

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*

Nguyễn Thị Trúc Quyên^{1,2*}, Đoàn Văn Cường³, Mã Tú Lan³, Nguyễn Thành Nhân³,
Tư Thanh Dung⁴, Nguyễn Thị Ngọc Tĩnh³

¹Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh

²Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn tỉnh Đồng Nai

³Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II

⁴Trường Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

Ngày nhận bài 10/11/2022; ngày chuyển phản biện 14/11/2022; ngày nhận phản biện 6/12/2022; ngày chấp nhận đăng 9/12/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu nhằm đánh giá ảnh hưởng của cao chiết vỏ quế bổ sung vào thức ăn lên các chỉ số tăng trưởng và khả năng bảo vệ cá rô phi kháng lại vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* được phân lập từ cá rô phi (*Oreochromis* spp.) nhiễm bệnh thu tại huyện Củ Chi, TP Hồ Chí Minh. Cao chiết vỏ quế được bổ sung vào thức ăn với các tỷ lệ 10, 20 và 40 g/kg thức ăn. Cá thí nghiệm được gây cảm nhiễm bằng phương pháp tiêm xoang bụng với 0,1 ml vi khuẩn *S. agalactiae* có nồng độ $1,8 \times 10^4$ CFU/ml, nghiệm thức đối chứng âm tiêm 0,1 ml nước muối sinh lý. Kết quả cho thấy, việc bổ sung cao chiết vỏ quế với 3 hàm lượng như trên vào thức ăn đảm bảo an toàn cho sự sống và sinh trưởng của cá rô phi giống; thêm vào đó, bổ sung cao chiết vỏ quế với hàm lượng 20 g/kg thức ăn cho hiệu quả bảo vệ cao nhất (RPS=51,4%). Cao chiết vỏ quế là loại cao chiết thảo dược tiềm năng có thể sử dụng trong phòng bệnh do *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi.

Từ khóa: cao chiết vỏ quế, cá rô phi, *Streptococcus agalactiae*, tăng trưởng.

Chỉ số phân loại: 4.5

Đặt vấn đề

Cá rô phi là loài cá được nuôi phổ biến thứ hai trên thế giới, chỉ sau những loài cá chép [1]. Cá rô phi đã được đưa vào nuôi thương mại ở hơn 100 quốc gia và trở thành loài mang lại giá trị kinh tế cao trong nuôi trồng thủy sản [2]. *S. agalactiae* là nguyên nhân gây bệnh xuất huyết trên cá rô phi, gây ảnh hưởng đến việc nuôi cá rô phi trên thế giới [3]. Nghiên cứu của N.N. Phuoc và cs (2021) [4] cho thấy, chủng vi khuẩn được phân lập từ các mẫu cá rô phi đỏ có dấu hiệu xuất huyết và phù mắt tại Việt Nam là *S. agalactiae* kiểu huyết thanh III (tỉnh An Giang và Đồng Tháp) và Ia (tỉnh Thừa Thiên Huế). Thời gian gần đây, việc sử dụng thảo dược trong phòng trị bệnh nhiễm khuẩn đang ngày càng trở nên phổ biến, do có nhiều ưu điểm như: dễ tìm kiếm, giá thành thấp, hoạt tính kháng khuẩn cao, có khả năng kích thích hệ miễn dịch tự nhiên của vật chủ, thân thiện với môi trường và không gây nên hiện tượng đề kháng thuốc [5]. Bên cạnh đó, các chất kích thích miễn dịch thường được bổ sung vào thức ăn thủy sản bằng phương pháp cho ăn do có nhiều ưu điểm như: có tính kinh tế cao (tỷ lệ hao hụt ít), không gây stress cho thủy sản nuôi, sử dụng được trên bất kỳ giai đoạn nuôi nào của thủy sản... Tuy nhiên, việc bổ sung vào thức ăn các chất kích thích miễn dịch hoặc các thành phần đã được chứng minh có vai trò giúp kháng bệnh tốt nhất vào thức ăn không phải lúc nào cũng giúp đối tượng nuôi nâng cao hệ miễn dịch hoặc đạt được sự tăng trưởng tốt nhất [6, 7]. Trong nghiên cứu Nguyễn Thị Trúc Quyên và cs (2019) [8], cao chiết vỏ quế chiết xuất với dung môi ethanol 96% đã được đánh giá có khả năng đối kháng vi

khẩn gây bệnh xuất huyết, lồi mắt trên cá rô phi trong nuôi trồng thủy sản. Kết quả cho thấy, cao chiết vỏ quế đối kháng mạnh với vi khuẩn *S. agalactiae* (đường kính vòng vô khuẩn ≥ 15 mm). Trong nghiên cứu này, khảo sát ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vỏ quế vào thức ăn lên tăng trưởng và khả năng bảo vệ cá rô phi (*Oreochromis* spp.) kháng lại vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh xuất huyết và lồi mắt được tiến hành.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

Vỏ quế (phần thân) dùng trong nghiên cứu có nguồn gốc từ Viện Y Dược học Dân tộc TP Hồ Chí Minh. Chủng vi khuẩn *S. agalactiae* được phân lập từ cá rô phi (*Oreochromis* spp.) có dấu hiệu bệnh lý lồi mắt, xuất huyết hậu môn, gan nhạt màu thu tại Trung tâm Giống thủy sản và Cây trồng (huyện Củ Chi, TP Hồ Chí Minh) vào tháng 4/2019 (ký hiệu chủng: SA-2.1-CC).

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp chuẩn bị thức ăn thí nghiệm: Cao chiết vỏ quế được chiết xuất bằng 2 phương pháp: cao chiết vỏ quế sử dụng cho thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vào thức ăn lên tăng trưởng của cá rô phi được chiết xuất bằng phương pháp tách chiết với dung môi ethanol 96% ở nhiệt độ cao theo mô tả của Nguyễn Thị Trúc Quyên và cs (2019) [8]; cao chiết vỏ quế dùng cho thí nghiệm khảo sát khả năng bảo vệ cá rô phi kháng lại vi khuẩn *S. agalactiae* được chiết xuất bằng phương pháp ngâm

*Tác giả liên hệ: Email: nguyentructruyen306@gmail.com

Effect of cinnamon (*Cinnamomum verum*) extracts on the growth and protection ability of tilapia (*Oreochromis* spp.) against *Streptococcus agalactiae*

Thi Truc Quyen Nguyen^{1,2*}, Van Cuong Doan³,
Tu Lan Ma³, Thanh Nhan Nguyen³, Thanh Dung Tu⁴,
Thi Ngoc Tinh Nguyen³

¹Faculty of Biological Sciences, Nong Lam University, Ho Chi Minh City

²Dong Nai Department of Agriculture and Rural Development

³Research Institute for Aquaculture No.2

⁴College of Aquaculture and Fisheries, Can Tho University

Received 10 November 2022; accepted 9 December 2022

Abstract:

This study was conducted to investigate the effect of cinnamon (*Cinnamomum verum*) extract mixed to feed on growth parameters and the ability to protect tilapia against *Streptococcus agalactiae* isolated from infected tilapia (*Oreochromis* spp.) in Cu Chi district, Ho Chi Minh city. Cinnamon extract was mixed to feed with doses of 10, 20, and 40 g/kg feed. Fish were intraperitoneally injected with 0.1 ml of 1.8×10^4 CFU/ml of *S. agalactiae*. The negative control was injected with 0.1 ml of physiological saline. The results showed that the cinnamon extract (*C. verum*) mixed at the three above levels was shown to be safe for the growth and survival rate of tilapia. Moreover, cinnamon extracts well mixed at 20 g/kg feed proved the highest protection (with the relative percent survival (RPS) value being 51.4%). The cinnamon extract can be considered a potential herbal extract for the prevention of disease caused by *S. agalactiae* in tilapia.

Keywords: *Cinnamomum verum* extract, growth, *Oreochromis* spp., *Streptococcus agalactiae*.

Classification number: 4.5

kiệt theo mô tả của Đoàn Văn Cường và cs (2019) [9] (do cao chiết vỏ quế chiết xuất bằng phương pháp ngâm kiệt đã được sử dụng trong thí nghiệm *in vitro* trên cùng chủng vi khuẩn SA-2.1-CC). Cao chiết sau khi chuẩn bị được trộn vào thức ăn viên cho cá rô phi (thức ăn Cargill-7414 với thành phần dinh dưỡng cụ thể ở bảng 1) theo các tỷ lệ 10, 20 và 40 g/kg thức ăn. Sau đó, thức ăn đã được tẩm cao chiết được trộn trong 15 phút bằng máy trộn, rồi tiếp tục được sấy ở 40°C trong 4-5 giờ để còn bay hơi hết, bảo quản trong túi nylon kín ở nhiệt độ phòng và sử dụng trong 7 ngày.

Bảng 1. Thành phần dinh dưỡng của thức ăn dùng trong thí nghiệm (Cargill-7414) theo công bố trên bao bì sản phẩm.

STT	Thành phần	Hàm lượng (%)	STT	Thành phần	Hàm lượng (%)
1	Đạm tối thiểu	40	4	Canxi tối đa	0,5
2	Béo tối thiểu	5	5	Xơ tối đa	5
3	Muối tối đa	2,5	6	Độ ẩm tối đa	11

Phương pháp chuẩn bị cá thí nghiệm: Cá rô phi giống khoảng 3-5 g/con, có nguồn gốc từ Trung tâm Giống thủy sản và Cây trồng. Cá được vận chuyển về cơ sở thực nghiệm thuộc Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II (quận Gò Vấp, TP Hồ Chí Minh), cách ly và nuôi dưỡng 5 ngày trước khi tiến hành bố trí thí nghiệm trong bể composite thể tích 500 l có sục khí liên tục. Trước khi bắt đầu thí nghiệm, cá được kiểm tra sự hiện diện của *S. agalactiae* để đảm bảo hoàn toàn không mang mầm bệnh, bằng cách cấy trực tiếp mô lấy từ thận và não của 5 con cá ngẫu nhiên trên môi trường Bood Agar (BA, Merck) để kiểm tra sự phát triển của vi khuẩn.

Phương pháp xác định ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vỏ quế vào thức ăn lên tăng trưởng của cá rô phi: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên trên cá rô phi giống khoảng 5 g/con, kéo dài trong 8 tuần, được thực hiện trong các bể composite (hình 1) thể tích 500 l chứa 300 l nước, 30 con/bể, cho ăn 2 lần/ngày với 4% khối lượng thân/ngày [10] vào lúc 8 và 17 giờ. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, tổng cộng 12 bể, bao gồm các nghiệm thức thể hiện ở bảng 2.



Hình 1. Hệ thống bể thí nghiệm xác định ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vỏ quế vào thức ăn lên tăng trưởng của cá rô phi.

Bảng 2. Các nghiệm thức của thí nghiệm xác định ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vỏ quế vào thức ăn lên tăng trưởng của cá rô phi.

Nghiệm thức	Ký hiệu	Thức ăn
Đối chứng	ĐC	Không bổ sung thảo dược
	Q10	Bổ sung cao chiết vỏ quế với tỷ lệ 10 g/kg thức ăn
Bổ sung thảo dược	Q20	Bổ sung cao chiết vỏ quế với tỷ lệ 20 g/kg thức ăn
	Q40	Bổ sung cao chiết vỏ quế với tỷ lệ 40 g/kg thức ăn

Không thay nước trong quá trình thí nghiệm và tiến hành siphon 1 lần/ngày vào buổi chiều sau khi cho cá ăn khoảng 1 giờ. Sau khoảng 15 phút cho ăn tiến hành thu thức ăn thừa, quy đổi ra trọng lượng khô để tính toán lượng thức ăn thực tế. Các chỉ tiêu về chất lượng nước trong hệ thống gồm pH, nhiệt độ được theo dõi 1 lần/ngày vào buổi sáng bằng máy đo pH và nhiệt độ cầm tay P-3; chỉ tiêu DO, NH₃ và NO₂ được đo 2 lần/tuần bằng test kit.

Sau khi kết thúc 8 tuần thí nghiệm, thu toàn bộ cá trong các bể để đánh giá các chỉ tiêu tăng trưởng, tỷ lệ sống, FCR ở các nghiệm thức có bổ sung thảo dược vào thức ăn và so sánh với nghiệm thức đối chứng.

- Tỷ lệ sống của cá sau thí nghiệm (X, %) được tính như sau:

$$X = N_t/N_0 \times 100$$

- Tăng trọng khối lượng (WG, g) được tính như sau:

$$WG = W_2 - W_1$$

- Tăng trọng khối lượng theo ngày (DWG, g/ngày) được tính như sau:

$$DWG = (W_2 - W_1)/T$$

- Tốc độ tăng trưởng đặc hiệu theo khối lượng (SGR, %/ngày) được tính như sau:

$$SGR = [\ln(W_2) - \ln(W_1)]/T \times 100$$

- Hệ số chuyển đổi thức ăn (FCR) được tính như sau:

$$FCR = \text{Tổng lượng thức ăn tiêu thụ} / (W_2 - W_1)$$

trong đó: N_t: số lượng cá cuối thí nghiệm; N₀: số lượng cá ban đầu thí nghiệm; W₁: trọng lượng cá (g/con) khi bắt đầu thí nghiệm; W₂: trọng lượng cá (g/con) khi kết thúc thí nghiệm; T: thời gian thí nghiệm.

Phương pháp xác định ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vỏ quế lên khả năng bảo vệ cá rô phi kháng lại vi khuẩn S. agalactiae:

Thí nghiệm 1: Để xác định liều vi khuẩn *S. agalactiae* gây chết cá (LD₅₀), tiến hành bố trí thí nghiệm với 5 nồng độ gây nhiễm khác nhau bằng phương pháp tiêm vi khuẩn vào xoang bụng cá. Thí nghiệm được thực hiện trong các bể nhựa thể tích nước 40 l, trên cá rô phi giống (4-5 g/con), mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Cá thí nghiệm được tiêm 0,1 ml của dịch vi khuẩn với các mật độ: 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ và 10⁷ CFU/ml, sục khí và cho ăn trong quá trình thí nghiệm. Ở nghiệm thức đối chứng tiêm 0,1 ml nước muối sinh lý 9‰. Cá được ghi nhận tỷ lệ chết trong 8 ngày sau khi gây nhiễm

(trừ những con chết trong vòng 5 giờ sau khi tiêm). Trong suốt thời gian thí nghiệm, nhiệt độ đo được phù hợp với sự phát triển của vi khuẩn là 28°C. Không thay nước trong quá trình gây nhiễm và tiến hành siphon 1 lần/ngày.

Liều gây chết LD₅₀ được xác định theo công thức của L.J Reed và H. Muench (1938) [11] như sau:

$$LD_{50} = 10^{a-x}$$

trong đó: a là số lũy thừa mà tại đó vi khuẩn gây chết cá thấp nhất (nhưng phải trên 50%); x = (P_a - 50)/(P_a - P_u), với P_a là tỷ lệ chết cận trên 50% và P_u là tỷ lệ chết cận dưới 50%.

Thí nghiệm 2: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên trên cá rô phi giống khoảng 3 g/con trong các bể nhựa thể tích 90 l (hình 2), mật độ 40 con/bể, cho ăn 4% khối lượng thân/ngày [10]. Các nghiệm thức được bố trí tương tự nghiệm thức tại mục Phương pháp xác định ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vỏ quế vào thức ăn lên tăng trưởng của cá rô phi. Mỗi nghiệm thức lặp lại 6 lần, tổng cộng 24 bể. Các chỉ tiêu về chất lượng nước trong hệ thống được theo dõi tương tự thí nghiệm xác định ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vỏ quế vào thức ăn lên tăng trưởng của cá rô phi. Cá thí nghiệm được nuôi trong 28 ngày, sau đó thu toàn bộ cá trong các bể để đánh giá các chỉ tiêu tăng trưởng, tỷ lệ sống, FCR, so sánh giữa nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức thí nghiệm.



Hình 2. Hệ thống bể thí nghiệm xác định ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vỏ quế lên khả năng bảo vệ cá rô phi kháng lại vi khuẩn *S. agalactiae*.

Sau 28 ngày nuôi, mỗi nghiệm thức ở thí nghiệm 2 được phân thành 2 nhóm, gồm 3 nghiệm thức/nhóm, tổng cộng 12 bể/nhóm. Sau đó, tiến hành gây cảm nhiễm 30 con/nghiệm thức/nhóm với vi khuẩn *S. agalactiae* bằng phương pháp tiêm xoang bụng với 0,1 ml vi khuẩn *S. agalactiae* chủng SA-2.1-CC theo kết quả xác định LD₅₀. Cá sau khi cảm nhiễm vi khuẩn được cho ăn 4% khối lượng thân/ngày bằng thức ăn có hoặc không bổ sung cao chiết vỏ quế. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, gồm nghiệm thức đối chứng (đối chứng âm: cá được tiêm nước muối sinh lý không cho ăn thức ăn bổ sung thảo dược; đối chứng dương: cá được tiêm vi khuẩn và không cho ăn thức ăn bổ sung thảo dược), nhóm nghiệm thức 1 (sau khi gây nhiễm, cá được cho ăn thức ăn không bổ sung thảo dược) và nhóm nghiệm thức 2 (sau khi gây nhiễm, cá được tiếp tục cho ăn thức ăn bổ sung thảo dược). Các nghiệm thức cụ thể được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Các nghiệm thức của thí nghiệm xác định khả năng bảo vệ cá của cao chiết vỏ quế.

Nghiem thức	Ký hiệu	Thức ăn	Sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn
Đối chứng	ĐC	Không bổ sung thảo dược	3 bể đối chứng âm 3 bể đối chứng dương
Bổ sung thảo dược	Q10	Bổ sung cao chiết vỏ quế với tỷ lệ 10 g/kg thức ăn	Nhóm 1: 3 bể cho ăn thức ăn không bổ sung cao chiết vỏ quế
	Q20	Bổ sung cao chiết vỏ quế với tỷ lệ 20 g/kg thức ăn	Nhóm 2: 3 bể tiếp tục cho ăn thức ăn bổ sung cao chiết vỏ quế với các hàm lượng như trước khi cảm nhiễm.
	Q40	Bổ sung cao chiết vỏ quế với tỷ lệ 40 g/kg thức ăn	

Trong thời gian 10 ngày sau khi gây cảm nhiễm, tiến hành theo dõi, ghi nhận số cá chết, tình trạng sức khỏe của cá hàng ngày. 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 D.F. Amend (1981) [12]:

$RPS (\%) = [1 - (\text{Số cá chết ở nghiệm thức thí nghiệm} / \text{số cá chết ở nghiệm thức ĐC dương})] \times 100$

Phương pháp phân tích thống kê: Tất cả các số liệu được nhập và lưu trữ bằng Excel. Các số liệu (trừ các thông số môi trường nước, LD₅₀ và 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%.

Kết quả và bàn luận

Thí nghiệm xác định ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vỏ quế vào thức ăn lên tăng trưởng của cá rô phi

Trong suốt thời gian thí nghiệm, các yếu tố môi trường nước đều nằm trong khoảng giới hạn phù hợp cho sự tăng trưởng và đảm bảo sức khỏe cá (chi tiết thể hiện ở bảng 4).

Bảng 4. Giá trị các thông số môi trường nước trong thí nghiệm ảnh hưởng của bổ sung cao chiết vỏ quế vào thức ăn lên tăng trưởng của cá rô phi.

Thông số	Giá trị đo được	Giá trị thích hợp [13]
Nhiệt độ (°C)	25-29	24-36
pH	6,5-7,1	6,5-8,0
DO (mg/l)	4,5-6	≥3
NH ₃ (mg/l)	<0,1	<0,1
NO ₂	0	0

Trong suốt 8 tuần thí nghiệm, cá có biểu hiện sức khỏe tốt, bơi lội nhanh nhẹn, bắt mồi tích cực. Khi kết thúc thí nghiệm, tỷ lệ sống ở tất cả các nghiệm thức là khá cao (đều trên 94%) và nghiệm thức được bổ sung cao chiết vỏ quế với hàm lượng 40 g/kg cho tỷ lệ sống cao nhất (98,89%), tuy nhiên sự khác biệt giữa tất cả các nghiệm thức không có ý nghĩa về mặt thống kê ($p > 0,05$). Các thông số liên quan đến tỷ lệ sống và tăng trưởng của cá thí nghiệm được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Tăng trưởng của cá trong thí nghiệm ảnh hưởng của bổ sung cao chiết vỏ quế vào thức ăn lên tăng trưởng của cá rô phi.

Chỉ tiêu	ĐVT	Nghiem thức			
		Q10	Q20	Q40	ĐC
W_1	g	5,17±0,17 ^a	5,19±0,28 ^a	5,20±0,15 ^a	5,21±0,14 ^a
W_2	g				
4 tuần		11,27±1,00 ^a	10,23±0,50 ^a	11,13±1,66 ^a	11,17±1,75 ^a
8 tuần		22,02±0,33 ^a	21,03±0,56 ^a	20,57±0,77 ^a	20,84±1,55 ^a
WG	g				
4 tuần		6,10±0,93 ^a	5,04±0,39 ^a	5,93±1,56 ^a	5,96±1,62 ^a
8 tuần		16,85±0,38 ^a	15,85±0,83 ^a	15,37±0,75 ^a	15,63±1,42 ^a
DWG	g/ngày				
4 tuần		0,22±0,35 ^a	0,18±0,02 ^a	0,21±0,06 ^a	0,21±0,06 ^a
8 tuần		0,28±0,01 ^a	0,26±0,01 ^a	0,26±0,01 ^a	0,26±0,03 ^a
SGR	%/ngày				
4 tuần		1,30±0,13 ^a	1,13±0,08 ^a	1,26±0,21 ^a	1,26±0,22 ^a
8 tuần		2,42 ± 0,06 ^a	2,33 ± 0,13 ^a	2,29 ± 0,07 ^a	2,30 ± 0,08 ^a
FCR					
4 tuần		1,28±0,18 ^a	1,24±0,17 ^a	1,33±0,33 ^a	1,38±0,26 ^a
8 tuần		1,48±0,02 ^a	1,38±0,14 ^a	1,50±0,06 ^a	1,54±0,08 ^a
TLS	%	94,44±3,85 ^a	96,66±5,77 ^a	98,89±1,92 ^a	94,45±6,93 ^a

Ghi chú: ĐC: đối chứng; Q: quế; ĐVT: đơn vị tính. Số liệu thể hiện giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn; trên cùng một hàng, các chữ giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Kết quả bảng 5 cho thấy, trọng lượng trung bình lúc ban đầu, trọng lượng sau 4 tuần và 8 tuần thí nghiệm của cá tương đương nhau ở các nghiệm thức và sự khác biệt này không có ý nghĩa về mặt thống kê ($p > 0,05$). Kết quả tăng trọng khối lượng (WG) ở các nghiệm thức cho thấy có sự khác biệt, tuy nhiên những sự khác biệt này không có ý nghĩa về mặt thống kê ($p > 0,05$). WG của cá thí nghiệm ở nghiệm thức đối chứng đạt mức trung bình so với các nghiệm thức được bổ sung cao chiết vỏ quế vào thức ăn và WG của cá cao nhất ở hàm lượng bổ sung cao chiết thấp nhất (10 g/kg). Kết quả này được lặp lại khi so sánh tốc độ tăng trưởng đặc hiệu theo khối lượng (SGR) giữa các nghiệm thức. Như vậy, kết quả nghiên cứu này phù hợp với nhận định của nhiều nhà nghiên cứu khi cho rằng, các thành phần đã được chứng minh có vai trò giúp kháng bệnh tốt nhất được bổ sung vào thức ăn có thể làm cho động vật nuôi không đạt được sự tăng trưởng nhanh nhất [6]. Nghiên cứu của D. Ndong và cs (2007) [14] thực hiện trên cá rô phi lai (*O. niloticus* x *O. aureus*) trong 4 tuần với khẩu phần ăn có 0,5% tỏi cho thấy, loại thức ăn này có tác dụng nâng cao miễn dịch nhưng không cải thiện tăng trưởng. Một nghiên cứu khác cũng cho thấy, sự có mặt của đinh hương (*Syzygium aromaticum*) trong thức ăn ảnh hưởng đến tăng trọng của nhiều loại thủy sản [15].

Với chỉ tiêu FCR, cá ở nghiệm thức đối chứng có FCR cao nhất (1,54), cá ở nghiệm thức được ăn thức ăn bổ sung cao chiết vỏ quế với hàm lượng 20 g/kg có FCR thấp nhất (1,38), tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Hệ số FCR của cá trong thí nghiệm này tương đương với hệ số FCR ghi nhận được ở các nghiên cứu đã thực hiện trên cá rô phi.

Kết quả xác định liều vi khuẩn *S. agalactiae* gây chết cá (LD_{50})

Chủng vi khuẩn phân lập từ huyện Củ Chi, TP Hồ Chí Minh (SA-2.1-CC) có giá trị $LD_{50}=10^{3,12}$ CFU/ml ($1,3 \times 10^3$ CFU/ml), thấp hơn các giá trị LD_{50} trên cá rô phi đã được công bố (khoảng 10^5 - 10^6 CFU/ml). Kết quả cụ thể được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Kết quả xác định LD_{50} của chủng vi khuẩn SA-2.1-CC.

Mật độ vi khuẩn (CFU/ml)	Số cá (con)					Tỷ lệ chết cộng dồn (%)	Giá trị LD_{50} (CFU/ml)
	Ban đầu	Chết	Sống	Chết cộng dồn	Sống cộng dồn		
10^7	36	31	5	31	5	86,1	$1,3 \times 10^3$
10^6	36	24	12	55	17	76,4	
10^5	36	21	15	76	32	70,4	
10^4	36	8	28	84	60	58,3	
10^3	36	4	32	88	92	48,9	

Chú thích: số cá sống cộng dồn, số cá chết cộng dồn tính từ nghiệm thức có nồng độ vi khuẩn cao nhất đến từng nghiệm thức có nồng độ thấp hơn.

Thí nghiệm xác định ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vỏ quế lên khả năng bảo vệ cá rô phi kháng lại vi khuẩn *S. agalactiae*

Trong quá trình thực hiện thí nghiệm, các chỉ tiêu chất lượng nước được theo dõi hàng ngày nhằm đảm bảo môi trường thuận lợi và ổn định cho sự sống và phát triển của cá thí nghiệm. Qua theo dõi cho thấy, các yếu tố môi trường nước có sự biến động tuy nhiên vẫn nằm trong ngưỡng thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cá thí nghiệm (bảng 7).

Bảng 7. Giá trị các thông số môi trường nước trong thí nghiệm ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết thảo dược lên khả năng bảo vệ cá rô phi kháng lại vi khuẩn *S. agalactiae*.

Thông số	Giá trị đo được	Giá trị thích hợp [13]
Nhiệt độ (°C)	27-30	24-36
pH	6,5-7,9	6,5-8,0
DO (mg/l)	6-10	≥ 3
NH_3 (mg/l)	<0,01	<0,1
NO_2	0	0

Các thông số liên quan đến tỷ lệ sống và tăng trưởng của cá thí nghiệm được trình bày ở bảng 8. Ghi nhận trong suốt 28 ngày thí nghiệm cho thấy, cá có biểu hiện sức khỏe tốt, bơi lội nhanh nhẹn, bắt mồi tích cực. Kết thúc 28 ngày nuôi tỷ lệ sống ở hầu hết các

nghiệm thức đều cao hơn 87%. Nghiệm thức đối chứng cho tỷ lệ sống cao nhất (trên 90% trong khi các nghiệm thức bổ sung thảo dược đều dưới 90%), tuy nhiên sự khác biệt giữa tất cả các nghiệm thức không có ý nghĩa về mặt thống kê ($p>0,05$).

Bảng 8. Tăng trưởng của cá trong thí nghiệm xác định ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết thảo dược lên khả năng bảo vệ cá rô phi kháng lại vi khuẩn *S. agalactiae*.

Chỉ tiêu	ĐVT	Nghiệm thức			
		Q10	Q20	Q40	ĐC
W_1	g	$3,86 \pm 0,10^a$	$3,80 \pm 0,12^a$	$3,74 \pm 0,05^a$	$3,83 \pm 0,05^a$
W_2	g	$7,33 \pm 0,09^a$	$7,33 \pm 0,04^a$	$7,26 \pm 0,10^a$	$7,33 \pm 0,06^a$
WG	g	$3,47 \pm 0,09^a$	$3,53 \pm 0,11^a$	$3,51 \pm 0,09^a$	$3,51 \pm 0,06^a$
DWG	g/ngày	$0,12 \pm 0,00^a$	$0,13 \pm 0,00^a$	$0,13 \pm 0,00^a$	$0,12 \pm 0,00^a$
SGR	%/ngày	$2,29 \pm 0,08^a$	$2,35 \pm 0,11^a$	$2,37 \pm 0,05^a$	$2,32 \pm 0,04^a$
FCR		$2,25 \pm 0,22^a$	$2,19 \pm 0,14^a$	$2,32 \pm 0,60^a$	$2,12 \pm 0,26^a$
TLS	%	$87,50 \pm 5,00^a$	$87,50 \pm 3,54^a$	$87,08 \pm 7,81^a$	$91,25 \pm 5,18^a$

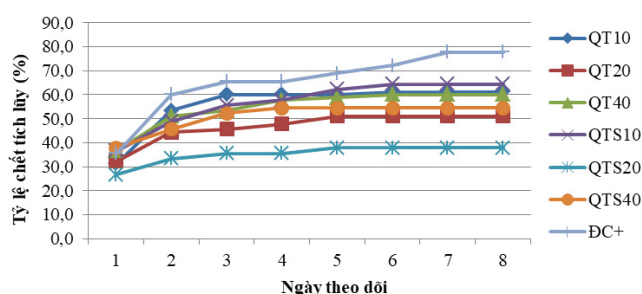
Ghi chú: ĐC: đối chứng; Q: quế; ĐVT: đơn vị tính. Số liệu thể hiện giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn; trên cùng một hàng, các chữ giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Kết quả phân tích ở bảng 8 cho thấy, trọng lượng trung bình lúc ban đầu, trọng lượng sau 28 ngày nuôi của cá thí nghiệm tương đương nhau ở các nghiệm thức và sự khác biệt này không có ý nghĩa về mặt thống kê ($p>0,05$). Kết quả DWG, SGR và FCR ở các nghiệm thức cho thấy có sự khác biệt, tuy nhiên những sự khác biệt này không có ý nghĩa về mặt thống kê ($p>0,05$).

Về tình trạng cá sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*, cá ở các nghiệm thức (trừ nghiệm thức đối chứng âm) bắt đầu có các biểu hiện bệnh lý như: bỏ ăn, bơi lơ dờ trên mặt nước, mắt cá lồi và đục (hình 3). Trong vòng 24 giờ sau cảm nhiễm, cá ở các bể bắt đầu chết với số lượng khá nhiều so với các công bố trước đây (hình 4), điều này có thể là do độc lực của vi khuẩn dùng trong nghiên cứu cao. Đến ngày thứ 2, số cá chết ở tất cả các nghiệm thức bắt đầu giảm dần và ngưng chết ở ngày thứ 6. Riêng nghiệm thức đối chứng âm, cá không chết và cũng không có biểu hiện bất thường trong suốt thời gian theo dõi, trong khi đó cá ở nghiệm thức dương chết nhiều từ 24 giờ đầu tiên sau cảm nhiễm và có biểu hiện các dấu hiệu bệnh lý trên cơ thể. Hiệu quả bảo vệ của cao chiết vỏ quế với cá rô phi được cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* được trình bày ở bảng 9. Cao chiết vỏ quế với hàm lượng 20 g/kg đều cho hiệu quả bảo vệ cao nhất ở các nghiệm thức nhóm 1 và nhóm 2.



Hình 3. Cá biểu hiện lồi mắt, xuất huyết vây mang sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*.



T: cho ăn thức ăn không bổ sung cao chiết vỏ quế sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn.
TS: tiếp tục cho ăn thức ăn bổ sung cao chiết vỏ quế sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn.

Hình 4. Tỷ lệ cá chết tích lũy theo ngày sau cảm nhiễm.

Bảng 9. Hiệu quả bảo vệ của cao chiết vỏ quế với cá rô phi khi gây cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae*.

Hàm lượng cao chiết vỏ quế (g/kg thức ăn)	RPS (%)	
	Nghiệm thức 1	Nghiệm thức 2
10	21,4	17,1
20	34,3	51,4
40	22,9	30,0

Ghi chú: RPS: tỷ lệ sống tương đối; nghiệm thức 1: sau khi gây nhiễm, cá được cho ăn thức ăn không bổ sung thảo dược; nghiệm thức 2: sau khi gây nhiễm, cá được tiếp tục cho ăn thức ăn bổ sung thảo dược.

Tỷ lệ cá chết tích lũy theo ngày sau cảm nhiễm (hình 4) của các nghiệm thức được bổ sung cao chiết vỏ quế trong thức ăn đều thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng. Ở nhóm các nghiệm thức cá được cho ăn thức ăn không bổ sung cao chiết vỏ quế sau khi được cảm nhiễm với vi khuẩn, việc bổ sung với hàm lượng 20 g/kg trong giai đoạn nuôi 28 ngày cho hiệu quả bảo vệ cao nhất (RPS đạt 34,3%). Trong khi đó, ở nhóm các nghiệm thức cá được tiếp tục cho ăn thức ăn bổ sung cao chiết vỏ quế sau khi được cảm nhiễm với vi khuẩn, hàm lượng bổ sung 20 g/kg cũng cho hiệu quả bảo vệ cao nhất và trên 50%. So sánh giữa hai nhóm nghiệm thức, ghi nhận ở hàm lượng 10 g/kg thức ăn cao chiết vỏ quế được bổ sung, RPS của nghiệm thức cá được tiếp tục cho ăn thức ăn bổ sung cao chiết vỏ quế (17,1%) thấp hơn RPS của nghiệm thức chỉ được cho ăn thức ăn bổ sung cao chiết vỏ quế giai đoạn trước khi cảm nhiễm với vi khuẩn (21,4%). Hiệu quả bảo vệ cá rô phi trong thí nghiệm của chúng tôi thấp hơn kết quả khi bổ sung 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 được thực hiện bởi G.W. Liang và cs (2019) [16], với chỉ số RPS lần lượt là 75 và 62,5%. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của G.W. Liang và cs (2019) [16], cá có sự chênh lệch khá lớn so với trong thí nghiệm này (100-150 g/con).

Các loại cây thảo mộc từ thiên nhiên đã được y học cổ truyền chứng minh hiệu quả chữa trị những bệnh nan y cũng như bồi bổ cơ thể trên người. Nghiên cứu áp dụng những kinh nghiệm của y học cổ truyền để bào chế các chế phẩm từ cây dược liệu có chứa các chất kháng khuẩn để thay thế cho việc sử dụng kháng sinh là một hướng tiếp cận mới và đã được ứng dụng từ lâu trong chăn nuôi. Lã Văn Kính và cs (2012) [17] đã nghiên cứu các quy trình chiết cao bằng phương pháp chiết ngâm kiệt của 10 loại thảo

được, đó là: cây bộ mả (*Pouzolzia zeylanica*), xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*), hoàng liên ô rô (*Mahonia neplensis* DC.), dây cóc (*Tinospora crispa*), gừng (*Zingiber officinale*), vàng đắng (*Coscinium fenestratum*), sài đất (*Wedelia chinensis*), cam thảo (*Glycyrrhiza uralensis*), nghệ (*Curcuma longa*) và hoàng kỳ Mông Cổ (*Astragalus membranaceus*). Nhóm tác giả đã bào chế được 6 loại chế phẩm, trong đó 4 chế phẩm được nghiên cứu khá hoàn thiện. Việc bổ sung các chế phẩm thảo dược vào thức ăn cho gà và lợn đã cải thiện được tăng trọng, giảm tiêu tốn thức ăn, giảm tỷ lệ chết, giảm tỷ lệ tiêu chảy. Trên động vật thủy sản, bên cạnh khả năng kháng khuẩn, các chiết xuất thảo dược đã được chứng minh có tác dụng trên cả tôm và cá nuôi với các vai trò như kích thích tăng trưởng [18-20]; kháng khuẩn và các tác nhân truyền nhiễm khác [21-23]. Theo J.Y. Lee và Y. Gao (2012) [24], các loại thảo mộc hoạt động như là một hương vị, do đó ảnh hưởng đến sự thèm ăn như tiết dịch tiêu hóa và tăng lượng thức ăn ăn vào, đồng thời làm giảm FCR. Nhiều báo cáo đã ghi nhận hiệu quả của các loại thảo mộc như là chất kích thích khả năng bắt mồi và thúc đẩy tăng trưởng trong các loài thủy sản.

Tác giả G. Yin và cs (2008) [25] đã 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, các loại thảo dược này đã hoạt động như các chất kích thích miễn dịch, giúp cải thiện tình trạng miễn dịch và khả năng kháng bệnh của cá thí nghiệm. 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*. Kết quả thí nghiệm *in vivo* trong nghiên cứu của P. Rattanachaiakunsopon và P. Phumkhachorn (2009) [5] cho thấy, khi 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*. Nghiên cứu của R. Harikrishnan và cs (2010) [26] trên cá vàng (*Carassius auratus*) cho thấy, cá được phòng bệnh bằng cách bổ sung vào khẩu phần ăn 400 và 800 mg/kg cao chiết thảo dược trước khi gây cảm nhiễm bằng vi khuẩn *A. hydrophila* có tỷ lệ chết dao động 25-30%. Cao chiết thảo dược sử dụng trong thí nghiệm là sự phối hợp từ 3 loại thảo dược gồm cây sấu đầu (*Azadirachta indica*), hương nhu tím (*Ocimum sanctum*) và củ nghệ (*Curcuma longa*). Theo Mai Thanh Thanh và Bùi Thị Bích Hằng (2018) [27], sau 14 ngày cho cá điêu hồng (*Oreochromis* sp.) ăn thức ăn bổ sung tỏi (*Allium sativum*) và cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*, tỷ lệ chết của cá ở nghiệm thức bổ sung tỏi tươi với hàm lượng 0,5 và 1% (70%) và nghiệm thức bổ sung bột tỏi với hàm lượng 0,25% (36,7%) đều giảm so với cá ở nghiệm thức đối chứng (86,7%).

Kết luận

Bổ sung cao chiết vỏ quế với các hàm lượng 10, 20 và 40 g/kg vào thức ăn đảm bảo an toàn cho sự sống và sinh trưởng của cá rô phi giống; giúp làm giảm tỷ lệ chết khi cá được gây nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*. Việc bổ sung cao chiết vỏ quế với hàm lượng 20 g/kg thức ăn hiệu quả bảo vệ cao nhất (RPS=51,4%) đối với cá rô phi giống gây nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae* chủng SA-2.1-

CC (có giá trị LD_{50} là $1,3 \times 10^3$ CFU/ml). Vò quế là thảo dược tiềm năng, có triển vọng ứng dụng cao trong việc phòng và trị bệnh do *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi. Cần tiếp tục thực hiện các nghiên cứu chuyên sâu, đánh giá ảnh hưởng của cao chiết vò quế khi trộn vào thức ăn lên các chỉ tiêu miễn dịch trên cá rô phi.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí bởi Quỹ Phát triển KH&CN TP Hồ Chí Minh, Sở KH&CN TP Hồ Chí Minh cho Trung tâm Quan trắc Môi trường và Bệnh thủy sản Nam Bộ (Hợp đồng số 26/2018/HĐ-QKHCN); chủng vi khuẩn SA-2.1-CC dùng trong nghiên cứu được cung cấp bởi nhóm nghiên cứu của ông Đoàn Văn Cường - Chủ nhiệm đề tài. Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II và Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện thuận lợi và hỗ trợ nhóm trong quá trình thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] K. Fitzsimmons (2004), "Development of new products and markets for the global tilapia trade", *Proceedings of ISTA*, **6**, pp.624-633.
- [2] W.L. Shelton, T.J. Popma (2006), *Tilapia Biology, Culture and Nutrition*, The Haworth Press Inc, pp.1-49.
- [3] J.J. Evans, P. Klesius, C. Shoemaker, D. Pasnik (2006), "Identification and epidemiology of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* in tilapia, *Oreochromis* spp.", *International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, **7**, pp.25-42.
- [4] N.N. Phuoc, N.T.H. Linh, C. Crestani, R.N. Zadoks (2021), "Effect of strain and environmental conditions on the virulence of *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*; GBS) in red tilapia (*Oreochromis* sp.)", *Aquaculture*, **534**, pp.736256-73257.
- [5] P. Rattanachaiakunsopon, P. Phumkhachorn (2009), "Prophylactic effect of *Andrographis paniculata* extracts against *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)", *Journal Bioscience Bioengineer*, **107**(5), pp.579-582.
- [6] J. Galindo-Villegas, H. Hosokawa (2004), *Immunostimulants: Towards Temporary Prevention of Diseases in Marine Fish*, Avances en Nutricion Acuicola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutricion Acuicola, Hermosillo, Sonora, Mexico, pp.16-19.
- [7] M. Sakai (1999), "Current research status of fish immunostimulants", *Aquaculture*, **172**(1-2), pp.63-92.
- [8] Nguyễn Thị Trúc Quyên, Lê Linh Chi, Đoàn Văn Cường và cs (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, Trường Đại học Nha Trang*, **3**, tr.124-132.
- [9] Đoàn Văn Cường, Nguyễn Thị Ngọc Tình, Mã Tú Lan, Nguyễn Thành Nhân (2019), "Khảo sát tính kháng khuẩn của cao chiết quế (*Cinnamomum verum*) và gừng (*Zingiber officinale* Rose) tách chiết bằng ethanol đối với các chủng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* phân lập trên cá rô phi giống (*Oreochromis* spp.)", *Tạp chí Nghề cá sông Cửu Long*, **15**, tr.3-13.
- [10] R.C. Bhujel (2013), "On-farm feed management practices for Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Thailand", *On-farm Feeding and Feed Management in Aquaculture*, FAO, pp.59-189.
- [11] L.J. Reed, H. Muench (1938), "A simple method of estimating fifty per cent endpoints", *American Journal of Epidemiology*, **27**(3), pp.493-497.
- [12] D.F. Amend (1981), "Potency testing of fish vaccines. International symposium on fish biologics: Serodiagnostics and vaccines", *Developments in Biological Standardization*, **49**, pp.447-454.
- [13] 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/BNNPTNT.
- [14] D. Ndong, Y.Y. Chen, Y.H. Lin, et al. (2007), "The immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures", *Fish and Shellfish Immunology*, **22**(6), pp.686-694.
- [15] T. Mohan (2004), *Pharmacological screening of some medicinal plants as antimicrobial and feed additives*, Master of Science in Animal and Poultry Sciences (Pharmacology), Department of Animal and Poultry Science Virginia Polytechnic Institute and State University, 81pp.
- [16] G.W. Liang, H.W. Deng, F. Wang, et al. (2019), "In vitro and in vivo screening of herbal extracts against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)", *Aquaculture*, **503**, pp.412-421.
- [17] Lã Văn Kinh, Châu Văn Minh, Phan Văn Kiêm và cs (2012), "Nghiên cứu một số chế phẩm có nguồn gốc thảo dược trong chăn nuôi lợn và gia cầm", *Kỷ yếu Hội nghị khoa học năm 2012*, tr.372-390.
- [18] M. Reverter, N. Bontemps, D. Lecchini, et al. (2014), "Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives", *Aquaculture*, **433**, pp.50-61.
- [19] G. Jeney, L.D. Wet, Z. Jeney, G. Yin (2015), "Plant extracts", *Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health*, Wiley Online Library, pp.321-332.
- [20] T. Citarasu, M.M. Babu, R.R.J. Sekar, M.P. Marian (2002), "Developing Artemia enriched herbal diet for producing quality larvae in *Penaeus monodon*, Fabricius", *Asian Fisheries Science*, **15**, pp.21-32.
- [21] A. Adigüzel, G. Medine, B. Meryem, et al. (2005), "Antimicrobial effects of *Ocimum basilicum* (Labiatae) extract", *Turkish Journal Biology*, **29**(3), pp.155-160.
- [22] G. Immanuel, V.C.B. Vincy, A. Palavesam, M.M. Peter (2004), "Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles", *Aquaculture*, **236**(1-4), pp.53-65.
- [23] R. Praseetha (2005), *Enrichment of Brine Shrimp Artemia Franciscana with Commercial Probiotics and Herbal Extracts and Their Resistance Against Shrimp Pathogen Vibrio sp. (Vibrio parahaemolyticus and Vibrio damsela)*, Manonmaiam Sundaranar University, India.
- [24] J.Y. Lee, Y. Gao (2012), "Review of the application of garlic, *Allium sativum*, in aquaculture", *Journal of The World Aquaculture Society*, **43**(4), pp.447-458.
- [25] G. Yin, L. Ardo, Z. Jeney, et al. (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, Philippines, pp.269-282.
- [26] R. Harikrishnan, B. Chellam, H.M. Soo (2010), "Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*", *Fish and Shellfish Immunology*, **28**(2), pp.354-361.
- [27] 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.