

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG KHÁNG VI KHUẨN *Streptococcus agalactiae* CỦA CÁC LOẠI CAO CHIẾT THẢO DƯỢC TRÊN CÁ RÔ PHI (*Oreochromis* sp.)

Châu Thùy Phương, Hồ Thị Kim My, Nguyễn Thị Quỳnh Nga, Trương Thị Thùy Duyên, Nguyễn Anh Xuân, Nguyễn Thị Huệ Linh, Nguyễn Ngọc Phước*

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

*Tác giả liên hệ: nguyennhocphuoc@huaf.edu.vn

Nhận bài: 12/11/2022 Hoàn thành phần biên: 06/12/2022 Chấp nhận bài: 19/12/2022

TÓM TẮT

Nghiên cứu đánh giá khả năng kháng các chủng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* thuộc kiểu huyết thanh III và Ib trên cá rô phi của một số loại cao chiết thảo dược: tía tô (*Perilla frutescens*), kinh giới (*Elsholtzia ciliata*), bạch chỉ (*Angelica dahurica*), xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*), cỏ mực (*Eclipta prostrata*), cỏ gà (*Cynodon dactylon*), sài đất (*Wedelia chinensis*), mướp đắng (*Momordica charantia*). Các loại cao chiết được chiết xuất trong 3 loại dung môi: nước cất, ethanol 96% và methanol 99,8%, được xử lý nhiệt và cô quay để loại bỏ dung môi. Kết quả đánh giá khả năng kháng khuẩn của 4 loại cao chiết từ thảo dược cho thấy: tía tô, kinh giới, xuyên tâm liên và cỏ mực trong dung môi nước cất cho khả năng kháng khuẩn cao nhất với các chủng *Streptococcus agalactiae* ST283 kiểu huyết thanh III and *S. agalactiae* ST1395 kiểu huyết thanh Ib. 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. Cao chiết của 4 loại thảo dược an toàn cho cá rô phi ở các nồng độ MBC, 2x MBC và 10x MBC. Kết quả nghiên cứu khả năng kháng *S. agalactiae* trong điều kiện *in vivo* của 4 loại cao chiết thảo dược này bằng phương pháp tiêm đã chứng minh khả năng bảo vệ cao cho cá rô phi chống lại vi khuẩn gây bệnh, cho thấy tiềm năng ứng dụng các loại cao chiết này trong nuôi trồng thủy sản nhằm phòng và trị bệnh do *S. agalactiae* gây ra trên cá.

Từ khóa: Cao chiết thảo dược, Khả năng kháng khuẩn, *Streptococcus agalactiae*, Cá rô phi, *Oreochromis* sp.

STUDY ON THE ANTIBACTERIAL EFFECT OF HERBAL EXTRACTS ON *Streptococcus agalactiae* IN TILAPIA (*Oreochromis* sp.)

Chau Thuy Phuong, Ho Thi Kim My, Nguyen Thi Quynh Nga, Trương Thị Thùy Duyên, Nguyễn Anh Xuân, Nguyễn Thị Huệ Linh, Nguyễn Ngọc Phước*

University of Agriculture and Forestry, Hue University

ABSTRACT

The current study was conducted to investigate the antagonism effect towards *Streptococcus agalactiae* serotype III and *S. agalactiae* serotype Ib in tilapia (*Oreochromis* sp.) by herbal extracts, namely perilla leaf (*Perilla frutescens*), Vietnamese balm (*Elsholtzia ciliata*), angelica (*Angelica dahurica*), king of bitter (*Andrographis paniculata*), white eclipta (*Eclipta prostrata*), bermuda grass (*Cynodon dactylon*), wedelia grass (*Wedelia chinensis*), bitter melon (*Momordica charantia*). The extracts of these herbs were prepared in distilled water, ethanol 96% or methanol 99.8%, which were subsequently subjected to heat treatment and vacuum evaporation to remove the solvents. The antagonist results of these extract showed that, the extract of perilla leaf, Vietnamese balm, king of bitter and white eclipta in either distilled water exhibited the strongest growth-inhibiting effect towards *Streptococcus agalactiae* ST283 serotype III and *S. agalactiae* ST1395 serotype Ib strains. The MBC (minimal bactericidal concentration) and MIC (minimal inhibitory concentration) values of the extract of perilla leaf, Vietnamese balm, king of bitter and white eclipta in distilled water for both serotypes of *S. agalactiae* strains were from 312 mg/L to 2500 mg/L. The results of the toxicity experiment showed that all these four herbal extracts at the dose of MBC, 2x MBC and 10x MBC were safe for fish. The *in vivo* investigations on the resistance to *S. agalactiae* of these four herbal extracts by injection method in tilapia showed the high protection suggesting the potential herbal plants for aquaculture use, in the prevention and treatment of *S. agalactiae* infection in fish.

Keywords: Herbal extract, Antibacterial, *Streptococcus agalactiae*, Tilapia, *Oreochromis* sp.

1. MỞ ĐẦU

Cá rô phi (*Oreochromis sp.*) là giống cá nước ngọt thuộc họ Cichlidae. Tại Việt Nam, đây là một trong những đối tượng nuôi nước ngọt phổ biến, đặc biệt được nuôi nhiều ở khu vực đồng bằng sông Cửu Long và các tỉnh miền Trung. Trong những năm gần đây, dịch bệnh trên cá rô phi do vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* ngày càng tăng và trở thành một thách thức lớn cho nghề nuôi cá nước ngọt nói chung và cá rô phi nói riêng. Biểu hiện của bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra là mắt bị lồi đục, có hiện tượng bơi xoắn ốc hoặc bơi vòng tròn, xuất huyết và viêm màng não, và có tỉ lệ gây chết cao lên đến 60 -70% trong vòng 5 - 7 ngày, do đó gây nên nhiều thiệt hại kinh tế cho người nuôi (Nguyễn Ngọc Phước và cs., 2019).

Cho đến nay, khả năng gây nhiễm tự nhiên của vi khuẩn này chỉ giới hạn ở bốn phân nhóm (clonal complexes - CC) đã biết, mỗi phức hợp lại liên kết với một kiểu huyết thanh khác nhau: CC7 với kiểu huyết thanh Ia, CC283 với kiểu huyết thanh III, CC552 với kiểu huyết thanh Ib và CC2 với kiểu huyết thanh IV (Delanoy và cs., 2021). Tuy nhiên gây bệnh cho cá rô phi nuôi tại Việt Nam hiện nay chủ yếu là các chủng thuộc hai phức hợp CC283 (kiểu huyết thanh III) gây bệnh trên cá nuôi ở Đồng bằng sông Cửu Long và CC552 (kiểu huyết thanh Ib) gây bệnh trên cá nuôi ở Thừa Thiên Huế (Phuoc và cs., 2021, FAO, 2021). Sử dụng kháng sinh là giải pháp phổ biến được nhiều hộ nuôi lựa chọn để phòng trị bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá rô phi. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh có thể gây nên hiện tượng kháng kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh trong nuôi trồng thủy sản. Điều này dẫn đến việc giảm hiệu quả sử dụng thuốc, đồng thời gây nên các vấn đề về sức khỏe cho con người và ô nhiễm môi trường do tồn dư lượng lớn thuốc kháng

sinh cả trong cơ thể động vật thủy sản và ngoài môi trường nuôi (Novais và cs., 2018).

Thảo dược được xem là giải pháp thay thế an toàn cho việc sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản (Seyyednejad và Motamedi, 2010; Najak và cs., 2017). Rất 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. Theo Citarasu và cs. (2010), các loại dược có khả năng kích thích tăng trưởng, kích thích miễn dịch, hoạt động kháng khuẩn và chống lại các tác nhân gây bệnh như vi khuẩn, nấm, ký sinh trùng. Sử dụng thảo dược thay thế cho thuốc kháng sinh trong quản lý sức khỏe cá không chỉ an toàn cho người tiêu dùng mà chúng còn có vai trò quan trọng trong nuôi trồng thủy sản. Hiện nay, đã có một số nghiên cứu cho thấy rằng nhiều loại thảo dược có khả năng kháng vi khuẩn Gram dương gây bệnh như tía tô, xuyên tâm liên, kinh giới, cỏ mực và một số loại thảo dược khác (Đỗ Tất Lợi, 2000; Milud và cs., 2010). Một số loại thảo dược đã được thử nghiệm trong phòng và trị bệnh cho các đối tượng thủy sản như: cây xoan (*Melia azedarach* L), sài đất (*Wedelia chinensis*), tỏi (*Allium sativum* L.), cây xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*), cỏ nhọ nồi (*Eclipta alba* Hassk), cây trâm bầu (*Combretum quadrangulare*) (Trương Thị Mỹ Hạnh và cs., 2017; Hoàng Mộng Huyền và cs., 2020). Trong nghiên cứu này, 8 loại cao chiết thảo dược gồm: tía tô (*Perilla frutescens*), kinh giới (*Elsholtzia ciliata*), bạch chỉ (*Angelica dahurica*), xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*), cỏ mực (*Eclipta prostrata*), cỏ gà (*Cynodon dactylon*), sài đất (*Wedelia chinensis*), mướp đắng (*Momordica charantia*) được sử dụng để đánh giá khả năng kháng *Streptococcus agalactiae* trong điều kiện in

vitro và thử độc tính trên cá rô phi nhằm chọn ra loại thảo dược có hiệu quả cao để làm tiền đề cho việc tạo chế phẩm thảo dược phòng trị bệnh trên cá rô phi.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguồn gốc thảo dược và phương pháp chiết xuất cao chiết

2.1.1. Nguồn gốc thảo dược

Các loại thảo dược tía tô (*Perilla frutescens*), kinh giới (*Elsholtzia ciliata*), bạch chi (*Angelica dahurica*), xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*), cỏ mực

(*Eclipta prostrata*), cỏ gà (*Cynodon dactylon*), sài đất (*Wedelia chinensis*), mướp đắng (*Momordica charantia*) 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; riêng bạch chi thu phần rễ củ. Các loại thảo dược được cho vào tủ sấy 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). Bảo quản thảo dược ở 4°C. Các loại thảo dược sử dụng trong nghiên cứu được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Các loại thảo dược sử dụng trong nghiên cứu và nguồn gốc

Loại thảo dược	Bộ phận sử dụng	Trạng thái	Nguồn gốc
Tía tô (<i>Perilla frutescens</i>)	Toàn cây	Tươi	Xã Quảng Thành- Thừa Thiên Huế
Kinh giới (<i>Elsholtzia ciliata</i>)	Toàn cây	Tươi	Xã Quảng Thành- Thừa Thiên Huế
Bạch chi (<i>Angelica dahurica</i>)	Rễ (củ)	Khô	Thành phố Huế
Xuyên tâm liên (<i>Andrographis paniculata</i>)	Lá	Tươi	Thành phố Huế
Cỏ mực (<i>Eclipta prostrata</i>)	Toàn cây	Tươi	Xã Quảng Thành- Thừa Thiên Huế
Cỏ gà (<i>Cynodon dactylon</i>)	Toàn cây	Tươi	Xã Quảng Thành- Thừa Thiên Huế
Sài đất (<i>Wedelia chinensis</i>)	Toàn cây	Tươi	Xã Quảng Thành- Thừa Thiên Huế
Mướp đắng (<i>Momordica charantia</i>)	Toàn cây	Tươi	Xã Quảng Thành- Thừa Thiên Huế

2.1.2. Phương pháp chiết xuất

Cao chiết các loại thảo dược trong các dung môi: methanol 99,8%, cồn 96% và nước cất được tiến hành theo phương pháp của Trần Hùng và Nguyễn Viết Kinh (2015) gồm các bước như sau: Cân mỗi loại thảo dược 30 g và chia thành 3 phần bằng nhau, trộn lẫn lượt với 3 loại dung môi gồm nước cất, ethanol và methanol với tỷ lệ 1: 10 (tương đương 10 g thảo dược và 100 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 của 3 loại dung môi đem đi cô quay ở nhiệt độ 60°C, áp suất chân không để loại bỏ hết

dung môi, sau đó cho nước cất đủ 20 mL (bằng 1/5 thể tích ban đầu) thu được cao chiết thí nghiệm, và bảo quản ở nhiệt độ -20°C để sử dụng trong các thí nghiệm.

2.2. Vi khuẩn thí nghiệm

12 chủng vi khuẩn gây bệnh *Streptococcus agalactiae* được phân lập từ mẫu cá rô phi bị bệnh lở loét xuất huyết trong đó 6 chủng thuộc Sequence Type (ST) 283 (kiểu huyết thanh III) phân lập tại Cần Thơ và 6 chủng ST 1395 (kiểu huyết thanh Ib) phân lập tại Thừa Thiên Huế (Phuoc và cs., 2021). Các chủng vi khuẩn đã được định danh là *S. agalactiae* group B thuộc phân nhóm Clonal complex (CC) 283 kiểu huyết

thanh III và kiểu huyết thanh Ib thuộc CC 552 bằng phương pháp MLST (Multilocus Sequence Typing) tại trường Đại học Glasgow, Vương quốc Anh và được cung cấp từ phòng thí nghiệm Khoa Thủy sản, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

Các chủng vi khuẩn đã được định danh là *S. agalactiae* được bảo quản trong glycerol 15% và được bảo quản ở nhiệt độ -4°C . Mẫu vi khuẩn được đem nuôi cấy và phục hồi bằng phương pháp cấy ria trên đĩa môi trường Tryptic Soy agar (TSA, Himedia, Ấn Độ). Dùng que cấy vòng đã thao tác vô trùng nhúng vào dung dịch mẫu có chứa chủng vi khuẩn *S. agalactiae* bảo quản trong glycerol 15%. Ria que cấy thành các đường trên đĩa petri có chứa môi trường TSA. Sau mỗi đường ria, đốt khử trùng que cấy và làm nguội trước khi thực hiện các đường ria tiếp theo. Dùng parafin bao bọc kín và nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C trong 24 giờ. *S. agalactiae* tạo khuẩn lạc nhỏ, màu trắng, tròn trên môi trường TSA. Sau đó, chủng vi khuẩn thí nghiệm được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường Tryptic Soy Broth (TSB, Himedia, Ấn Độ) trong tủ ấm (GFL 3032, hãng GFL) ở 30°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 $\text{OD}=1$ (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 để thử khả năng kháng khuẩn của cao chiết thảo dược ở các loại dung môi khác nhau.

2.3. Cá thí nghiệm

Cá rô phi (*Oreochromis sp.*), trọng lượng cơ thể trung bình 20 g được mua từ Trung tâm giống Thủy sản Thừa Thiên Huế và được nuôi ở trong bể composite 1 m^3 tại phòng thí nghiệm Bệnh học thủy sản, Khoa Thủy sản, trường Đại học Nông Lâm Huế. Cá được nuôi cách ly trong bể nhựa 1000-L với nhiệt độ duy trì trong khoảng $28\text{-}30^{\circ}\text{C}$ 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 *Streptococcus 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 thí nghiệm được nuôi cách ly

2.4. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của các loại cao chiết

Khả năng kháng khuẩn của cao chiết từ các loại thảo dược ở các dung môi khác nhau được tiến hành theo phương pháp của Tucker và cs. (2009) gồm các bước như sau:

Trái đều vi khuẩn lên môi trường Muller Hinton agar (MHA, Himedia, Ấn Độ) đã chuẩn bị trước như mục 2.2. Đĩa thạch được để khô 15 phút trước khi đục các lỗ giếng đường kính 6 mm với khoảng cách thích hợp trên đĩa thạch đã trải vi khuẩn.

Hút chính xác 100 µL nước cất vào các giếng thạch để làm đối chứng âm. Sau đó cho 100 µL cao chiết của các loại thảo dược trong các dung môi methanol, ethanol và nước cất (nồng độ tương đương 2500 µg/giếng) vào các giếng khác nhau. Đối

chứng dương với kháng sinh là peniciline (125 µg).

Sau đó để 30 phút cho các chất thử nghiệm khuếch tán vào lớp thạch trước khi ủ ở nhiệt độ 28 - 30°C. Kiểm tra đường kính vòng kháng khuẩn sau 24 giờ. Mức độ kháng vi sinh vật của cao chiết thảo dược được đánh giá theo Faikoh và cs., (2014) (Bảng 2). Thí nghiệm được tiến hành 4 lần lặp lại.

Từ kết quả sàng lọc khả năng kháng khuẩn, 4 loại cao chiết thảo dược trong dung môi thích hợp cho kết quả tốt nhất được chọn để xác định nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ tiêu diệt tối thiểu (MBC) cũng như thử khả năng kháng khuẩn và độc tính trên cá rô phi.

Bảng 2. Bảng đánh giá mức độ kháng khuẩn của các loại cao chiết thảo dược

Đường kính vòng kháng vi sinh vật (mm)	Mức độ kháng vi sinh vật
≥ 15	Mạnh
7,5 – 15	Trung bình
< 7,5	Yếu
0	Không kháng

2.5. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibitory Concentration - MIC) và nồng độ tiêu diệt tối thiểu (Minimum Bactericidal Concentration – MBC) của cao chiết từ các loại thảo dược

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được xác định theo phương pháp pha loãng nồng độ trên đĩa 96 giếng theo phương pháp của CLSI (2012).

Chuẩn bị vi khuẩn: Mùoi hai chủng vi khuẩn *S. agalactiae* thuộc hai phân nhóm ST 283 (kiểu huyết thanh III) và ST 1395 (kiểu huyết thanh Ib) được chuẩn bị như mục 2.2, sau đó mật độ vi khuẩn sau đó được pha loãng về 10⁶ cfu/mL để thử nghiệm.

Cao chiết thảo dược: Bốn loại cao chiết thảo dược trong loại dung môi cho kết quả kháng khuẩn tốt nhất được lựa chọn để tiến hành thí nghiệm.

Cho 100 µL dung dịch vi khuẩn vào từng giếng của đĩa 96 giếng chứa sẵn 100 µL dung dịch cao chiết các loại thảo dược được pha loãng thành các nồng độ khác nhau theo cơ số 2 với dung dịch gốc ban đầu là nồng độ 5000 mg/L cho đến 15,5 mg/L. Sau đó bổ sung 20 µL thuốc thử resazurin 0,01% vào mỗi giếng và được nuôi cấy ở 30°C trong 24 giờ. Thuốc thử resazurin có màu xanh dương trong dung dịch, các giếng có sự tăng trưởng của vi khuẩn sẽ làm đổi màu của dung dịch resazurin từ màu xanh sang màu hồng. Quan sát sự đổi màu, ghi nhận giá trị MIC là nồng độ của giếng không làm đổi màu của thuốc thử resazurin ở nồng độ thấp nhất của dịch chiết ức chế được mật độ vi khuẩn.

Nồng độ tiêu diệt tối thiểu (MBC) được xác định theo CLSI (1998) bằng phương pháp trải đĩa thạch. Hút chính xác

20 μ L dịch thử nghiệm trên các giếng không có sự đổi màu của resazurin 0,01% từ thí nghiệm trên, nhỏ lên môi trường thạch MHA đã chuẩn bị sẵn và được ủ ở 30°C sau 24 giờ để quan sát sự sống sót của vi khuẩn. Giá trị MBC là nồng độ thấp nhất trong dãy nồng độ của cao chiết có thể tiêu diệt toàn bộ vi khuẩn trong giếng (vi khuẩn không phát triển trên đĩa thạch).

2.6. Khảo sát độc tính của các cao loại thảo dược trên cá rô phi

Chuẩn bị thảo dược: 4 loại cao chiết có hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất được khảo sát độc tính trên cá rô phi bằng phương pháp cho ăn. Độc tính của các cao chiết này trên cá rô phi được khảo sát ở các nồng độ: 1x MBC, 5x MBC và 10x MBC (pha loãng bằng dung môi Phosphate-buffered saline (PBS) và được ủ ở 28°C trong 3 giờ. Trộn thức ăn cùng dung dịch thảo dược để cho cá thí nghiệm ăn. Nghiệm thức đối chứng âm là trộn PBS vào thức ăn. Cá được thả nuôi riêng trong bể thể tích 120-L với hệ thống nước chảy tốc độ 14 L/ phút, nhiệt độ duy trì trong khoảng 28-30°C và được cho ăn 2 lần mỗi ngày với liều lượng 3% trọng lượng thân vào lúc 8 giờ sáng và 2 giờ chiều. Thức ăn sử dụng trong thí nghiệm là Cargill (Việt Nam). Mỗi nghiệm thức gồm 10 con cá và được lặp lại 3 lần. Tổng số cá trong thí nghiệm này 360 con. Thử nghiệm được thực hiện trong 14 ngày, tỷ lệ chết của cá được theo dõi và ghi nhận hàng ngày.

2.7. Đánh giá khả năng kháng vi khuẩn của cao thảo dược trên cá rô phi

Bốn loại cao chiết trong loại dung môi có hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất được đánh giá khả năng kháng khuẩn trên cá rô phi bằng phương pháp tiêm Balasubramnian và cs., (2008). Chúng vi khuẩn *S. agalactiae* ST 283 (kiểu huyết thanh III) được sử dụng trong thí nghiệm này.

Thí nghiệm được bố trí trên 180 cá gồm 6 nghiệm thức bao gồm: nghiệm thức đối chứng âm – cá được tiêm với PBS, đối chứng dương – cá được tiêm với huyền phù vi khuẩn với mật độ 10^6 cfu/mL (liều gây chết 50% LD₅₀ được xác định từ nghiên cứu của Phuoc và cs. (2021)), bốn nghiệm thức còn lại – cá được tiêm với hỗn hợp dung dịch vi khuẩn mật độ 10^6 cfu/mL trộn với cao thảo dược ở nồng độ MBC được xác định ở thí nghiệm 2.4 và ủ ở 28°C trong 3 giờ. Thể tích dung dịch tiêm vào xoang bụng của mỗi cá là 0,1 mL, mỗi nghiệm thức gồm 10 con cá và được lặp lại 3 lần. Cá sau khi cảm nhiễm được nuôi trong bể nhựa 120-L với hệ thống nước chảy tốc độ 14 L/ phút, nhiệt độ duy trì trong khoảng 28-30°C. Cá thí nghiệm được cho ăn bằng thức ăn Cargill (Việt Nam) hai lần/ngày ở mức duy trì (2% trọng lượng thân) vào lúc 8 giờ sáng và 2 giờ chiều. Sục khí liên tục 24 giờ/ngày. Tỷ lệ chết của cá được ghi nhận hàng ngày. Phân lập vi khuẩn từ não và thận đối với cá chết trong suốt thí nghiệm. Kết thúc thí nghiệm, phân lập vi khuẩn từ não với 50% cá sống ở mỗi nghiệm thức (Phuoc và cs., 2021). Căn cứ vào tỷ lệ sống của cá tại các nồng độ thảo dược khác nhau để đánh giá hoạt tính bảo vệ cá trước vi khuẩn *S. agalactiae* của các loại cao chiết từ thảo dược.

2.8. Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả các số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê theo phân tích phương sai (ANOVA) bởi trình ứng dụng GLM (General Linear Model) của phần mềm SPSS 20.0. Sự sai khác giữa các giá trị trung bình được xác định theo phương pháp Tukey với độ tin cậy 95%.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

khác nhau được thể hiện qua các Bảng 3, 4 và 5 và Hình 2.

3.1. Kết quả thử khả năng kháng khuẩn của các loại cao chiết thảo dược

Khả năng kháng khuẩn của các loại cao chiết thảo dược trong các dung môi

Bảng 3. Kích thước trung bình vòng kháng khuẩn của các loại cao chiết thảo dược đối với các chủng vi khuẩn ST 283 (kiểu huyết thanh III) và ST 1395 (kiểu huyết thanh Ib) trong dung môi là nước cất

Loại cao chiết thảo dược	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)	
	<i>S. agalactiae</i> ST 283	<i>S. agalactiae</i> ST 1395
Tía tô	17,4 ^a ± 0,4	18,1 ^a ± 0,6
Kinh giới	17,9 ^a ± 0,4	18,1 ^a ± 0,9
Xuyên tâm liên	18,7 ^a ± 0,4	19,2 ^a ± 0,6
Sài đất	14,9 ^b ± 0,6	14,7 ^b ± 0,7
Bạch chỉ	15,0 ^b ± 0,5	15,6 ^b ± 0,5
Cỏ gà	12,6 ^c ± 0,8	14,1 ^b ± 0,6
Cỏ mực	15,3 ^b ± 0,9	16,1 ^b ± 0,6
Mướp đắng	10,5 ^c ± 0,3	10,3 ^c ± 0,4
Đối chứng dương (penniciline)	0	15,6 ^b ± 0,6
Đối chứng âm (nước cất)	0	0

Số liệu trình bày là giá trị trung bình ± Độ lệch chuẩn; trên cùng một cột, các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Bảng 4. Kích thước trung bình vòng kháng khuẩn của các loại cao chiết thảo dược đối với các chủng vi khuẩn ST 283 (kiểu huyết thanh III) và ST 1395 (kiểu huyết thanh Ib) trong dung môi ethanol

Loại thảo dược	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)	
	<i>S. agalactiae</i> ST 283	<i>S. agalactiae</i> ST 1395
Tía tô	12,6 ^a ± 0,6	11,9 ^b ± 0,9
Kinh giới	12,4 ^a ± 0,5	12,3 ^b ± 0,7
Xuyên tâm liên	10,6 ^b ± 0,6	10,7 ^c ± 0,6
Sài đất	12,3 ^a ± 0,6	13,3 ^b ± 0,6
Bạch chỉ	12,1 ^a ± 0,7	10,3 ^c ± 0,6
Cỏ gà	12,5 ^a ± 0,5	11,2 ^b ± 1,1
Cỏ mực	9,6 ^b ± 0,6	9,3 ^c ± 0,6
Mướp đắng	13,6 ^a ± 0,6	12,5 ^b ± 0,5
Đối chứng dương (penniciline)	0	15,6 ^a ± 0,6
Đối chứng âm (nước cất)	0	0

Số liệu trình bày là giá trị trung bình ± Độ lệch chuẩn; trên cùng một cột, các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

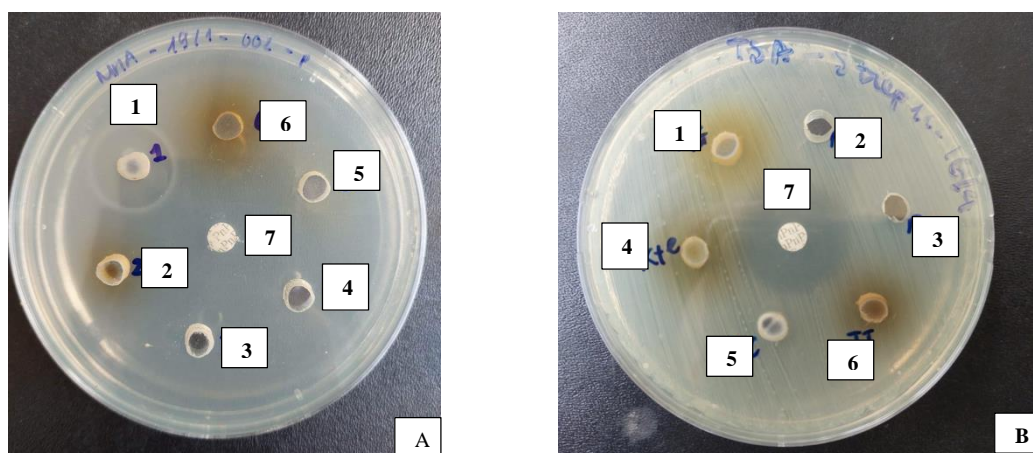
Bảng 5. Kích thước trung bình vòng kháng khuẩn của các loại cao chiết thảo dược đối với các chủng vi khuẩn ST 283 (kiểu huyết thanh III) và ST 1395 (kiểu huyết thanh Ib) trong dung môi methanol

Loại thảo dược	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)	
	<i>S. agalactiae</i> ST 283	<i>S. agalactiae</i> ST 1395
Tía tô	14,3 ^a ± 1,5	14,7 ^a ± 0,6
Kinh giới	15,3 ^a ± 0,6	15,7 ^a ± 1,1
Xuyên tâm liên	13,8 ^a ± 0,9	14,1 ^a ± 1,1
Sài đất	14,3 ^a ± 0,6	13,3 ^a ± 0,6
Bạch chỉ	15,6 ^a ± 1,2	15,6 ^a ± 0,8
Cỏ gà	12,3 ^b ± 0,6	12,7 ^a ± 1,4
Cỏ mực	14,3 ^a ± 1,1	14,3 ^a ± 0,6
Mướp đắng	11,9 ^b ± 0,85	10,8 ^b ± 1,1
Đối chứng dương (penniciline)	0	15,6 ^a ± 0,6
Đối chứng âm (nước cất)	0	0

Số liệu trình bày là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn; trên cùng một cột, các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Trong 8 loại thảo dược được sử dụng để nghiên cứu khả năng kháng vi khuẩn *S. agalactiae* phân lập từ cả hai vùng Đồng bằng sông Cửu Long và Thừa Thiên Huế cho thấy 4 loại cao chiết thảo dược: tía tô, kinh giới, xuyên tâm liên, cỏ mực ở dung môi nước và methanol đều có đường kính vòng kháng khuẩn cao nhất. Không có sự sai khác về kích thước vòng kháng khuẩn của các loại cao chiết thảo dược trên các chủng *S. agalactiae* ở các kiểu huyết thanh khác nhau. Nhiều nghiên cứu cho thấy cao chiết xuyên tâm liên có khả năng kháng khuẩn mạnh và có khả năng kích thích miễn dịch trên cá chép Ấn Độ (*Catla catla*) (Xavier và cs., 2012). Cao chiết xuyên tâm

liên trong dung môi nước có tác dụng kháng mạnh với vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi (Rattanachaikunsopon và Phumkhachorn, 2009). Trong nghiên cứu chúng tôi, cao chiết lá xuyên tâm liên trong cả hai dung môi nước và methanol 99,8% đều cho kết quả kháng khuẩn với các chủng *S. agalactiae* ở hai nhóm huyết thanh cao hơn khả năng kháng khuẩn của cao chiết xuyên tâm liên trong dung môi ethanol 96% và methanol 99,8% đối với chủng *S. agalactiae* SA4 trong nghiên cứu Nguyễn Thị Trúc Quyên và cs. (2019). Như vậy, nguồn gốc thảo dược và loại dung môi ảnh hưởng đến khả năng kháng khuẩn của cao thảo dược.



Hình 2. Khả năng kháng khuẩn của các loại cao chiết kinh giới (1), cỏ gà (2), mướp đắng (3), xuyên tâm liên (4), cỏ mực (5), và tía tô (6), và peniciline (7) ở dung môi ethanol lên chủng vi khuẩn *S. agalactiae* ST 283 (A) và *S. agalactiae* ST 1395

Trong 3 loại dung môi, cao chiết các loại thảo dược với dung môi ethanol tạo đường kính vòng kháng khuẩn trung bình trên tất cả các chủng *S. agalactiae* thử nghiệm, thấp hơn cao chiết thảo dược với dung môi là nước và methanol (Hình 2). Ba loại dung môi: nước, methanol và ethanol đều là những dung môi phân cực với độ phân cực với độ phân cực tăng dần. Theo nghiên cứu của Trịnh Thị Trang và Nguyễn Thanh Hải (2016) thì các loại dung môi tách chiết khác nhau thì khả năng hoà tan các

hợp chất trong thực vật khác nhau. Dung môi ethanol cho khả năng tách chiết các hợp chất từ lá trà không tốt hơn các dung môi có độ phân cực thấp là methanol và nước. Tuy nhiên trong nghiên cứu này, các hợp chất trong 8 loại thảo dược sử dụng lại hoà tan tốt ở dung môi có độ phân cực thấp hơn là methanol và nước. Như vậy, dung môi có độ phân cực thấp (nước) có khả năng tách chiết các hoạt chất trong các loại thảo dược trong nghiên cứu này là cao nhất.

Khi dùng kháng sinh penicilline làm đối chứng dương, penicilline không tạo vòng kháng khuẩn đối với các chủng *S. agalactiae* ST 283 phân lập từ cá rô phi nuôi tại Cần Thơ, nhưng tạo vòng kháng khuẩn có đường kính $15,6 \pm 0,6$ mm đối với các chủng *S. agalactiae* ST 1395 phân lập tại Thừa Thiên Huế. Điều này cho thấy rằng các chủng *S. agalactiae* ST 283 phân lập trên cá rô phi nuôi tại Cần Thơ có hiện tượng kháng kháng sinh penicilline. Theo nghiên cứu của Đặng Thị Hoàng Oanh và cs., (2005) việc trộn những loại thuốc kháng sinh như oxytetracycline, streptomycin và penicillin vào thức ăn của cá để phòng và trị bệnh là rất phổ biến ở vùng Đồng Bằng

Sông Cửu Long dẫn đến nhiều dòng vi khuẩn có khả năng đa kháng thuốc.

3.2. Kết quả xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ tiêu diệt tối thiểu (MBC) của các loại cao chiết thảo dược

Từ kết quả sàng lọc khả năng kháng khuẩn ở điều kiện *in vitro*, 4 loại cao chiết thảo dược: xuyên tâm liên, cỏ mực, tía tô và kinh giới trong dung môi nước có khả năng kháng khuẩn mạnh với vi khuẩn *S. agalactiae* thuộc hai nhóm kháng nguyên III và Ib. Vì vậy, bốn loại cao chiết này được chọn để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ tiêu diệt tối thiểu (MBC) được trình bày ở Bảng 6.

Bảng 6. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ tiêu diệt tối thiểu (MBC) của 4 loại cao chiết trong dung môi nước trên vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi

Loại cao chiết	Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) (mg/L)	Nồng độ tiêu diệt tối thiểu (MBC) (mg/L)
Xuyên tâm liên	312	312
Kinh giới	625	1250
Tía tô	1250	2500
Cỏ mực	1250	2500

Không có sự sai khác về giá trị MIC và MBC của các loại cao chiết thảo dược trên các chủng *S. agalactiae* ở các kiểu huyết thanh khác nhau. Xuyên tâm liên cho khả năng kháng khuẩn tốt nhất với nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ tiêu diệt tối thiểu (MBC) là 312 mg/L, thấp hơn các loại thảo dược còn lại. Cỏ mực và tía tô có khả năng diệt khuẩn thấp nhất với nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ tiêu diệt tối thiểu (MBC) lần lượt là 1250 mg/L và 2500 mg/L. Giá trị MIC và MBC của xuyên tâm liên, tía tô và kinh giới trên vi khuẩn *S. agalactiae* ở nghiên cứu này thấp hơn giá trị MIC và MBC cao chiết từ quế lên vi khuẩn *S. agalactiae* trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Trúc Quyên và cs. (2019). Khi tỉ lệ MBC/MIC nhỏ hơn hoặc bằng 4 thì cao chiết được xem là có khả năng diệt khuẩn;

nếu tỉ lệ MBC/MIC lớn hơn 4 thì chiết xuất có tác dụng kìm khuẩn (Canillac và Mourey, 2001). Như vậy, cao chiết xuyên tâm liên, kinh giới, tía tô và cỏ mực trong dung môi nước đều có khả năng diệt khuẩn (MBC/MIC <4).

3.3. Kết quả khảo sát độc tính của các cao loại thảo dược trên cá rô phi

Kết quả khảo sát độc tính của các loại thảo dược trên cá rô phi cho thấy tỉ lệ sống 100% của cá rô phi khi được cho ăn thức ăn trộn với các nồng độ MBC của dung dịch chiết thảo dược tía tô, kinh giới, xuyên tâm liên, cỏ mực và dung dịch đối chứng nước sau 14 ngày theo dõi (Bảng 7). Điều này cho phép kết luận rằng các loại thảo dược này an toàn cho cá rô phi và có thể sử dụng trong nghiên cứu phòng trị bệnh trên cá.

Bảng 7. Tỷ sống của cá rô phi khi cho ăn các loại thảo dược

Thảo dược	Tỷ lệ sống (%)		
	1x MBC	5x MBC	10x MBC
Xuyên tâm liên	100	100	100
Kinh giới	100	100	100
Tía tô	100	100	100
Cỏ mực	100	100	100
Đôi chứng PBS	100	100	100

3.4. Đánh giá khả năng kháng vi khuẩn của cao thảo dược trên cá rô phi

Kết quả khảo sát hoạt tính của các cao chiết thảo dược kháng vi khuẩn *S. agalactiae* ở nồng độ 312 mg/L với xuyên tâm liên, 1250 mg/L với kinh giới, 2500 mg/L với cỏ mực và tía tô cho thấy, các cao thảo dược còn lại đều có hiệu quả bảo vệ cá trước vi khuẩn *S. agalactiae* (Bảng 8). Các

mẫu cá chết ở nghiệm thức đôi chứng dương và bốn mẫu cá chết ở nghiệm thức sử dụng cao cỏ mực, đều thấy xuất hiện vi khuẩn *S. agalactiae* trên mẫu phân lập vi khuẩn từ não và thận ở môi trường TSA, không phân lập được mẫu vi khuẩn ở các mẫu cá sống sau thí nghiệm (Hình 3), chứng tỏ các loại cao thảo dược ức chế được vi khuẩn *S. agalactiae*.

Bảng 8. Tỷ lệ cá chết ở thí nghiệm khảo sát hoạt tính của các cao thảo dược kháng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*

Thảo dược (nồng độ mg/L)	Tỷ lệ chết (%)
Xuyên tâm liên (312)	0 ± 0,00 ^a
Kinh giới (1250)	0 ± 0,00 ^a
Tía tô (2500)	0 ± 0,00 ^a
Cỏ mực (2500)	13,33 ± 5,77 ^b
Đôi chứng dương (chỉ vi khuẩn không có thảo dược)	60 ± 0,00 ^a
Đôi chứng âm (chỉ tiêm PBS)	0 ± 0,00 ^a

Số liệu trình bày là giá trị trung bình ± Độ lệch chuẩn; trên cùng một cột, các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Đây là nghiên cứu đầu tiên thử khả năng kháng *S. agalactiae* trong điều kiện *in vivo* mặc dù hiệu quả của các chất chiết xuất từ thảo dược đã được nhiều nhóm tác giả trong và ngoài nước nghiên cứu trong điều kiện *in vitro*. Xuyên tâm liên đã được nghiên cứu sử dụng làm chất kháng khuẩn trong nuôi trồng thủy sản (Rattanachai-kunsopon và Phumkhachorn, 2009; Xavier và cs., 2012). Dịch chiết từ tía tô còn có khả năng đối kháng mạnh với các chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Streptococcus* (Del Campo và cs., 2000) đặc biệt cao chiết tía tô trong dung môi ethanol-nước có khả năng chống oxy hóa và khả năng kháng khuẩn cao (Phan Thanh Tâm và cs. 2013). Ngoài ra, các axit hữu cơ kinh giới và cỏ

mực có tác dụng kháng vi khuẩn Gram dương đặc biệt là nhóm vi khuẩn *Streptococcus* (Yasuko Sekita và cs., 2016). Trong cỏ mực có các chất: saponin, tanin, chất đắng, caroten, ancaloit, tinh dầu, vitamin E, vitamin A, vitamin K... có tác dụng cầm máu, diệt khuẩn, tiêu viêm, tăng cường miễn dịch, ức chế ung thư, tuy nhiên nếu nồng độ dùng quá cao có thể dẫn tới rối loạn tuần hoàn (Đỗ Tất Lợi, 2000). Trong thí nghiệm này cao chiết cỏ mực ở nồng độ 2500 mg/L gây chết 13,33% cá thí nghiệm chứng tỏ nồng độ này có thể gây ngộ độc cho cá. Cần nghiên cứu phương pháp chiết xuất tốt hơn để tăng khả năng kháng khuẩn của cao chiết cỏ mực và giảm liều dùng để tránh gây ngộ độc cho cá.



Hình 3. Tiêm dung dịch vi khuẩn và thảo dược vào cá (hình A) và cá sống sau thí nghiệm (Hình B)

Vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* là tác nhân gây bệnh chính trên cá rô phi nuôi trên thế giới và Việt Nam, trong đó các chủng thuộc ST 283 thuộc kiểu huyết thanh III là nhóm có độc lực rất mạnh và vừa gây bệnh cho cá vừa gây bệnh cho người (Phuoc và cs., 2021; FAO, 2021), chính vì vậy chủng *S. agalactiae* ST 283 được ưu tiên lựa chọn trong thử nghiệm khả năng kháng khuẩn của các loại cao chiết trong điều kiện *in vivo*. Trong nghiên cứu của chúng tôi, cao chiết lá xuyên tâm liên, kinh giới và tía tô đều có hiệu quả bảo vệ tốt cho cá rô phi đối với vi khuẩn *S. agalactiae* ST 283 gây bệnh trên cá rô phi. Cao chiết cỏ mực cũng có tiềm năng bảo vệ khá tốt khi tỷ lệ chết của cá sau 14 ngày cảm nhiễm chỉ 13,33%.

4. KẾT LUẬN

Trong 8 loại thảo dược được sử dụng để thí nghiệm, cao chiết tía tô, kinh giới, xuyên tâm liên, cỏ mực với dung môi nước và methanol có khả năng kháng khuẩn tốt nhất đối với các chủng *S. agalactiae* ở cả hai nhóm huyết thanh III và Ib.

Giá trị MIC và MBC của các loại cao chiết thảo dược không phụ thuộc vào kiểu huyết thanh của vi khuẩn thí nghiệm. Xuyên tâm liên cho khả năng kháng khuẩn tốt nhất.

Các loại cao chiết xuyên tâm liên, kinh giới, tía tô, và cỏ mực trong dung môi nước được xác định an toàn cho cá rô phi và có thể sử dụng trong nghiên cứu phòng trị bệnh trên cá.

Cả 4 loại cao chiết thảo dược xuyên tâm liên, kinh giới, tía tô, và cỏ mực trong dung môi nước đều có khả năng bảo vệ cao cho cá rô phi với vi khuẩn *S. agalactiae*.

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 “Nghiên cứu khả năng kháng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* của các loại cao chiết thảo dược trên cá rô phi (*Oreochromis* sp.)”, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, năm 2022.

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 Tân 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.
- Trần Hùng và Nguyễn Việt Kinh. (2015). Phương pháp nghiên cứu dược liệu, Đại học Y dược thành phố Hồ Chí Minh. 126p.
- Đỗ Tất Lợi. (2000). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học, thành phố Hồ Chí Minh, tr. 86.
- Nguyễn Ngọc Phước, Trần Thị Nhật Anh và 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 & Công nghệ Nông nghiệp Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế*, 3(3), 1591-1601.
- Đặng Thị Hoàng Oanh, Nguyễn Thanh Phương, Temdoug Somsiri, Supranee Chinabut, Fatimah Yussoff, Mohamed Shariff, Kerry Bartie, Geert Huys, Mauro Giacomini, Stefania Berton, Jean Swings và Alan Teale. (2005). Xác định tính kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn phân lập từ các hệ thống nuôi thủy sản ở Đồng bằng sông Cửu Long, Việt Nam. *Tạp chí Nghiên cứu Khoa học*, 4, 136-144
- 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 Tinh. (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.
- Phan Thanh Tâm, Vũ Thị Liên và Lê Sỹ Hồng Lam. (2013). *Nghiên cứu khả năng kháng khuẩn và chống oxy hóa của dịch chiết gừng, riềng, tía tô và ứng dụng trong sản xuất thịt*

viên. Được trình bày tại Hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc năm 2013.

- Trịnh Thu Trang và Nguyễn Thanh Hải. (2016). Tác dụng ức chế vi khuẩn in vitro của cao khô dịch chiết lá trầu không (*Piper betle*) đối với vi khuẩn *Aeromonas* spp. và *Streptococcus agalactiae* gây bệnh xuất huyết trên cá rô phi. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 14(6), 869-8761.

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

- 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
- Canillac, N., & Mourey, A. (2001). Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology*, 18(3), 261-268.
- Citarasu, T. (2010). Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 18(3), 403-414.
- CLSI. (1987). Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. Approved Guideline, CLSI document M26-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 1998.
- CLSI. (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard, 9th ed., CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.
- Del Campo, J., Amiot, H. J., & Nuyen-Thea, C. (2000). Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of Food Protection*, 63, 1359-1368
- Delannoy, C. M., Samai, H., & Labrie, L. (2021). *Streptococcus agalactiae* serotype IV in farmed tilapia. *Aquaculture*, 544, 737033.
- Faikoh, E.N., Hong, Y.H., Hu, & S.Y. (2014). Liposome-encapsulated cinnamaldehyde enhances zebrafish (*Danio rerio*) immunity and survival when challenged with *Vibrio*

- vulnificus* and *Streptococcus agalactiae*. *Fish & Shellfish Immunology*, 38, 15-24.
- FAO. (2021). Risk profile - Group B *Streptococcus* (GBS) – *Streptococcus agalactiae* sequence type (ST) 283 in freshwater fish. Bangkok.
- Milud, A., Hassan, D., Siti, K. B., & Ali, A. (2010). Antimicrobial activities of some culinary spice extracts against *Streptococcus agalactiae* and its prophylactic uses to prevent Streptococcal infection in red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.). *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 2(6), 532-538.
- Nayak, D., Ashe, S., Rauta, P.R., & Nayak, B. (2017). Assessment of antioxidant, antimicrobial and antiosteosarcoma potential of four traditionally used Indian medicinal plants. *Journal of Applied Biomedicine*, 15(2), 119-132.
- 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 environmental conditions on the virulence of *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*; GBS) in red tilapia (*Oreochromis* sp.). *Aquaculture*, 534, 736256.
- Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2009). Prophylactic effect of *Andrographis paniculata* extracts against *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(5), 579-582.
- Seyyednejad, S. M., & Motamedi, H. (2010). A review on native medicinal plants in Khuzestan, Iran with antibacterial properties. *International Journal of Pharmacology*, 6(5), 551-560.
- Turker, H., Yildirim, A.B., & Karakaş, F.P. (2009). Sensitivity of Bacteria Isolated from Fish to Some Medicinal Plants. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 9, 181-186.
- Xavier, B., Fathima Syed Ali, M., & Sheeba, S. (2012). Effect of oral immunostimulant *Andrographis paniculata* and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Catla catla*. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy (IJRAP)*, 3(2), 239-243.
- Yasuko, S., Keiji M., Hiromichi, Y., Takashi, A., Natsumi, F., Shohei, O., Takashi, M., Yoichiro, M., & Yoshiki, K. (2016). Preventive Effects of *Houttuynia cordata* Extract for Oral Infectious Diseases. *BioMed Research International*, 2581876, 8pp.