn

Ở các nghiệm thức thí nghiệm cho ăn cao chiết thảo dược, tỷ lệ chết ở cá thí nghiệm khi gây bệnh thực nghiệm đều dưới 40% ở cả hai kiểu huyết thanh III và Ib. Đặc biệt, khi sử dụng thức ăn phối trộn với cao chiết tía tô liều 2.500 mg.kg⁻¹ thức ăn Ib, tỷ lệ chết thấp nhất ghi nhận được ở nghiệm thức 3 (NT3) ở cả nhóm 1 (26,7% khi cá thí nghiệm cảm nhiễm với chủng *S. agalactiae* kiểu huyết thanh III) và nhóm 2 (20% khi cá thí nghiệm cảm nhiễm với chủng *S. agalactiae* kiểu huyết thanh Ib) (hình 5). Hiệu quả bảo vệ của cao chiết tía tô với RPS đạt 63,9% ở nhóm 1 và 68,4% ở nhóm 2 (bảng 5). Hiệu quả bảo

vệ của cao chiết cỏ mực, kinh giới đều tăng ở các nghiệm thức nhóm 1 với RPS là 52,6% đối với cao chiết cỏ mực, 47,4% đối với cao chiết kinh giới khi cá thí nghiệm cảm nhiễm chủng vi khuẩn kiểu huyết thanh III và nhóm 2 với RPS đạt 57,9% với cao chiết cỏ mực và 52,6% với cao chiết kinh giới khi cảm nhiễm với chủng vi khuẩn có kiểu huyết thanh Ib. Cao chiết xuyên tâm liên với hàm lượng 156 mg.kg⁻¹ thức ăn cho hiệu quả bảo vệ rất cao (RPS là 57,9% với chủng có kiểu huyết thanh III và 68,4% với chủng có kiểu huyết thanh Ib). Kết quả này cho thấy việc sử dụng cao chiết thảo dược với nhịp điệu 2 lần

cách tuần cho hiệu quả nhất trong phòng bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi. Liều lượng và thời gian sử dụng thảo dược trong nghiên cứu này hoàn toàn phù hợp với nhận định của Harikrishnan *et al.* (2011) khi cho rằng liều

lượng của thực vật bổ sung vào thức ăn từ 1% đến 30% đối với thực vật thô và từ 0,01% đến 5% đối với hoạt chất tinh khiết từ thực vật và với thời gian bổ sung dao động từ 7 ngày đến 70 ngày sẽ cải thiện sức khỏe cho động vật thủy sản.

Bảng 5. Hiệu quả phòng bệnh của các loại cao chiết thảo dược với cá rô phi cho ăn 2 lần liên tục trong 7 ngày khi cảm nhiễm với các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* khác kiểu huyết thanh

Loại cao chiết thảo dược (/kg thức ăn)	RPS (%)	
	<i>S. agalactiae</i> kiểu huyết thanh III	<i>S. agalactiae</i> kiểu huyết thanh Ib
Xuyên tâm liên (156 mg)	57,9	68,4
Kinh giới (1.250 mg)	47,4	52,6
Tía tô (2.500 mg)	63,9	68,4
Cỏ mực (2.500 mg)	52,6	57,9

3.2. Kết quả đánh giá khả năng trị bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi của các loại cao chiết thảo dược

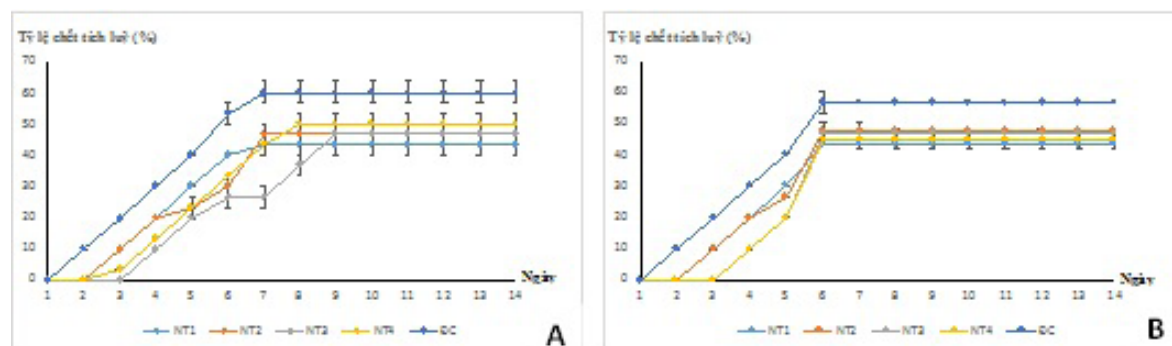
Các yếu tố môi trường nước trong suốt thí nghiệm thử nghiệm điều trị bệnh đều được duy trì nằm trong khoảng giới hạn phù hợp cho sinh

trưởng và phát triển của cá thí nghiệm.

Kết quả đánh giá khả năng trị bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi của các loại cao chiết thảo dược được trình bày ở hình 6 và bảng 6.

Bảng 6. Giá trị các thông số môi trường nước trong thí nghiệm đánh giá khả năng trị bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi của các loại cao chiết thảo dược

Thông số	Thí nghiệm trị bệnh cho ăn thảo dược 1 đợt (7 ngày liên tục)	Giá trị thích hợp (QCVN02-26:2017/ BNNPTNT)
pH	6,7-7,4	6,5-8
DO (mg/L)	4,9-5,5	≥ 3
NH ₃ (mg/L)	< 0,1	< 0,1
NO ₂	0	0



Hình 6. Tỷ lệ cá chết cộng dồn sau ngày cảm nhiễm với chủng *S. agalactiae* kiểu huyết thanh III (A) và kiểu huyết thanh Ib (B) khi sử dụng thảo dược để trị bệnh trong 7 ngày liên tục

Tỷ lệ cá chết tích lũy theo ngày sau cảm nhiễm bằng vi khuẩn *S. agalactiae* kiểu huyết thanh III (hình 6A) hoặc Ib (hình 6B) của các nghiệm thức sử dụng cao chiết thảo dược bổ sung trong thức ăn đều thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$).

Hiệu quả trị bệnh của cao chiết các loại thảo dược với cá rô phi được cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* đều thấp hơn với cả hai phương pháp phòng bệnh bằng cho cá ăn thảo dược một lần hoặc hai lần với khoảng cách mỗi lần là 7 ngày (bảng 7).

Bảng 7. Hiệu quả trị bệnh của các loại cao chiết thảo dược với cá rô phi cho ăn liên tục trong 7 ngày khi cảm nhiễm với các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* khác kiểu huyết thanh

Loại cao chiết thảo dược (kg thức ăn)	RPS (%)	
	<i>S. agalactiae</i> kiểu huyết thanh III	<i>S. agalactiae</i> kiểu huyết thanh Ib
Xuyên tâm liên (156 mg)	27,8	23,5
Kinh giới (1.250 mg)	16,7	15,9
Tía tô (2.500 mg)	22,2	17,5
Cỏ mực (2.500 mg)	22,2	20,5

Cao chiết xuyên tâm liên, cỏ mực và tía tô cho hiệu quả trị bệnh cao nhất ở các nghiệm thức nhóm 1 (RPS lần lượt là 27,8% đối với xuyên tâm liên; 22,2% với cả hai loại cao chiết cỏ mực và tía tô khi cảm nhiễm chủng vi khuẩn có kiểu huyết thanh III) và nhóm 2 (RPS đạt 23,5% đối với xuyên tâm liên; 20,5% với cao chiết cỏ mực và 17,5% với cao chiết tía tô khi cảm nhiễm với chủng vi khuẩn có kiểu huyết thanh Ib). Cao chiết kinh giới cho thấy hiệu quả trị bệnh thấp nhất với tỷ lệ 16,7% trên chủng huyết thanh III và 15,9% trên chủng huyết thanh Ib.

Kết quả nghiên cứu cho thấy việc sử dụng cao chiết các loại thảo dược trên đều giúp giảm tỷ lệ chết cá rô phi khi cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*. Nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước cũng cho thấy có một số loại thảo dược có hiệu quả tốt trong việc ức chế vi khuẩn gây bệnh trên cá. Việc bổ sung chiết xuất của 2 loại thảo dược là kim ngân (*Lonicera japonica*) và nấm linh chi (*Ganoderma lucidum*) trong chế độ ăn của cá rô phi vằn (*Oreochromis niloticus*) cho thấy tình trạng miễn dịch và khả năng kháng bệnh của cá thí nghiệm được cải thiện rõ rệt, cả 2 loại thảo dược khi sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp đều làm tăng tỷ lệ sống

của cá sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *A. hydrophila* (Yin *et al.*, 2008). Tỷ lệ chết của cá rô phi giảm rõ rệt khi bổ sung bột lá xuyên tâm liên tách chiết bằng dung môi nước vào thức ăn với tỷ lệ bột lá và thức ăn là 4:36 và 5:35 (tương ứng 10 và 15%) trong 10 ngày và gây nhiễm với *S. agalactiae* (Rattanachaikunsopon và Phumkhachorn, 2009). Sử dụng cao chiết từ 3 loại thảo dược gồm cây sấu đầu (*Azadirachta indica*), hương nhu tía (*Ocimum sanctum*) và củ nghệ (*Curcuma longa*) với hàm lượng 400 và 800 mg/kg thức ăn trước khi gây cảm nhiễm bằng vi khuẩn *A. hydrophila*, giúp tỷ lệ chết của cá vàng (*Carassius auratus*) chỉ còn 25-30%. Tỷ lệ chết của cá điêu hồng (*Oreochromis* sp.) khi cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae* sau 14 ngày cho cá ăn thức ăn bổ sung tỏi tươi với hàm lượng 0,5 và 1% là 70% hoặc bổ sung bột tỏi với hàm lượng 0,25% thì tỷ lệ chết là 36,7% và đều thấp hơn so với cá ở nghiệm thức đối chứng (86,7%) (Mai Thanh Thanh và Bùi Thị Bích Hằng, 2018). Kết quả nghiên cứu này cho thấy cao chiết các loại thảo dược xuyên tâm liên, kinh giới và cỏ mực có tác dụng tốt trong phòng bệnh hơn trị bệnh đối với cá rô phi sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae* ở các kiểu huyết thanh khác nhau.

IV. KẾT LUẬN

Bổ sung cao chiết xuyên tâm liên (156 mg/kg), kinh giới (1.250 mg/kg), tía tô (2.500 mg/kg) hoặc cỏ mực (2.500 mg/kg) vào thức ăn làm giảm tỷ lệ chết khi cá gây nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae* kiểu huyết thanh III và Ib. Hiệu quả phòng bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi cao nhất khi sử dụng cao chiết các loại thảo dược với tần suất cho ăn 7 ngày liên tục trong 2 đợt, mỗi đợt cách nhau 1 tuần. Hiệu quả trị bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi của các loại cao chiết thấp hơn phòng bệnh. Cần tiếp tục thực hiện các nghiên cứu sâu hơn về ảnh hưởng của cao chiết các loại thảo dược này khi trộn vào thức ăn lên các chỉ tiêu miễn dịch, và tăng trưởng trên cá rô phi.

Lời cảm ơn: Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn sự tài trợ của Nhóm Nghiên cứu mạnh Đại học Huế, NCM.DHH.2022.005.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2017. Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về yêu cầu kỹ thuật đối với cơ sở sản xuất giống và nuôi cá rô phi, QCVN 02-26:2017/BNNT.
2. Đỗ Tất Lợi, 2000. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học, thành phố Hồ Chí Minh, tr. 86.
3. Trương Thị Mỹ Hạnh, Phạm Thị Yến, Phạm Thị Huyền, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Phạm Thị Hồng Minh, Đỗ Tiến Lâm, Trần Thị Hoài Vân và Phan Thị Vân, 2017. Tác dụng diệt khuẩn của dịch chiết thân lá thồm lôm (*Polygonum chinense* L.) đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp ở tôm nuôi nước lợ. *Tạp chí khoa học công nghệ Việt Nam*, 17(6), 19-24.
4. Hồng Mộng Huyền, Võ Tấn Huy và Trần Thị Tuyết Hoa, 2018. Hoạt tính kháng khuẩn của một số cao chiết thảo dược kháng vi khuẩn gây bệnh trên tôm nuôi. *Tạp chí Khoa học trường Đại học Cần Thơ*, 54(2), 143- 150.
5. Trần Nguyên Ngọc, Nguyễn Thị Huệ Linh, Nguyễn Ngọc Phước, 2023. Đánh giá hiệu quả của cao chiết sải đất (*Wedelia chinensis*) lên khả năng phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*). *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn* 10:147-154
6. Châu Thuỳ Phương, Hồ Thị Kim My, Nguyễn Thị Quỳnh Nga, Trương Thị Thuỳ Duyên, Nguyễn Anh Xuân, Nguyễn Thị Huệ Linh, và Nguyễn Ngọc Phước, 2023. Nghiên cứu khả năng kháng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* của các loại cao chiết thảo dược trên cá rô phi (*Oreochromis* sp.). *Tạp chí Khoa học và công nghệ nông nghiệp Trường Đại học Nông Lâm Huế*, 7(1), 3452-3464.
7. Nguyễn Ngọc Phước, Trần Thị Nhật Anh, Nguyễn Thị Huệ Linh, 2019. Phân lập và xác định một số đặc điểm sinh học các chủng *Streptococcus agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi đỏ (*Oreochromis* sp.) nuôi tại Thừa Thiên-Huế. *Tạp Chí Khoa học và công nghệ nông nghiệp Trường Đại học Nông Lâm Huế*, 3(3), 1591-1601. <https://doi.org/10.46826/huaf-jasat.v3n3y2019.313>
8. Nguyễn Thị Trúc Quyên, Lê Linh Chi, Đoàn Văn Cường, Nguyễn Diễm Thư, Mã Tú Lan, Trần Hoàng Bích Ngọc, Nguyễn Thành Nhân và Nguyễn Thị Ngọc Tĩnh, 2019. Khả năng đối kháng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* phân lập trên cá rô phi (*Oreochromis* spp.) bởi một số cao chiết thảo dược. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản, Đại học Nha Trang*, 3, 124-132.
9. Nguyễn Thị Trúc Quyên, Đoàn Văn Cường, Mã Tú Lan, Nguyễn Thành Nhân, Từ Thanh Dung, và Nguyễn Thị Ngọc Tĩnh, 2023. Ảnh hưởng của cao chiết vỏ quế (*Cinnamomum verum*) lên tăng trưởng và khả năng bảo vệ cá rô phi (*Oreochromis* spp.) kháng lại vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*. *Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 65(7), 53-59.
10. Mai Thanh Thanh, Bùi Thị Bích Hằng, 2018. Ảnh hưởng của việc bổ sung tỏi (*Allium sativum*) vào thức ăn lên một số chỉ tiêu miễn dịch và khả năng kháng khuẩn của cá điêu hồng (*Oreochromis* sp.). *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, 54(2), tr.168-176.

11. Thủ tướng Chính phủ, 2022. Quyết định số 985/QĐ-TTg ngày 16/8/2022: Ban hành Chương trình Quốc gia phát triển nuôi trồng thủy sản giai đoạn 2021 - 2030
12. Amend, D.F., 1981. Potency testing of fish vaccines. International symposium on fish biologics: Serodiagnostics and vaccines. *Developments in Biological Standardization*, 49, 447-454.
13. FAO, 2021. Risk profile - Group B *Streptococcus* (GBS) – *Streptococcus agalactiae* sequence type (ST) 283 in freshwater fish. Bangkok.
14. Fitzsimmons, K., 2004. Development of new products and market for the global tilapia trade. *Proceedings of ISTA*, 6, pp.624-633.
15. Guo, W. L., Deng, H. W., Wang, F., Wang, S. F., Zhong, Z. H., Sun, Y., & Zhou, Y. C., 2019. *In vitro* and *in vivo* screening of herbal extracts against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 503, 412-421.
16. Harikrishnan, R., Kim, J.S., Kim, M.C., Balasundaram, C., and Heo, M.S., 2011. *Lactuca indica* extract as feed additive enhances immunological parameters and disease resistance in *Epinephelus bruneus* to *Streptococcus iniae*. *Aquaculture*, 318: 43-47.
17. Li, M., Wei, D., Huang, S., Huang, L., Xu, F., Yu, Q., and Li, P., 2022. Medicinal herbs and phytochemicals to combat pathogens in aquaculture. *Aquaculture International*, (3): 1239-1259
18. Novais, C., Campos, J., Freitas, A.R., Barros, M., Silveira, E., Coque, T.M., Antunes, P., & Peixex, L., 2018. Water supply and feed as sources of antimicrobial-resistant *Enterococcus* spp. in aquacultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Portugal. *The Science of the Total Environment*, 625, 1102-1112.
19. Phuoc, N. N., Linh, N. T. H., Crestani, C., & Zadoks, R. N., 2021. Effect of strain and environmental conditions on the virulence of *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*; GBS) in red tilapia (*Oreochromis* sp.). *Aquaculture*, 534, 736256.
20. Rattanachaikunsopon, P., Phumkhachorn, P., 2009. Prophylactic effect of *Andrographis paniculata* extracts against *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal Bioscience Bioengineer*, 107(5), pp.579-582.
21. Sirimanapong, W., Phuróc, N. N., Crestani, C., Chen, S., & Zadoks, R. N., 2023. Geographical, Temporal and Host-Species Distribution of Potentially Human-Pathogenic Group B *Streptococcus* in Aquaculture Species in Southeast Asia. *Pathogens*, 12(4), 525.
22. Yin, G., Ardo, L., Jeney, Z., Xu, P., & Jeney, G., 2008. Chinese herbs (*Lonicera japonica* and *Ganoderma lucidum*) enhance non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. *Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines*, 269-282.
23. Zhu, F., 2020. A review on the application of herbal medicines in the disease control of aquatic animals. *Aquaculture*, 526, 735422.

Ngày nhận: 25-10-2023

Ngày phản biện: 1-11-2023

Ngày đăng: 1-5-2024