

NGHIÊN CỨU HIỆU QUẢ BẢO VỆ CỦA CÁC LOẠI CAO THẢO ĐƯỢC TRÊN CÁ RÔ PHI (*Oreochromis sp.*) LÊN SỰ CẢM NHIỄM CỦA VI KHUẨN *Streptococcus agalactiae*

Hồ Thị Kim My, Châu Thùy Phương, Lê Văn Thông, Ngô Huy Khánh Trường,
Nguyễn Thị Huế Linh, Nguyễn Đức Quỳnh Anh, Nguyễn Ngọc Phước*

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

*Tác giả liên hệ: nguyennngocphuoc@hvae.edu.vn

Nhận bài: 16/10/2023 Hoàn thành phản biện: 09/11/2023 Chấp nhận bài: 17/11/2023

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung 4 loại cao chiết gồm: xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*), kinh giới (*Elsholtzia ciliata*), tía tô (*Perilla frutescens*) và cỏ mực (*Eclipta prostrata*) vào thức ăn lên khả năng bảo vệ cá rô phi kháng lại vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* (kiểu huyết thanh IB và III). Cao chiết thảo dược được bổ sung riêng biệt vào mỗi kg thức ăn với các tỷ lệ 156 mg (xuyên tâm liên), 1250 mg (kinh giới), 25000 mg (tía tô) và 2500 mg (cỏ mực). Cá thí nghiệm được gây cảm nhiễm bằng phương pháp tiêm xoang bụng với 0,1 mL vi khuẩn *S. agalactiae* kiểu huyết thanh III hoặc Ib với nồng độ 10^4 CFU. mL⁻¹. Kết quả 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 nhịp điệu cho ăn hai lần cách tuần. Cao chiết tía tô và cỏ mực là loại cao chiết thảo dược tiềm năng có thể sử dụng trong phòng và trị bệnh do *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi.

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

STUDY ON THE EFFECT OF HERBAL EXTRACTS ON THE PROTECTION ABILITY OF *Streptococcus agalactiae* INFECTION IN TILAPIA

Ho Thi Kim My, Chau Thuy Phuong, Le Van Thong, Ngo Huy Khanh Truong,
Nguyen Thi Hue Linh, Nguyen Duc Quynh Anh, Nguyen Ngoc Phuoc*

University of Agriculture and Forestry, Hue University

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effect of herbal extracts including Bitterweed (*Andrographis paniculata*), Lemon balm (*Elsholtzia ciliata*), Perilla (*Perilla frutescens*) and White elicta (*Eclipta prostrata*) dietary on the ability to protect tilapia against *Streptococcus agalactiae* (serotype Ib and III). Bitterweed (*Andrographis paniculata*), Lemon balm (*Elsholtzia ciliata*), Perilla (*Perilla frutescens*) and White elicta (*Eclipta prostrata*) extracts were singly mixed to feed with doses of 156 mg, 1250 mg, 25000 mg and 2500 mg per one kg feed (respectively). Fish were intraperitoneally injected with 0.1 mL of 10^6 CFU. mL⁻¹ *S. agalactiae* serotype III or serotype Ib. The results showed that the indicated herb extracts proved the high protection to tilapia from *S. agalactiae*, especially when increasing the feeding rhythm of herbal extract supplementation with 1 week – interval. Perilla (*Perilla frutescens*) and White elicta (*Eclipta prostrata*) extract can be considered as potential herbal extract for the treatment of disease caused by *S. agalactiae* in tilapia.

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

1. MỞ ĐẦU

Cá rô phi (*Oreochromis sp.*) là đối tượng nuôi phổ biến thứ hai trên thế giới, chỉ sau những loài cá chép (Fitzsimmons, 2004), 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 ngày 16/8/2022). Trong những năm gần đây dịch bệnh do vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* đang là thách thức lớn nhất cho việc phát triển nghề nuôi cá rô phi trên thế giới và Việt Nam. Vi khuẩn *S. agalactiae* có thể gây ra tỷ lệ chết trên cá rô phi lên đến 60 -70% trong vòng 5 - 7 ngày và gây ra thiệt hại kinh tế nặng nề cho người nuôi (Nguyễn Ngọc Phước và cs., 2019). Các nghiên cứu mới tại Việt Nam đã 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 và cs., 2021; FAO, 2021). 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 nên hiện tượng kháng kháng sinh, ô nhiễm môi trường và ảnh hưởng xấu đến chất lượng thực phẩm (Novais và cs., 2018). Do đó, việc sử dụng thảo dược nhằm đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm là xu thế đang được nghiên cứu trong nuôi trồng thủy sản hiện nay (Zhu, 2020; Li và cs., 2022). Khả năng kháng các loại vi khuẩn gây bệnh trên các đối tượng thủy sản của các loại thảo dược như: vỏ quế (*Cinnamomum verum*), cây xoan (*Melia azedarach* L), sài đất (*Wedelia chinensis*), tỏi (*Allium sativum* L.), cây xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*), cỏ mực (*Eclipta alba* Hassk), cây trâm 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, Nguyễn Thị Trúc Quyên và cs., 2019) hay *in vivo* (Nguyễn Thị Trúc Quyên và cs., 2023). Trong các nghiên cứu *in vivo* về sử dụng thảo dược để phòng và trị bệnh vi khuẩn gây ra trên động vật thủy sản cần phải thực hiện theo các trình tự sau: (i) lựa chọn phương pháp chiết xuất phù hợp; (ii) lựa chọn liều sử dụng kỳ vọng có hiệu quả; và (iii) xác định cơ chế tác dụng của thảo dược (Thanigaivel và cs., 2015). Từ đó, các nghiên cứu về khả năng kháng khuẩn của thảo dược trên động vật thủy sản sau khi xác định khả năng kháng khuẩn và nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), nồng độ tiêu diệt tối thiểu (MBC), thường lựa chọn nồng độ có khả năng kháng khuẩn để thử nghiệm trong điều kiện *in vivo* (Mohammed và Arias, 2016; Rashidian và cs., 2022; Nguyễn Thị Trúc Quyên và cs., 2023). Từ kết quả nghiên cứu của Châu Thủy Phương và cs. (2023) đã tiến hành khảo sát *in vitro* về khả năng kháng khuẩn của 4 loại thảo dược là: tía tô (*Perilla frutescens*), kinh giới (*Elsholtzia ciliata*), xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*), cỏ mực (*Eclipta prostrata*) trong dung môi nước cho kết quả đối kháng mạnh với vi khuẩn *S. agalactiae* ở cả hai kiểu huyết thanh III và Ib. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định được nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ tiêu diệt tối thiểu (MBC) của 4 loại cao chiết thảo dược này dao động từ 312 mg/L đến 2500 mg/L trên các chủng *S. agalactiae* ở cả hai kiểu huyết thanh. Các nồng độ khác nhau của MBC (1x MBC, 5xMBC và 10xMBC) đều an toàn cho cá trong điều kiện thử nghiệm *in vivo*. Kết quả đánh giá khả năng kháng khuẩn trên cá rô phi bằng phương pháp tiêm theo Balasubramnian và cs. (2008), cho thấy ở nồng độ 1x MBC của 4 loại thảo dược này (312 mg/L với xuyên tâm liên, 1250 mg/L với kinh giới, 2500 mg/L với cỏ mực và tía tô) đã chứng minh khả năng bảo vệ cao cho

cá rô phi chống lại vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh. Chính vì vậy, trong nghiên cứu tiếp theo này chúng tôi lựa chọn nồng độ MBC của 4 loại cao chiết thảo dược trên được sử dụng để đánh giá khả năng kháng vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Nguồn vi khuẩn

Chủng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* thuộc Sequence Type (ST) 283 (kiểu huyết thanh III) phân lập từ mẫu bệnh cá rô phi bị bệnh lở loét xuất huyết tại An Giang và chủng *S. agalactiae* ST 1395 (kiểu huyết thanh Ib) phân lập tại Thừa Thiên Huế được cung cấp từ phòng thí nghiệm Bệnh thủy sản, Khoa Thủy sản, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế (Phuoc và cs., 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, hãng GFL) ở 28 °C với tốc độ lắc 180 vòng/phút

trong 24 giờ. Mật độ vi khuẩn sau khi nuôi cấy 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 10^8 cfu/mL). Mật độ vi khuẩn sau đó được pha loãng về 10^6 CFU. mL⁻¹ (liều gây chết 50% LD₅₀ được xác định từ nghiên cứu của Phuoc và cs. (2021) để dùng cho các thí nghiệm phòng và trị bệnh.

2.1.2. Cá thí nghiệm

Cá rô phi (*Oreochromis sp.*) có kích cỡ trung bình từ 5-7 g được mua từ Trung tâm giống Thủy sản Thừa Thiên Huế và được nuôi cách ly ở trong bể composite 1000 L tại phòng thí nghiệm Bệnh học thủy sản, Khoa Thủy sản, trường Đại học Nông Lâm Huế trong 14 ngày (Hình 1). Cá thí nghiệm được cho ăn bằng thức ăn Cargill (Việt Nam) hai lần/ngày ở mức 3% trọng 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 kiểm tra không bị nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* bằng cách cấy trực tiếp mẫu não của 5 cá ngẫu nhiên trong bể lên môi trường TSA và ủ ở nhiệt độ 28°C trong 24 giờ (Phuoc và cs., 2021).



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

2.2. Phương pháp chuẩn bị thức ăn thí nghiệm

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 nước theo mô tả của Châu Thủy Phương và cs. (2023)

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 156 mg. kg⁻¹ với xuyên tâm liên, 1250 mg. kg⁻¹ với kinh giới, 2500 mg. kg⁻¹ với tía tô và 2500 mg. kg⁻¹ với cỏ mực, đây là các nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) theo kết quả nghiên cứu của Châu Thủy Phương và cs. (2023). Riêng với xuyên tâm liên, do khi sử dụng nồng độ MBC trộn vào thức ăn thì vị đắng của xuyên tâm liên dẫn đến cá không bắt mồi, nên chúng tôi sử dụng ½ nồng độ MBC. Thức ăn sau khi trộn với thảo dược được để khô tự nhiên trong vòng 4 giờ, sau đó được áo bằng lòng trắng trứng gà trong 15 phút bằng máy trộn để 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 bảo hộ của các loại cao chiết thảo dược trên cá rô phi qua đường thức ăn và gây bệnh thực nghiệm với vi khuẩn *S. agalactiae*

Để đánh giá vai trò của cao chiết các loại thảo dược lên 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 nước cất) và 4 nghiệm thức cho ăn thức ăn trộn các loại thảo dược: 312 mg/L xuyên tâm liên (nghiệm thức 1), 1250 mg/L kinh giới (nghiệm thức 2), 2500 mg/L tía tô (nghiệm thức 3) và 2500 mg/L 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). 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 10⁶ CFU.mL⁻¹ (liều LD₅₀) (Phuoc và cs., 2021) (Hình 2). Sau khi cảm nhiễm các nhóm được nuôi riêng từng bể theo từng nghiệm thức và theo chủng vi khuẩn cảm nhiễm. Tổng cộng có 30 bể cho 2 nhóm. 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% trọng lượng thân, 2 lần mỗi ngày. Theo dõi tỷ lệ chết trong 14 ngày.

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 Nhóm 2: 50% cá thí nghiệm các nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn <i>S. agalactiae</i> kiểu huyết thanh Ib
Bổ sung thảo dược	NT1	Bổ sung cao chiết xuyên tâm liên với tỷ lệ 156 mg. kg ⁻¹ thức ăn	
	NT2	Bổ sung cao chiết kinh giới với tỷ lệ 1250 mg. kg ⁻¹ thức ăn	
	NT3	Bổ sung cao chiết tía tô với tỷ lệ 2500 mg. kg ⁻¹ thức ăn	
	NT4	Bổ sung cao chiết cỏ mực với tỷ lệ 2500 mg. kg ⁻¹ thức ăn	

Thí nghiệm 2. Được bố trí hoàn toàn giống với thí nghiệm, tuy nhiên cá được cho thức ăn có chứa cao chiết 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 10⁶ CFU.mL⁻¹ (liều LD₅₀). Sau khi cảm nhiễm các nhóm được riêng từng bể theo chủng vi khuẩn cảm nhiễm. Tổng cộng có 30 bể cho 2 nhóm. Thí nghiệm kết thúc sau khi cảm nhiễm 14

ngày. Thí nghiệm kết thúc sau khi cảm nhiễm 14 ngày.

2.4. Đánh giá khả năng bảo hộ của các loại cao chiết thảo dược qua đường thức ăn trên cá rô phi sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae*

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 120-L 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 lượng 3% trọng 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⁻¹ (Liều LD₅₀). Cá sau khi cảm nhiễm được đưa vào các bể 120-L riêng biệt cho từng nghiệm thức và 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% trọng lượng thân trong 7 ngày sau đó cho ăn thức ăn không chứa thảo dược trong 7 ngày tiếp theo (Bảng 2). 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 các nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn <i>S. agalactiae</i> kiểu huyết thanh III	Bổ sung cao chiết xuyên tâm liên với tỷ lệ 156 mg. kg ⁻¹ thức ăn
	NT2	- Nhóm 2: 50% cá thí nghiệm các nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn <i>S. agalactiae</i> kiểu huyết thanh III	Bổ sung cao chiết kinh giới với tỷ lệ 1250 mg. kg ⁻¹ thức ăn
	NT3	- Nhóm 2: 50% cá thí nghiệm các nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn <i>S. agalactiae</i> kiểu huyết thanh Ib	Bổ sung cao chiết tía tô với tỷ lệ 2500 mg. kg ⁻¹ thức ăn
	NT4	- Nhóm 2: 50% cá thí nghiệm các nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn <i>S. agalactiae</i> kiểu huyết thanh Ib	Bổ sung cao chiết cỏ mực với tỷ lệ 2500 mg. kg ⁻¹ thức ăn

Hiệu quả bảo vệ của các loại dịch chiết thảo dược 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

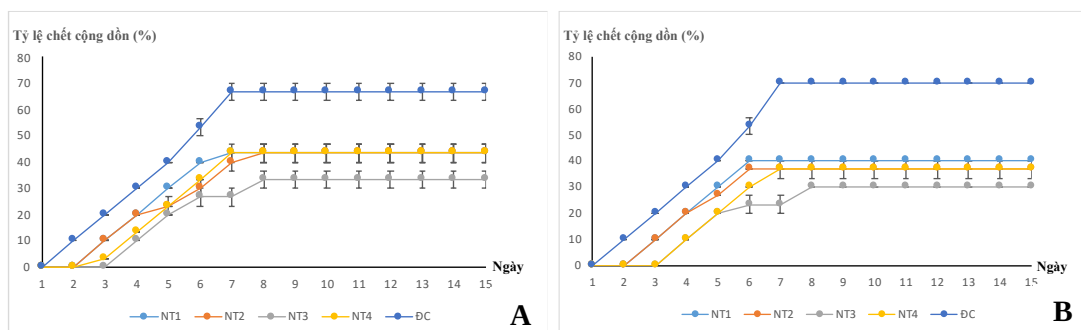
Tất cả các số liệu được nhập và lưu trữ bằng Excel. Các số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS 20.0, trắc nghiệm One-way ANOVA bằng phép thử Tukey với độ tin cậy 95%

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả đánh giá khả năng bảo hộ của các loại cao chiết thảo dược trên cá rô phi qua đường thức ăn và gây bệnh thực nghiệm với vi khuẩn *S. agalactiae*

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). 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 lờ đờ trên mặt nước, mắt cá lồi và đục (Hình 4) như mô tả của Phuoc và cs. (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 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) với tần suất 1 lần cho ăn.



Hình 4. Cá biểu hiện lồi mắt 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 3. Cao chiết tía tô, cỏ mực với hàm lượng 2500 mg. kg⁻¹ thức ăn và kinh giới với hàm lượng 1250 mg. kg⁻¹ thức ăn cho hiệu quả bảo vệ cao nhất ở các nghiệm thức nhóm 1 với RPS lần lượt là 50% đối với cao chiết tía tô, 35% đối với cao chiết cỏ mực, hay kinh giới khi cá thí nghiệm cảm nhiễm chủng vi khuẩn có kiểu huyết thanh III và nhóm 2 với RPS đạt 57,1% với cao chiết tía tô và 47,6% với cao chiết cỏ mực hay kinh giới khi cá thí nghiệm 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 thấp nhất (RPS là 33,3% với chủng có kiểu huyết thanh III và 42,9% với chủng có kiểu huyết thanh Ib). Điều này có thể do các thành phần andrographiolide 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. 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, tuy nhiên khi dùng liều thấp hơn cao chiết xuyên tâm liên vẫn có hiệu quả bảo vệ cá rô phi chống lại vi khuẩn *S. agalactiae*. Hiệu quả bảo vệ cá rô phi trong thí nghiệm của chúng tôi cao hơn kết quả nghiên cứu 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). 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 vỏ

quế. Nhưng kết quả nghiên cứu của chúng tôi lại thấp hơn kết quả nghiên cứu của Guo và cs. (2019) khi sử dụng cây kê huyết đằng (*Spatholobus suberectus*) và cây thanh đại (*Isatis indigotica*) vào thức ăn để khảo sát khả năng kháng vi khuẩn *S. agalactiae* ở cá

rô phi thì giá trị RPS lần lượt là 75 và 62,5%, tuy nhiên khối lượng cá sử dụng trong nghiên cứu này lớn hơn (100-150g) so với thí nghiệm chúng tôi và thời gian sử dụng thảo dược kéo dài hơn nên có thể dẫn đến khả năng bảo hộ cao hơn.

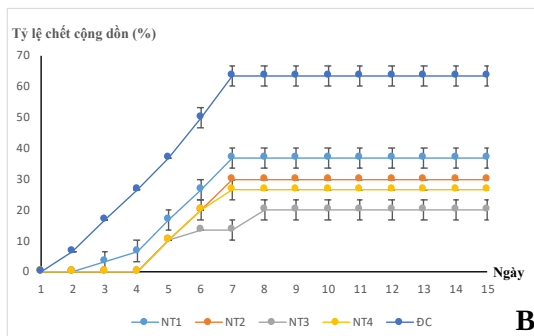
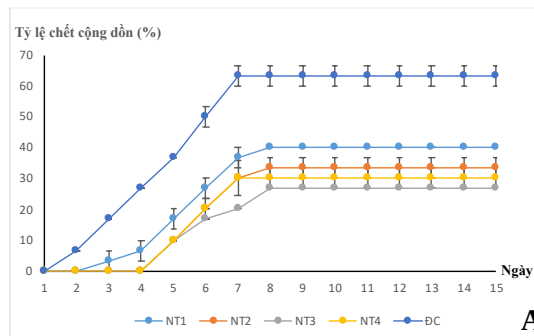
Bảng 3. Hiệu quả phòng bệnh của các loại cao chiết thảo dược với cá rô phi cho ăn liên tục trong 7 ngày và cảm nhiễm với các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* khác kiểu huyết thanh

Loại cao chiết thảo dược (.kg ⁻¹ thức ăn)	RPS (%)	
	<i>S. agalactiae</i> kiểu huyết thanh III	<i>S. agalactiae</i> kiểu huyết thanh Ib
Xuyên tâm liên (156 mg)	33.3 ± 2,05 ^a	42,1 ± 3,03 ^a
Kinh giới (1250 mg)	35 ± 3,03 ^a	47,6 ± 5,14 ^a
Tía tô (2500 mg)	50 ± 4,54 ^b	57,1 ± 2,57 ^b
Cỏ mực (2500 mg)	35 ± 3,03 ^a	47,6 ± 5,14 ^a

Giá trị thể hiện là số trung bình ± độ lệch chuẩn của 3 lần lặp lại thí nghiệm. Các kí tự a,b khác nhau trong cùng 1 cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Nhằm nâng cao hiệu quả kháng khuẩn 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 2500 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 57,9% ở nhóm 1 và 68,4% ở nhóm 2 (Bảng 4) ($p < 0,05$). Hiệu quả bảo vệ của cao chiết cỏ mực, kinh giới đều tăng ở các nghiệm thức nhóm 1 với RPS là 52,% 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 thấp nhất (RPS là 35% với chủng có kiểu huyết thanh III và 42,1% với chủng có kiểu huyết thanh Ib) ($p < 0,05$). Kết quả này cho thấy việc sử dụng cao chiết thảo dược với nhịp điệu 2 lần cách tuần là hiệu quả nhất trong phòng bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi. Liều lượng

và nhịp điệu sử dụng cao chiết các loại thảo dược trong nghiên cứu này hoàn toàn phù hợp với nhận định của Harikrishnan và cs. (2011) khi nhóm tác giả này 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 4. Hiệu quả phòng bệnh của các loại cao chiết thảo dược với cá rô phi cho ăn 2 lần liên tục trong 7 ngày và cảm nhiễm với các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* khác kiểu huyết thanh

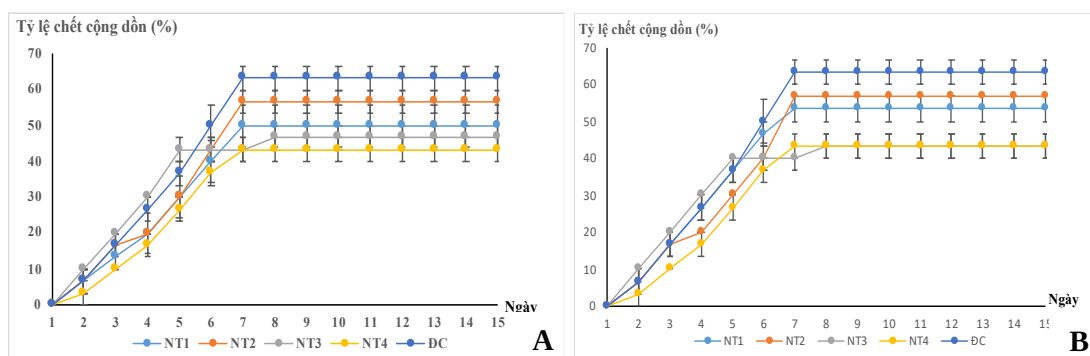
Loại cao chiết thảo dược (.kg ⁻¹ thức ăn)	RPS (%)	
	<i>S. agalactiae</i> kiểu huyết thanh III	<i>S. agalactiae</i> kiểu huyết thanh Ib
Xuyên tâm liên (156 mg)	$35 \pm 2,03^a$	$42,9 \pm 0,0^a$
Kinh giới (1250 mg)	$47,4 \pm 1,75^b$	$52,6 \pm 0,0^b$
Tía tô (2500 mg)	$57,9 \pm 1,14^d$	$68,4 \pm 0,0^c$
Cỏ mực (2500 mg)	$52,6 \pm 2,24^c$	$57,9 \pm 3,03^d$

Giá trị thể hiện là số trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn của 3 lần lặp lại thí nghiệm. Các kí tự ^{a,b,c,d} khác nhau trong cùng 1 cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.2. Kết quả đánh giá khả năng bảo hộ của các loại cao chiết thảo dược qua đường thức ăn sau khi gây bệnh thực nghiệm bằng vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá rô phi

Kết quả đánh giá khả năng bảo hộ của các loại cao chiết thảo dược sau khi gây bệnh thực nghiệm bằng vi khuẩn *S.*

agalactiae gây ra trên cá rô phi được trình bày ở Hình 6 và Bảng 5. Tỷ lệ cá chết cộng dồn theo ngày sau cảm nhiễm bằng vi khuẩn *S. agalactiae* kiểu huyết thanh III (Hình 6A) hoặc Ib (Hình 6B) của các nghiệm thức cho cá ăn các loại cao chiết thảo dược bổ sung trong thức ăn sau khi gây bệnh thực nghiệm đều thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$).



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.

Tuy nhiên, việc cho cá ăn thảo dược sau khi gây bệnh thực nghiệm cho kết quả bảo hộ thấp hơn hiệu quả bảo hộ của việc cho cá sử dụng thảo dược trước khi cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* với cả hai phương pháp thử nghiệm là cho cá ăn thảo dược một lần hoặc hai lần với khoảng cách mỗi lần là 7 ngày. Cao chiết cỏ mực và tía tô cho hiệu quả trị bệnh cao nhất ở các nghiệm thức nhóm 1 (RPS lần lượt là 31,6 % đối với cao chiết cỏ mực, 26,3% đối với cao chiết tía tô, khi cảm nhiễm chủng vi

khuẩn có kiểu huyết thanh III) và nhóm 2 (RPS đạt 31,6% với cả hai loại cao chiết cỏ mực và 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 10,5% cho cả 2 chủng huyết thanh ($p < 0,05$). Kết quả nghiên cứu cho thấy sử dụng thảo dược trước khi cá cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* là hiệu quả hơn nhiều so với việc sử dụng sau khi cá đã nhiễm khuẩn vào cơ thể.

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

Loại cao chiết thảo dược (.kg ⁻¹ thức ăn)	RPS (%)	
	<i>S. agalactiae</i> kiểu huyết thanh III	<i>S. agalactiae</i> kiểu huyết thanh Ib
Xuyên tâm liên (156 mg)	21,1 ± 5,14 ^b	15,8 ± 3,03 ^b
Kinh giới (1250 mg)	10,5 ± 3,33 ^a	10,5 ± 0 ^a
Tía tô (2500 mg)	26,3 ± 3,33 ^b	31,6 ± 3,03 ^c
Cỏ mực (2500 mg)	31,6 ± 3,33 ^c	31,6 ± 3,03 ^c

Giá trị thể hiện là số trung bình ± độ lệch chuẩn của 3 lần lặp lại thí nghiệm. Các kí tự a, b, c khác nhau trong cùng 1 cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Vai trò phòng bệnh của thảo dược trong nuôi trồng thủy sản đã được nghiên cứu và chứng minh. 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 vân (*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 và cs., 2008). Khi cho cá rô phi ăn thức ăn có bổ sung bột lá xuyên tâm liên tách chiết bằng dung môi nước (tính theo vật chất khô) với tỷ lệ bột lá và thức ăn là 4:36 và 5:35 (tương ứng 10 và 15%), đã giúp làm giảm tỷ lệ chết của cá khi gây nhiễm với *S. agalactiae* (Rattanachaikunsopon và Phumkhachorn, 2009). Cá vàng (*Carassius auratus*) được phòng bệnh bằng cách bổ sung vào khẩu phần ăn 400 và 800 mg.kg⁻¹ thức ăn của cao chiết từ 3 loại thảo dược

gồm cây sần đầu (*Azadirachta indica*), hương nhu tía (*Ocimum sanctum*) và củ nghệ (*Curcuma longa*) trước khi gây cảm nhiễm bằng vi khuẩn *A. hydrophila* có tỷ lệ chết dao động 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 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 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*.

4. KẾT LUẬN

Bổ sung cao chiết xuyên tâm liên (156mg.kg⁻¹), kinh giới (1250 mg. kg⁻¹), tía tô (2500 mg. kg⁻¹) hoặc cỏ mực (2500 mg. kg⁻¹) vào thức ăn làm giảm tỷ lệ chết khi cá

được gây nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae* kiểu huyết thanh III và Ib. Hiệu quả kháng vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá rô phi cao nhất khi sử dụng cao chiết các loại thảo dược với tần suất cho ăn 7 ngày liên tục và nhịp điệu cho ăn là 2 lần và cách tuần trước khi cá tiếp xúc với mầm bệnh. Các loại cao chiết thảo dược trong nghiên cứu này có triển vọng ứng dụng cao trong việc phòng và trị bệnh do *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi đặc biệt là cao chiết tía tô và cỏ mực. Cần tiếp tục thực hiện các nghiên cứu chuyên sâu, đánh giá ảnh hưởng của cao chiết các loại thảo dược này khi trộn vào thức ăn lên các chỉ tiêu miễn dịch trên cá rô phi để đưa ra phác đồ điều trị bệnh hiệu quả nhất.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn sự tài trợ của Đại học Huế, Nhóm Nghiên cứu mạnh NCM.DHH.2022.005 và đề tài NCKH DHNL2023-TS-SV-02 “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”, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, năm 2023.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

- 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 lồm (*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.
- 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.
- Đỗ Tất Lợi. (2000). Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học, thành phố Hồ Chí Minh, tr. 86.

Châu Thủy Phương, Hồ Thị Kim My, Nguyễn Thị Quỳnh Nga, Trương Thị Thủy Duyên, Nguyễn Anh Xuân, Nguyễn Thị Huế 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.

Nguyễn Ngọc Phước, Trần Thị Nhật Anh, Nguyễn Thị Huế Linh. (2019). Phân lập và xác định một số đặc điểm sinh học của chủng *Streptococcus agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi đỏ (*Oreochromis* sp.) nuôi tại Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Nông Nghiệp* ISSN 2588-1256

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.

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.

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.

Quyết định số 985/QĐ-TTg của Thủ tướng Chính phủ ngày 16/8/2022: Ban hành Chương trình Quốc gia phát triển nuôi trồng thủy sản giai đoạn 2021 - 2030

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

- Amend, D.F. (1981). Potency testing of fish vaccines. International symposium on fish biologics: Serodiagnostics and vaccines. *Developments in Biological Standardization*, 49, 447-454.
- Balasubramanian, G., Sarathi, M., Venkatesan, C., Thomas, J., & Famed, A.S. (2008). Studies on the immunomodulatory effect of

- extract of *Cyanodon dactylon* in shrimp, *Penaeus monodon*, and its efficacy to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV). *Fish & Shellfish Immunology*, 25, 820–828
- FAO. (2021). Risk profile - Group B Streptococcus (GBS) – *Streptococcus agalactiae* sequence type (ST) 283 in freshwater fish. Bangkok.
- Fitzsimmons, K. (2004). Development of new products and market for the global tilapia trade. *Proceedings of ISTA*, 6, pp.624-633.
- 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.
- Harikrishnan, R., Kim, J.S., Kim, M.C., Balasundaram, C., & 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.
- Li, M., Wei, D., Huang, S., Huang, L., Xu, F., Yu, Q., ... & Li, P. (2022). Medicinal herbs and phytochemicals to combat pathogens in aquaculture. *Aquaculture International*, (3): 1239-1259
- Mohammed, H.H., Arias, C.R. (2016). Protective efficacy of *Nigella sativa* seeds and oil against columnaris disease in fishes. *Journal of Fish Diseases*, 39, 693–703.
- 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.
- Phuoc, N. N., Linh, N. T. H., Crestani, C., & Zadoks, R. N. (2021). Effect of strain and enviromental conditions on the virulence of *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococcus; GBS) in red tilapia (*Oreochromis* sp.). *Aquaculture*, 534, 736256.
- Rashidian, G., Mahboub, H. H., Fahim, A., Hefny, A. A., Prokić, M. D., Rainis, S., ... & Faggio, C. (2022). Mooseer (*Allium hirtifolium*) boosts growth, general health status, and resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Streptococcus iniae* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 120, 360-368.
- 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.
- Thanigaivel, S., Vijayakumar, S., Gopinath, S., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N., & Thomas, J. (2015). *In vivo* and *in vitro* antimicrobial activity of *Azadirachta indica* (Lin) against *Citrobacter freundii* isolated from naturally infected Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquaculture*, 437, 252-255.
- 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.
- Zhu, F. (2020). A review on the application of herbal medicines in the disease control of aquatic animals. *Aquaculture*, 526, 735422.