

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HCM

NGUYỄN THỊ TRÚC QUYÊN

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG CAO CHIẾT THẢO DƯỢC  
NÂNG CAO KHẢ NĂNG KHÁNG BỆNH DO  
*Streptococcus agalactiae* GÂY RA TRÊN  
CÁ RÔ PHI (*Oreochromis spp.*)

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học  
Mã số: 9.42.02.01

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

TP. HCM - Năm 2024

Công trình được hoàn thành tại: Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.

Người hướng dẫn khoa học: TS. Nguyễn Thị Ngọc Tĩnh và PGS.TS. Từ Thanh Dung

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án cấp trường họp tại Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.

Vào hồi.....giờ.....ngày.....tháng.....năm

Có thể tìm luận án tại:

- Thư viện Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh
- Thư viện Quốc gia Việt Nam

# CHƯƠNG 1

## MỞ ĐẦU

### 1.1 Tính cấp thiết

Việt Nam đã xác định thủy sản là ngành kinh tế mũi nhọn từ những năm đầu thập niên 90. Cá rô phi là một trong những đối tượng nuôi phổ biến và đã được xác định là sản phẩm thủy sản chủ lực của nước ta sau tôm nước mặn, lợ và cá tra (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2016). *Streptococcus agalactiae* là một trong hai loài vi khuẩn chính ảnh hưởng đến việc sản xuất cá rô phi (loài còn lại là *S. iniae*), là tác nhân gây ra bệnh lòi mắt, xuất huyết trên cá rô phi - một bệnh gây chết nhanh, tỷ lệ chết cao ở tất cả các giai đoạn phát triển của cá, gây thiệt hại kinh tế rất nghiêm trọng cho người nuôi (Lingam và ctv, 2021). Giải pháp phổ biến để kiểm soát bệnh do *S. agalactiae* gây trên cá rô phi là sử dụng kháng sinh, tuy nhiên việc lạm dụng kháng sinh có thể dẫn đến hiện tượng kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn (Zhang và ctv, 2018 và 2020), làm tăng tỷ lệ mầm bệnh kháng kháng sinh. Bên cạnh đó, sử dụng kháng sinh không chính xác (không phù hợp với chủng vi khuẩn gây bệnh hoặc không đúng liều lượng, liệu trình) có thể ảnh hưởng xấu đến chất lượng và an toàn thực phẩm (Zhang, 2021). Do đó, hiện nay, một trong những xu hướng được xem là bền vững và hợp lý về mặt kinh tế (Maulu và ctv, 2021) trong việc kiểm soát dịch bệnh trên thủy sản là sử dụng thảo dược có nguồn gốc từ thiên nhiên để phòng trị bệnh do vi khuẩn, trong đó có vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá rô phi. Tại Việt Nam, nghiên cứu ứng dụng thảo dược để phòng trị bệnh nói chung và do vi khuẩn *S. agalactiae* nói riêng đang dần được quan tâm, tuy nhiên công trình nghiên cứu sử dụng thảo dược như là một giải pháp để nâng cao sức đề kháng, khả năng phòng bệnh trên cá rô phi ở Việt Nam vẫn còn rất khiêm tốn về số lượng. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm chọn ra loại cao chiết thảo dược có hiệu quả kháng vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi và đánh giá ảnh hưởng của thảo dược lên tăng trưởng, khả năng nâng cao miễn dịch,... khi được bổ sung vào khẩu phần ăn của cá.

### 1.2 Mục tiêu tổng quát

Nghiên cứu giải pháp sử dụng cao chiết từ thảo dược bổ sung vào thức ăn, như là giải pháp hiệu quả phòng, trị bệnh trên cá rô phi, thay thế cho việc sử dụng hóa chất, kháng sinh.

### 1.3 Mục tiêu cụ thể

Xác định được loại thảo dược và loại dung môi phù hợp để tạo ra cao chiết có khả năng kháng hiệu quả với vi khuẩn *S. agalactiae* ở điều kiện *in vitro*.

Đánh giá hiệu quả bổ sung cao chiết thảo dược vào thức ăn lên tăng trưởng, tăng cường một số chỉ tiêu miễn dịch không đặc hiệu và khả năng kháng bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi giống.

### 1.4 Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Xác định khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh *S. agalactiae* ở điều kiện *in vitro* của một số dịch chiết và cao chiết thảo dược.

Nội dung 2: Xác định ảnh hưởng của cao chiết lên tăng trưởng và khả năng bảo vệ cá rô phi kháng lại vi khuẩn gây bệnh *S. agalactiae* ở điều kiện *in vivo*.

Nội dung 3: Xác định ảnh hưởng của cao chiết lên các chỉ tiêu máu, chỉ tiêu miễn dịch và hình thái biểu mô ruột của cá rô phi.

Nội dung 4: Xác định hàm lượng hoạt chất chính và khảo sát tính kháng khuẩn của cao chiết thảo dược dựa trên hàm lượng hoạt chất chính.

### **1.5 Cơ sở lựa chọn các nội dung nghiên cứu**

Các thảo dược được dùng trong nghiên cứu đều đã được chứng minh có hoạt tính kháng khuẩn nhưng chưa được nghiên cứu khả năng kháng vi khuẩn *S. agalactiae* tại Việt Nam. Trong đó có ba loại chưa từng tìm thấy thông tin công bố kết quả nghiên cứu trên thế giới (củ hành tím, lá kinh giới và củ riềng); riêng củ gừng có thông tin công bố trên vi khuẩn *S. agalactiae*, tuy nhiên hình thức thảo dược dùng trong thí nghiệm là dạng tinh dầu.

Các công trình đã công bố trong và ngoài nước cho thấy, ethanol là dung môi cho dịch chiết có tác dụng kháng *S. agalactiae*, trong khi đó dung môi methanol chưa được khảo sát nhiều trên vi khuẩn *S. agalactiae*. Do đó nghiên cứu này chọn dung môi là ethanol và methanol để chiết xuất thảo dược dùng trong các thí nghiệm (các dung môi sau đó sẽ được loại bỏ sau quá trình cô quay chân không nên không gây độc hại cho cơ thể động vật thí nghiệm). Ngoài ra, mặc dù chloroform cũng là dung môi chưa được khảo sát nhiều trên vi khuẩn *S. agalactiae* nhưng đây là một chất độc với môi trường nên chưa được chọn để thực hiện trong nghiên cứu này.

Các tỷ lệ bổ sung thảo dược vào thức ăn và các chỉ tiêu theo dõi (tăng trưởng, tỷ lệ sống, chỉ tiêu miễn dịch,...) được tham khảo từ các nghiên cứu đã công bố trên cá rô phi (Emmanuel và ctv, 2018; Dotta và ctv, 2018; Doan và ctv, 2019; Abdul và ctv, 2020;...).

### **1.6 Những đóng góp mới của luận án**

Nghiên cứu đã khẳng định được hiệu quả của hai loại nguyên liệu thảo dược gồm vỏ quế (*Cinnamomum verum*) và gừng (*Zingiber officinale*) khi bổ sung vào thức ăn dưới dạng cao chiết trong việc hỗ trợ nâng cao khả năng kháng bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi giống.

Nghiên cứu đã xác định hàm lượng hoạt chất cinamic aldehyde chứa trong vỏ quế (100 µg và 200 µg) có khả năng kháng vi khuẩn *S. agalactiae*.

Nghiên cứu đã xác định sự hiện diện tại huyện Củ Chi, Thành phố Hồ Chí Minh của chủng vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi, thuộc CC283 (clonal complex 283), kiểu trình tự ST283 và mang các yếu tố độc lực quan trọng; đóng góp thêm cơ sở dữ liệu về kiểu trình tự của các chủng vi khuẩn phân lập được tại Việt Nam.

### **1.7 Bố cục của luận án**

Luận án chính thức gồm 136 trang (không bao gồm phụ lục), có 4 chương, 18 bảng số liệu và 22 hình. Luận án đã tham khảo tổng cộng 185 tài liệu trong đó 30 tài liệu tiếng Việt và 155 tài liệu tiếng Anh.

## **CHƯƠNG 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1 Thời gian, địa điểm nghiên cứu**

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 11 năm 2017 đến tháng 12 năm 2022, tại Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II, 116 Nguyễn Đình Chiểu, Phường Đa Kao, Quận 1, Thành phố Hồ Chí Minh.

### **2.2 Vật liệu nghiên cứu**

#### **2.2.1 Thí nghiệm *in vitro***

Thảo dược và nguồn cá bệnh dùng trong nghiên cứu nêu tại Bảng 2.1 và Bảng 2.2. Địa giấy kháng sinh Doxycycline (30 µg) do Công ty Nam Khoa sản xuất; hóa chất, dụng cụ, thiết bị.

**Bảng 2.1** Các loại thảo dược được dùng trong nghiên cứu

TT	Loại thảo dược	Tên khoa học	Bộ phận sử dụng	Trạng thái	Nguồn gốc
1	Diếp cá	<i>Houttuynia cordata</i>	thân, cành và lá	tươi	Huyện Hóc Môn, TP.HCM; Viện Y học dân tộc
2	Củ hành tím	<i>Allium ascalonicum</i>	nguyên củ có vỏ và nguyên củ không vỏ	tươi	Huyện Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng; Viện Y học dân tộc
3	Kinh giới	<i>Elsholtzia ciliata</i>	lá	tươi	Huyện Hóc Môn, TP.HCM; Viện Y học dân tộc
4	Vỏ thân quế	<i>Cinnamomum verum</i>	vỏ thân	khô	Huyện Chợ Đồn, tỉnh Bắc Cạn; Viện Y học dân tộc
5	Củ gừng	<i>Zingiber officinale</i>	nguyên củ còn vỏ	tươi	Huyện Lâm Hà, tỉnh Lâm Đông; Viện Y học dân tộc
6	Củ riềng	<i>Alpinia officinarum</i>	nguyên củ còn vỏ	tươi	Huyện Bến Lức, tỉnh Long An; Viện Y học dân tộc

**Bảng 2.2** Các chủng *S. agalactiae* dùng trong nghiên cứu

TT	Chủng	Nguồn gốc phân lập	Trọng lượng (gram)	Dấu hiệu bệnh tích lâm sàng lúc thu mẫu	Ngày phân lập
1	SA-12.1	Cá rô phi đỏ ( <i>Oreochromis sp.</i> ) nuôi ở xã Thanh Sơn, huyện Định Quán, tỉnh Đồng Nai	1.100	Mất lõi, đục nhẹ, gan nhạt màu	13/11/2017
2	SA-26.1	Cá rô phi vằn ( <i>O. niloticus</i> ) nuôi ở Trung tâm Giống thủy sản và cây trồng, huyện Củ Chi, TP. HCM	50	Lõi mắt, xuất huyết hậu môn, gan nhạt màu	11/04/2019

\*: cung cấp bởi Trung tâm Quan trắc môi trường và bệnh thủy sản Nam Bộ, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản II.

### 2.2.2 Thí nghiệm *in vivo*

Vỏ thân quế và củ gừng được cung cấp bởi Viện Y học Dân tộc – Tp. Hồ Chí Minh. Chủng vi khuẩn *S. agalactiae* SA-2.1-CC. Thức ăn Cargill-7414; hóa chất, dụng cụ, thiết bị. Cá rô phi vằn (*Oreochromis niloticus*) giống có khối lượng trung bình 4-6 gram/con, khỏe mạnh, sạch bệnh *S. agalactiae*, được cung cấp bởi Trung tâm Giống thủy sản và cây trồng (huyện Củ Chi, Tp. Hồ Chí Minh). Cá được vận chuyển về Phòng thí nghiệm ươm thuộc Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản 2 (Quận Gò Vấp, Tp. Hồ Chí Minh), nuôi dưỡng 5 ngày trong bể composite có sục khí liên tục trước khi tiến hành bố trí thí nghiệm.

## 2.3 Phương pháp nghiên cứu

### 2.3.1 Nội dung 1: Xác định khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh *S. agalactiae* ở điều kiện *in vitro* của một số dịch chiết và cao chiết thảo dược

#### 2.3.1.1 Phân lập và định danh vi khuẩn *S. agalactiae*

Mẫu bệnh phẩm được cấy trên đĩa môi trường Brain Heart Infusion Agar (BHIA, 110886, Merck) để phân lập vi khuẩn và môi trường Blood Agar (BA, Merck) để xác định các dạng tan huyết (Buxton, 2005). Sau khi xác định đặc điểm sinh hóa và định danh vi khuẩn theo cẩm nang của Cowan và Steels (Barrow và Feltham, 1993) bằng test kit API 32 Strep (BioMerieux, Pháp), vi khuẩn được gửi đi định danh tại Phòng Xét nghiệm của Công

ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa (Quận 7, Tp. Hồ Chí Minh), bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA và so sánh với trình tự trên Ngân hàng gen NCBI.

### **2.3.1.2 Khảo sát khả năng kháng vi khuẩn *S. agalactiae* của cao chiết dạng thô**

#### **a. Thu dịch chiết và cao chiết**

Dịch chiết và cao chiết được thu bằng phương pháp tách chiết với dung môi ở nhiệt độ cao (có hiệu chỉnh), mô tả bởi Nayak và ctv (2017). Sau khi các loại thảo dược được nghiền thành dạng bột mịn, cho 10 g bột của mỗi loại (tính trên khối lượng khô) vào 100 ml dung môi (ethanol hoặc methanol). Chiết xuất trong 120 phút với bể điều nhiệt lắc với nhiệt độ 60°C, tốc độ lắc 120 vòng/phút. Sau đó, các dịch chiết được lọc thô (qua vải sạch đã được tiệt trùng) rồi tiếp tục lọc qua giấy Whatman với kích thước lỗ lọc 0,45 µm bằng dụng cụ lọc dùng bơm chân không để tạo thành các dịch chiết gốc. Để thu cao chiết, các dịch chiết gốc được tiến hành cô quay phần dịch lọc ở 60°C và áp suất chân không để loại bỏ dung môi, thành dạng cao lỏng (10 ml) có hàm lượng khô của thảo dược trong dung môi là 1 g/ml. Các dịch chiết và cao chiết được bảo quản trong tủ lạnh ở -20°C. Lượng dịch chiết, cao chiết sử dụng cho các thí nghiệm *in vitro* được tham khảo từ các nghiên cứu tương tự hoặc có liên quan vi khuẩn *S. agalactiae*.

#### **b. Khảo sát khả năng kháng khuẩn**

##### **❖ Dịch chiết**

Thí nghiệm sàng lọc khả năng kháng khuẩn của dịch chiết được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch (Balouiri và ctv, 2016). Hai chủng *S. agalactiae* SA-12.1 và SA-26.1 được sử dụng với mật độ 10<sup>6</sup> CFU/ml. Mẫu dịch chiết thảo dược gốc (0,1 g/ml) được bổ sung 0,8 ml dung môi (tương ứng dung môi dùng để tách chiết) để tiến hành điều chỉnh nồng độ bột thảo dược về 20 mg/ml (hay 20 g/l) tính theo khối lượng khô (Faikoh và ctv, 2014). Các đĩa thạch BHIA được cấy trải 1000 µl dịch khuẩn/đĩa *S. agalactiae* bằng que thủy tinh tam giác trong 1 phút, sau đó các giếng (đường kính 8 mm) được khoan trên bề mặt thạch. Dịch chiết thảo dược với lượng 80 µl (tương đương 1,6 mg thảo dược thô) được bơm vào mỗi giếng (mỗi nghiệm thức được lặp lại 6 lần). Các đĩa thạch được đặt vào tủ mát ở 4°C trong 15 phút và sau đó được ủ trong tủ ấm ở 30°C trong 48 giờ. Ở nghiệm thức đối chứng, sử dụng dung môi ethanol và methanol (không chứa thảo dược).

##### **❖ Cao chiết**

Thí nghiệm khảo sát khả năng kháng khuẩn của cao chiết được thực hiện bằng phương pháp đĩa giấy khuếch tán trên môi trường thạch (Kirby-Bauer, 1996). Hai chủng SA-12.1 và SA-26.1 được sử dụng với mật độ 10<sup>6</sup> CFU/ml. Các đĩa thạch BHIA được cấy trải với 1000 µl dịch khuẩn *S. agalactiae* (phương pháp trải đĩa tương tự mục khảo sát khả năng kháng khuẩn của dịch chiết). Cao chiết thảo dược với lượng 20 µl (tương đương 20 mg thảo dược thô) được tẩm vào mỗi đĩa giấy vô trùng có đường kính 6 mm, dày 1 mm (mỗi cao chiết thảo dược được tẩm vào 6 đĩa giấy). Các đĩa giấy đã được tẩm cao chiết được đặt lên mặt thạch ở 3 vị trí của đỉnh hình tam giác bằng nhíp tiệt trùng. Sau đó, các đĩa thạch được đặt vào tủ mát ở 4°C trong 15 phút và được ủ trong tủ ấm ở 30°C trong 48 giờ. Ở nghiệm thức đối chứng, các đĩa kháng sinh Doxycycline (30 µg) do Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa sản xuất được sử dụng và cũng được lặp lại 6 lần.

##### **❖ Đánh giá khả năng kháng khuẩn của dịch chiết và cao chiết**

Sau khi ủ 48 giờ, đo đường kính vòng kháng khuẩn (nếu có) tạo ra xung quanh các giếng/đĩa giấy.

- Với dịch chiết: khả năng kháng khuẩn được đánh giá theo 02 mức (Nascimento và ctv, 2000), cụ thể:  $D \geq 7$  mm: vi khuẩn mẫn cảm với dịch chiết (hay dịch chiết có khả năng kháng vi khuẩn);  $D < 7$  mm: vi khuẩn kháng với dịch chiết (hay dịch chiết không có khả năng kháng vi khuẩn). Trong đó:  $D = D_A - D_M$ , với  $D_M$  là đường kính vòng kháng khuẩn tạo ra bởi dung môi tương môi ở nghiệm thức đối chứng;  $D_A = D_1 - D_2$ , với  $D_1$  là đường kính vòng kháng khuẩn tạo thành xung quanh các giếng,  $D_2$  là đường kính giếng.

- Với cao chiết: khả năng kháng khuẩn được đánh giá theo 04 mức (Claustra và ctv, 2005), cụ thể:  $D < 10$  mm: vi khuẩn kháng với cao chiết (hay cao chiết không có khả năng kháng vi khuẩn);  $10 \text{ mm} < D < 13$  mm: cao chiết có khả năng kháng vi khuẩn ở mức trung bình;  $14 \text{ mm} < D < 19$  mm: cao chiết có khả năng kháng vi khuẩn;  $D > 19$  mm: cao chiết có khả năng kháng vi khuẩn ở mức mạnh. Trong đó:  $D = D_1 - D_2$ , với  $D_1$  là đường kính vòng kháng khuẩn tạo thành xung quanh đĩa giấy,  $D_2$  là đường kính đĩa giấy.

### **2.3.1.3 Xác định giá trị MIC và MBC của cao chiết dạng thô**

#### *a. Xác định giá trị MIC (Minimum Inhibitory Concentration, Nồng độ ức chế tối thiểu)*

Thí nghiệm được thực hiện trên đĩa 96 giếng, thể tích mỗi giếng 200  $\mu\text{l}$  (Al-Haj và ctv, 2018), 4 lần lặp lại cho mỗi loại cao chiết. 100  $\mu\text{l}$  mỗi loại cao chiết được cho vào mỗi giếng, nồng độ vật chất khô trong giếng đầu tiên đạt 32.000  $\mu\text{g/ml}$ . Sau đó tiến hành pha loãng bậc hai trong môi trường DMSO, cho đến khi đạt nồng độ thấp nhất là 62,5  $\mu\text{g/ml}$  (tổng cộng có 10 nồng độ). Các giếng đối chứng âm chứa 200  $\mu\text{l}$  môi trường MHB. Các giếng đối chứng dương chứa 100  $\mu\text{l}$  môi trường MHB. Dịch khuẩn *S. agalactiae* mật độ  $2 \times 10^4$  CFU/ml. 100  $\mu\text{l}$  vi khuẩn được bổ sung vào tất cả các giếng (trừ giếng đối chứng âm), mật độ vi khuẩn trong mỗi giếng đạt  $2 \times 10^3$  CFU/giếng (tương đương  $10^3$  CFU/100  $\mu\text{l}$ ). Sau khi các đĩa 96 giếng được ủ trong tủ ấm ở  $30^\circ\text{C}$  trong 24 giờ, 20  $\mu\text{l}$  thuốc thử resazurine 0,01% được cho vào mỗi giếng. Quan sát sự đổi màu của thuốc thử resazurine từ màu xanh sang màu hoa cà, màu tím và màu hồng (chứng tỏ có sự tăng trưởng của vi khuẩn) ở từng giếng (Faikoh và ctv., 2014). Giá trị MIC đối với mỗi loại cao chiết thảo dược là nồng độ thảo dược thấp nhất tại đó vi khuẩn không phát triển (thuốc thử resazurine không đổi màu).

#### *b. Xác định giá trị MBC (Minimum Bactericidal Concentration, Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu)*

Thí nghiệm được thực hiện bằng phương pháp trải đĩa (Oonmetta-Aree và ctv, 2006). 100  $\mu\text{L}$  hỗn dịch được hút ra từ mỗi giếng thuộc bốn dãy nồng độ liên tiếp, bắt đầu từ dãy nồng độ tại đó xác định giá trị MIC đến lần lượt ba dãy nồng độ liên kế cao hơn nồng độ MIC, sau đó hỗn dịch được cấy trải trên các đĩa thạch BHIA và được ủ ở  $30^\circ\text{C}$ . Sau 24 giờ, chúng tôi tiến hành quan sát sự hiện diện của các khuẩn lạc trên môi trường thạch. Giá trị MBC là nồng độ thấp nhất trong các nồng độ của cao chiết đã được cấy trải, tại đó không có khuẩn lạc nào xuất hiện trên đĩa thạch BHIA (Lorian, 1995).

### **2.3.2 Nội dung 2: Xác định ảnh hưởng của cao chiết lên tăng trưởng và khả năng bảo vệ cá rô phi kháng lại vi khuẩn gây bệnh *S. agalactiae***

#### **2.3.2.1 Xác định ảnh hưởng của cao chiết lên tăng trưởng**

Từ kết quả của thí nghiệm *in vitro*, cao chiết vỏ quế và cao chiết gừng được chọn để thực hiện thí nghiệm tiếp theo. Cao chiết gừng và cao chiết vỏ quế được chiết xuất bằng phương pháp tách chiết với dung môi ethanol ở nhiệt độ cao tương tự như ở mục 2.3.1.2.a và được bổ sung vào thức ăn với các tỷ lệ 10 g/kg, 20 g/kg và 40 g/kg. Thí nghiệm được thực hiện trên cá rô phi giống (5 g/con), trong 8 tuần và tại các bể composite thể tích 500 lít chứa 300 lít nước (có sục khí liên tục), mật độ 30 con/bể, cho cá ăn hàng ngày 4% khối lượng thân/ngày (Bhujel, 2013), bao gồm các nghiệm thức thể hiện ở Bảng 2.3. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần.

**Bảng 2.3** Các nghiệm thức của thí nghiệm xác định ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vào thức ăn lên tăng trưởng của cá rô phi

Nghiệm thức	Thức ăn
NT1	Không bổ sung thảo dược
NT2	Bổ sung cao chiết gừng với tỷ lệ 10 g/kg thức ăn
NT3	Bổ sung cao chiết gừng với tỷ lệ 20 g/kg thức ăn
NT4	Bổ sung cao chiết gừng với tỷ lệ 40 g/kg thức ăn
NT5	Bổ sung cao chiết vỏ quế với tỷ lệ 10 g/kg thức ăn
NT6	Bổ sung cao chiết vỏ quế với tỷ lệ 20 g/kg thức ăn
NT7	Bổ sung cao chiết vỏ quế với tỷ lệ 40 g/kg thức ăn

Sau khi kết thúc 8 tuần thí nghiệm, thu toàn bộ cá trong các bể để đánh giá các chỉ tiêu gồm: tỷ lệ sống ( $X (\%) = (N_t/N_0) \times 100$ ), tăng trưởng khối lượng (WG, gram =  $W_2 - W_1$ ), tăng trưởng khối lượng theo ngày (DWG, gram/ngày =  $(W_2 - W_1)/T$ ), tốc độ tăng trưởng đặc hiệu theo khối lượng (SGR, %/ngày =  $\ln(W_2) - \ln(W_1) / T \times 100$ ), hệ số chuyển hóa thức ăn (FCR = Lượng thức ăn (100% vật chất khô) /  $(W_2 - W_1)$ ). Trong đó:  $N_t$ : số lượng cá cuối thí nghiệm;  $N_0$ : số lượng cá ban đầu thí nghiệm;  $W_1$ : khối lượng cá khi bắt đầu thí nghiệm (được cân từng con);  $W_2$ : khối lượng cá khi kết thúc thí nghiệm (cân chung toàn bộ cá trong 1 bể và tính trung bình); T: thời gian thí nghiệm.

### 2.3.2.2 Xác định giá trị $LD_{50}$ và các yếu tố độc lực

#### a. Xác định giá trị $LD_{50}$

Thí nghiệm được thực hiện trong các bể nhựa thể tích nước 40 lít, trên cá rô phi giống (4-5 g/con) mật độ 12 con/bể; gồm 6 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần; trên 3 chủng vi khuẩn (SA-12.1, SA-26.1 và SA-2.1-CC) với 5 nồng độ gây nhiễm khác nhau và sử dụng phương pháp tiêm vi khuẩn vào xoang bụng cá. Cá ở nghiệm thức đối chứng được tiêm 0,1 ml nước muối sinh lý 9<sup>0</sup>/<sub>100</sub>; cá ở các nghiệm thức còn lại được tiêm 0,1 ml dịch vi khuẩn với các mật độ từ 10<sup>3</sup> CFU/ml đến 10<sup>7</sup> CFU/ml. Tiến hành sục khí và cho cá ăn trong quá trình thí nghiệm. Cá được ghi nhận tỷ lệ chết trong 7 ngày sau khi gây nhiễm (không ghi nhận những con chết trong vòng 5 giờ sau khi tiêm). Đến ngày thứ 6, cá ở các nghiệm thức bắt đầu ngưng chết, ghi nhận số liệu tại ngày thứ 7 và xác định liều gây chết  $LD_{50}$  theo công thức của Reed and Muench (1938):  $LD_{50} = 10^{a-x}$ .

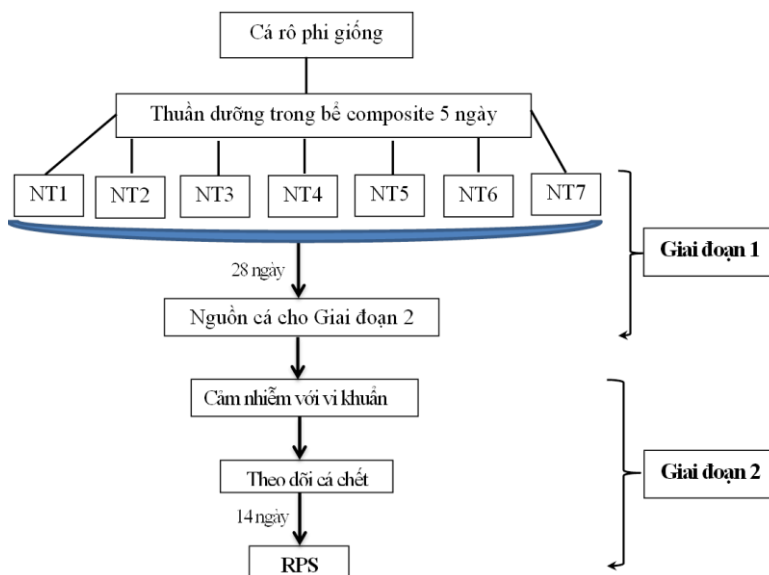
#### b. Xác định các yếu tố độc lực của chủng vi khuẩn có giá trị $LD_{50}$ thấp nhất

Căn cứ kết quả xác định  $LD_{50}$ , chủng *S. agalactiae* SA-2.1-CC được gửi giải trình tự toàn bộ bộ gen (Whole Genome Sequencing) tại Công ty TNHH LOBI Việt Nam (Quận Cầu Giấy, Hà Nội), để xác định các yếu tố độc lực. Phương pháp Phenol – Chloroform truyền thống mô tả bởi McKiernan và ctv (2017) được áp dụng trên mẫu *S. agalactiae* để tách chiết DNA đạt yêu cầu phân tích Illumina.

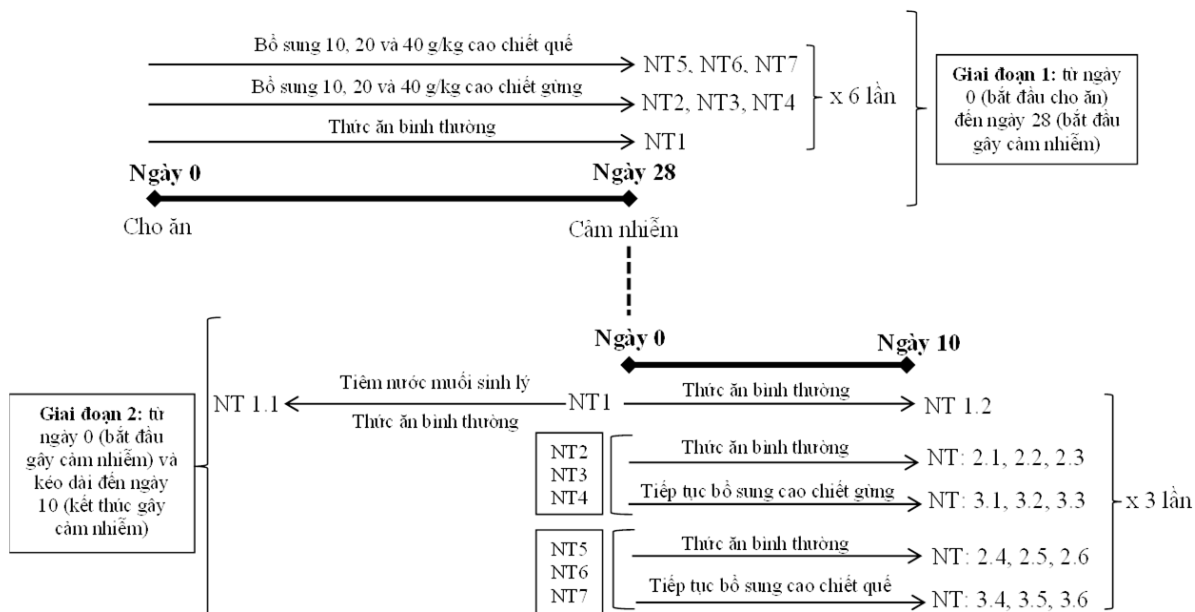
### 2.3.2.3 Xác định ảnh hưởng của cao chiết lên khả năng bảo vệ cá rô phi



Bố trí thí nghiệm được trình bày tại Hình 2.1 và Hình 2.2, thực hiện trên cá rô phi giống 4 g/con. Cao chiết gừng và cao chiết vỏ quế chiết xuất bằng phương pháp ngâm kiệt (Đoàn Văn Cường và ctv., 2019). Hiệu quả bảo vệ của cao chiết thảo dược được đánh giá thông qua chỉ số tỷ lệ sống tương đối RPS (Amend, 1981):  $RPS (\%) = \{1 - [\text{Số cá chết ở mỗi NT} / \text{Số cá chết ở NT được cảm nhiễm vi khuẩn ở nhóm 1}]\} \times 100$ .



**Hình 2.1** Sơ đồ bố trí thí nghiệm xác định khả năng bảo vệ cá rô phi

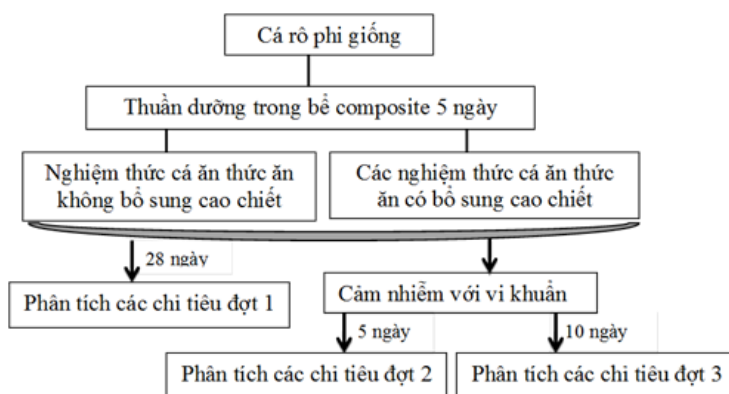


**Hình 2.2** Các giai đoạn của thí nghiệm xác định khả năng bảo vệ cá rô phi

### 2.3.3 Nội dung 3: Xác định ảnh hưởng của cao chiết lên các chỉ tiêu máu, chỉ tiêu miễn dịch và hình thái ruột của cá rô phi

Thí nghiệm được bố trí riêng biệt, cùng thời điểm với Thí nghiệm Xác định ảnh hưởng của cao chiết lên khả năng bảo vệ cá rô phi. Ba đợt thu mẫu máu và ruột cá tại 3 thời điểm đã được tiến hành (Hình 2.3) bằng cách thu ngẫu nhiên 3 con/bể/mẫu máu (tương ứng 3 mẫu máu/nghiệm thức). Ở thời điểm sau 28 ngày nuôi (tức trước khi cảm nhiễm), số lượng

mẫu máu được thu cũng là 3 mẫu (mặc dù bố trí 6 bể/nghiệm thức) để phù hợp số lượng mẫu máu thu vào hai thời điểm 5 và 10 ngày sau cảm nhiễm. Sau khi thu mẫu máu, mẫu ruột tiếp tục được thu bằng chọn ngẫu nhiên 1 trong 3 con cá đã dùng để thu mẫu máu (tương ứng 3 mẫu ruột/nghiệm thức). Tại thời điểm ngay trước khi cảm nhiễm vi khuẩn (tức là thời điểm sau 28 ngày nuôi), toàn bộ các nghiệm thức được thu mẫu máu và ruột. Còn tại các thời điểm 5 ngày và 10 ngày sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn, các mẫu ở toàn bộ các nghiệm thức của nhóm 2 và 3 được thu, riêng nhóm 1 chỉ mẫu ở nghiệm thức 1.2 được thu (do mục tiêu của nghiên cứu là khảo sát ảnh hưởng của cao chiết trong việc hỗ trợ nâng cao sức đề kháng, miễn dịch của cá khi tiếp xúc với tác nhân gây bệnh).



**Hình 2.3** Bố trí thí nghiệm khảo sát các chỉ tiêu miễn dịch và mô học ruột

**Phân tích tế bào máu và các chỉ tiêu miễn dịch:** Số lượng hồng cầu (RBC) và bạch cầu (WBC) được đo theo phương pháp được mô tả bởi Natt và Herrick (1952). Các loại bạch cầu khác nhau được xác định theo mô tả của Claver và Quaglia (2009), phần trăm của mỗi loại WBC được đếm trong tổng số 200 tế bào được xác định. Hoạt tính thực bào thông qua chỉ số thực bào (PA) được xác định theo Findlay và Munday (2000).

**Phân tích chỉ tiêu hình thái mô ruột cá:** Mẫu ruột cá được cố định trong dung dịch formalin 10%, sau đó xử lý theo phương pháp mô học truyền thống làm ra các tiêu bản. Chiều cao nhung mao (VH,  $\mu\text{m}$ ) được đo từ đỉnh của nhung mao đến đỉnh của lớp đệm; chiều rộng nhung mao (VW,  $\mu\text{m}$ ) được đo theo bề ngang nhỏ nhất của nhung mao; diện tích nhung mao (VA) được tính theo công thức:  $2\pi \times (VW/2) \times VH$  (Bentley và ctv, 2019); độ dày lớp đệm niêm mạc ( $\mu\text{m}$ ) được đo từ đỉnh đến đáy của niêm mạc cơ (Dos Santos và ctv, 2005) (Hình 2.4).



**Hình 2.4** Các chỉ tiêu khảo sát hình thái mô học ruột của cá thí nghiệm: chiều cao nhung mao (mũi tên màu đen), chiều rộng nhung mao (mũi tên màu vàng), độ dày lớp đệm niêm mạc (mũi tên màu xanh)

### **2.3.4 Nội dung 4: Xác định hàm lượng và khả năng kháng khuẩn của hoạt chất chính**

#### **2.3.4.1 Xác định hàm lượng hoạt chất 6-gingerol và cinnamic aldehyde**

Cao chiết gừng và cao chiết vỏ quế được phân tích xác định thành phần hoạt chất kháng khuẩn bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp HPLC tại Trung tâm Sâm và Dược liệu Thành phố Hồ Chí Minh.

#### **2.3.4.2 Khảo sát khả năng kháng vi khuẩn của hoạt chất chính**

Sau khi có kết quả xác định thành phần hoạt chất chính, khảo sát khả năng kháng khuẩn của cao chiết theo hàm lượng hoạt chất chính trên chủng *S. agalactiae* SA-2.1-CC đã được tiến hành, bằng phương pháp đĩa giấy khuếch tán trên môi trường thạch (Kirby-Bauer, 1996). Cách thức tiến hành và đánh giá tương tự mục 2.3.1.3. Mỗi đĩa giấy vô trùng có đường kính 6 mm được tẩm cao chiết sao cho hàm lượng hoạt chất chính đạt 50, 100 và 200 µg, mỗi nồng độ lặp lại 6 lần. Kháng sinh Doxycycline được sử dụng ở nghiệm thức đối chứng và được lặp lại 6 lần.

#### **2.3.4.3 Xác định giá trị MIC và MBC của cao chiết theo hàm lượng chất chính**

##### *a. Xác định MIC*

Thí nghiệm được thực hiện tương tự mục 2.3.1.3.a. 100 µl mỗi loại cao chiết được cho vào các giếng, nồng độ hoạt chất chính trong giếng đầu tiên đạt 200 µg/100 µl cao chiết thảo dược. Sau đó tiến hành pha loãng bậc 2 trong môi trường DMSO 1% (Tjernberg và ctv, 2005) cho đến khi đạt nồng độ hoạt chất chính thấp nhất là 1,5625 µg/100 µl cao chiết thảo dược (tổng cộng có 08 nồng độ,) mỗi nồng độ lặp lại 4 lần. Các giếng đối chứng âm chứa 200 µl môi trường BHIB (110493, Merck). Các giếng đối chứng dương chứa 100 µl BHIB. Dịch khuẩn *S. agalactiae* mật độ  $10^4$  CFU/ml và mật độ vi khuẩn trong mỗi giếng đạt  $5 \times 10^3$  CFU/ml. Sau 48 giờ ủ ấm, cho 20 µl thuốc thử resazurine (0,01%) vào mỗi giếng. Quan sát sự đổi màu của thuốc thử tương tự mục 2.3.1.3 và ghi nhận giá trị MIC.

##### *b. Xác định MBC: thực hiện tương tự mục 2.3.1.3.b.*

**2.4 Xử lý số liệu:** Tất cả các số liệu được nhập và lưu trữ bằng Excel. Sự khác biệt giữa các nghiệm thức về các chỉ tiêu (trừ các thông số môi trường nước, LD<sub>50</sub> và RPS) được phân tích thống kê bằng kiểm định One-way ANOVA với phép thử Tukey ở mức ý nghĩa  $P < 0,05$  bằng phần mềm SPSS 20.0.

## **CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1 Nội dung 1: Xác định khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh *S. agalactiae* ở điều kiện *in vitro* của một số dịch chiết và cao chiết thảo dược**

### **3.1.1 Phân lập và định danh các chủng *S. agalactiae* sử dụng trong nghiên cứu**

Kết quả phân lập cho thấy có thấy 5/12 mẫu cá thu được có sự hiện diện của vi khuẩn *S. agalactiae*. Năm chủng vi khuẩn phân lập được từ các mẫu cá thu tại tỉnh Đồng Nai, cùng với chủng SA-2.1-CC được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản II (phân lập được từ mẫu cá rô phi vằn giống thu được ở huyện Củ Chi, TP. HCM), được gửi định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA. Kết quả định danh cho thấy tất cả các chủng đều là *S. agalactiae*. Nghiên cứu đã chọn 2 chủng phân lập được từ mẫu cá tại tỉnh Đồng Nai (chủng SA-12.1 phân lập được từ mẫu cá thương phẩm; chủng SA-26.1 phân lập được

từ mẫu cá giống) và chủng SA-2.1-CC để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo; trong đó hai chủng SA-12.1 và SA-26.1 được dùng để khảo sát khả năng kháng khuẩn của các dịch chiết thảo dược và cao chiết tách chiết với dung môi ở nhiệt độ cao nhằm tạo tiền đề xác định được các loại dịch chiết thảo dược cho khả năng kháng khuẩn tốt nhất. Riêng kết quả khảo sát loại cao chiết cho kết quả kháng khuẩn tốt nhất bằng phương pháp tách chiết ngâm kiệt trên chủng SA-2.1-CC được kế thừa từ Đoàn Văn Cường và ctv (2019).

### 3.1.2 Sàng lọc khả năng kháng *S. agalactiae* của dịch chiết

Nghiên cứu tiền hành khảo sát khả năng kháng khuẩn của 7 loại dịch chiết thảo dược (Bảng 2.1) với hai chủng vi khuẩn *S. agalactiae* SA-12.1 và SA-26.1. Kết quả cho thấy, chỉ có dịch chiết của vỏ quế và củ gừng có khả năng kháng với vi khuẩn ( $D \geq 7$  mm), vòng kháng khuẩn tạo ra bởi hai dịch chiết này lớn hơn và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ) so với nghiệm thức đối chứng (chỉ chứa dung môi) (Bảng 3.1). Dựa vào kết quả này, vỏ quế và củ gừng được chọn để tiếp tục thí nghiệm ở dạng cao chiết.

**Bảng 3.1** Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) tạo thành xung quanh các giếng tằm dịch chiết thảo dược sau 48 giờ tiếp xúc với vi khuẩn SA-12.1 và SA-26.1

STT	Loại dịch chiết/dung môi	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)			
		SA-12.1		SA-26.1	
		Ethanol	Methanol	Ethanol	Methanol
1	Cây diếp cá	2,40 ± 0,45 <sup>bc</sup>	3,60 ± 0,84 <sup>bc</sup>	3,10 ± 1,00 <sup>a</sup>	4,68 ± 1,24 <sup>c</sup>
2	Củ hành có vỏ	2,15 ± 1,21 <sup>abc</sup>	2,02 ± 1,32 <sup>ab</sup>	0,77 ± 0,41 <sup>a</sup>	0,90 ± 0,73 <sup>a</sup>
3	Củ hành không vỏ	1,82 ± 0,38 <sup>ab</sup>	0,85 ± 0,42 <sup>a</sup>	0,66 ± 0,86 <sup>a</sup>	1,60 ± 0,87 <sup>ab</sup>
4	Lá kinh giới	2,23 ± 0,93 <sup>bc</sup>	2,52 ± 0,74 <sup>ab</sup>	1,08 ± 0,74 <sup>a</sup>	3,18 ± 1,39 <sup>bc</sup>
5	Vỏ quế	7,23 ± 0,52 <sup>d</sup>	4,93 ± 1,08 <sup>cd</sup>	3,02 ± 1,50 <sup>a</sup>	5,10 ± 1,22 <sup>c</sup>
6	Củ gừng	3,53 ± 1,29 <sup>c</sup>	6,35 ± 2,73 <sup>d</sup>	8,27 ± 0,82 <sup>b</sup>	9,27 ± 1,33 <sup>d</sup>
7	Củ riềng	0,70 ± 0,55 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,71 <sup>a</sup>	3,50 ± 3,58 <sup>a</sup>	4,43 ± 0,61 <sup>c</sup>
-	Dung môi	2,58 ± 0,49	2,92 ± 0,38	2,42 ± 0,38	1,92 ± 1,16

Ghi chú: Số liệu thể hiện 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 ( $P < 0,05$ ). Số liệu đường kính vòng kháng khuẩn tạo ra xung quanh các giếng tằm dịch chiết thảo dược đã được trừ đi số liệu đường kính vòng kháng khuẩn tạo ra bởi dung môi.

### 3.1.3 Khảo sát khả năng kháng *S. agalactiae* của cao chiết dạng thô

Kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn của cao chiết thảo dược trong hai dung môi ethanol và methanol đối với hai chủng SA-12.1 và SA-26.1 cho thấy, cao chiết vỏ quế cho đường kính vòng kháng khuẩn cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ) so với cao chiết gừng khi khảo sát trên cả hai chủng SA-12.1 và SA-26.1. Đồng thời, đường kính vòng kháng khuẩn tạo ra bởi cả hai loại cao chiết khi khảo sát trên chủng SA-26.1 cao hơn khi khảo sát trên chủng SA-12.1; và cao chiết vỏ quế cho đường kính vòng kháng khuẩn gần tương đương với đường kính vòng kháng khuẩn tạo ra bởi kháng sinh Doxycycline (30 µg) khi khảo sát trên chủng SA-26.1. Bên cạnh đó, cao chiết gừng chiết xuất với cả hai dung môi ethanol và methanol đều cho thấy không có khả năng kháng khuẩn khi khảo sát trên chủng SA-12.1 (đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt là 6,42 mm và 9,50 mm), trong khi lại có khả năng kháng khuẩn khi khảo sát trên chủng SA-26.1 (đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt là 14,83 mm và 19,62 mm). Cao chiết vỏ quế chiết xuất với cả hai dung môi ethanol và methanol đều cho thấy có khả năng kháng khuẩn khi khảo sát trên hai chủng SA-12.1 và SA-26.1, trong đó trên chủng SA-26.1 cho thấy khả năng kháng khuẩn của cao chiết

quế ở mức mạnh (Bảng 3.2). Kết quả nêu trên là cơ sở để lựa chọn vỏ quế và củ gừng cho việc thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

**Bảng 3.2** Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) tạo thành xung quanh các đĩa giấy tẩm cao chiết thảo dược sau 48 giờ tiếp xúc với vi khuẩn SA-12.1 và SA-26.1

Loại cao chiết/dung môi	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)				
	SA-12.1		SA-26.1		SA-2.1-CC <sup>**</sup>
	Ethanol	Methanol	Ethanol	Methanol	Ethanol
Vỏ quế	17,67 ± 2,23 <sup>b</sup>	16,25 ± 1,41 <sup>b</sup>	33,42 ± 0,97 <sup>b</sup>	32,75 ± 5,38 <sup>b</sup>	33,45 - 34,23
Củ gừng	6,42 ± 0,86 <sup>a</sup>	9,50 ± 0,71 <sup>a</sup>	14,83 ± 0,68 <sup>a</sup>	19,67 ± 0,68 <sup>a</sup>	15,12 – 16,47
Kháng sinh Doxycycline (30 µg)	26,58 ± 1,16		34,58 ± 1,20		-

*Ghi chú: Số liệu thể hiện 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).*

*\*\*:* Nguồn Đoàn Văn Cường và ctv, 2019.

### 3.1.4 Xác định giá trị MIC và MBC của cao chiết gừng và cao chiết vỏ quế

Cao chiết gừng và vỏ quế trong cả hai loại dung môi đều có khả năng diệt khuẩn (MBC/MIC = 2) khi thử nghiệm trên hai chủng SA-12.1 và SA-26.1 (Bảng 3.3).

**Bảng 3.3** Kết quả xác định giá trị MIC và MBC của cao chiết gừng và vỏ quế dạng thô đối với hai chủng SA-12.1 và SA-26.1 trong dung môi ethanol và methanol

Chủng	Loại cao chiết	Loại dung môi	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MBC/MIC
SA-12.1	Gừng	Ethanol	4.000	8.000	2
		Methanol	2.000	4.000	2
	Vỏ quế	Ethanol	8.000	16.000	2
		Methanol	8.000	16.000	2
SA-26.1	Gừng	Ethanol	2.000	4.000	2
		Methanol	2.000	4.000	2
	Vỏ quế	Ethanol	4.000	8.000	2
		Methanol	4.000	8.000	2
SA-2.1-CC <sup>**</sup>	Gừng	Ethanol	1.000	2.000	2
	Vỏ quế	Ethanol	2.000	8.000	4

*\*\*:* Nguồn Đoàn Văn Cường và ctv, 2019.

Như vậy, cao chiết gừng và vỏ quế đều thể hiện khả năng kháng vi khuẩn *S. agalactiae* khi khảo sát trên hai chủng SA-12.1, SA-26.1 do nghiên cứu này phân lập được (dung môi ethanol và methanol), và trên chủng SA-CC-2.1 (dung môi ethanol). Trên cơ sở các kết quả thí nghiệm *in vitro* ghi nhận được và công bố của Đoàn Văn Cường và ctv (2019), hai loại thảo dược thể hiện khả năng kháng *S. agalactiae* tốt nhất trong các loại thảo dược được khảo sát, gồm cao chiết vỏ quế và củ gừng được chọn để tiến hành thí nghiệm xác định ảnh hưởng lên tăng trưởng của cá rô phi khi bổ sung vào thức ăn. Bên cạnh đó, kết quả cho thấy khi so sánh trên từng loại cao chiết, đường kính vòng kháng khuẩn và giá trị MIC, MBC được tạo ra từ cao chiết vỏ quế và cao chiết gừng chiết xuất bởi ethanol và methanol cho kết quả không có khác biệt lớn. Trong nghiên cứu của Đoàn Văn Cường và ctv (2019), ethanol là dung môi được sử dụng để chiết xuất cao chiết thảo dược. Mặt khác, ethanol là dung môi có tính an toàn cao, thuận tiện và được khuyến khích sử dụng trong quy mô công nghiệp cũng như trong các hướng phát triển về dược lý. Do đó, nghiên cứu này đã chọn dung môi ethanol để chiết xuất cao chiết vỏ quế và cao chiết gừng phục vụ cho các thí nghiệm *in vivo*.

## **3.2 Nội dung 2: Xác định ảnh hưởng của cao chiết lên tăng trưởng và khả năng bảo vệ cá rô phi kháng lại vi khuẩn gây bệnh *S. agalactiae***

### **3.2.1 Xác định ảnh hưởng của cao chiết lên tăng trưởng**

Với các hàm lượng bổ sung (10, 20 và 40 g/kg thức ăn) của cao chiết gừng và cao chiết vỏ quế vào thức ăn, sự phát triển và sinh trưởng của cá thí nghiệm không bị ảnh hưởng. Với chỉ tiêu FCR, cá ở nghiệm thức không bổ sung cao chiết thảo dược vào thức ăn (NT1) có FCR cao nhất (1,54) trong khi cá ở nghiệm thức được ăn thức ăn bổ sung cao chiết vỏ quế với hàm lượng 20 g/kg (NT6) có FCR thấp nhất (1,38), nhưng sự khác biệt nhưng không có ý nghĩa thống kê ( $P > 0,05$ ). Ghi nhận đối với chỉ tiêu tăng trưởng và tỷ lệ sống từ nghiên cứu này cho thấy có sự khác biệt với một số nghiên cứu của Doan và ctv (2019a, 2019b, 2019c) đã công bố trên cùng đối tượng cá rô phi (tác dụng thúc đẩy tăng trưởng khi bổ sung 5 g/kg thức ăn chiết xuất của cúc chi thiên, 10 g/kg thức ăn chiết xuất của bột lười cọp, 2 g/kg thức ăn chiết xuất của trà xanh) khi việc bổ sung cao chiết gừng và cao chiết vỏ quế không có tác dụng cải thiện tăng trưởng và tỷ lệ sống một cách rõ rệt (thể hiện qua sự khác biệt có ý nghĩa thống kê). Tuy vậy, nghiên cứu lại có sự tương đồng khi kết quả theo dõi tăng trưởng trên cao chiết vỏ quế phù hợp với nhận định của nhiều nhà nghiên cứu rằng việc sử dụng thức ăn có chứa thành phần đã được chứng minh có vai trò giúp nâng cao khả năng kháng bệnh thì không phải lúc nào cũng giúp đối tượng nuôi đạt được sự tăng trưởng tốt nhất (Galindo-Villegas và Hosokawa, 2004; Ndong, 2007).

### **3.2.2 Xác định giá trị LD<sub>50</sub> và các yếu tố độc lực**

#### **3.2.2.1 Xác định giá trị LD<sub>50</sub>**

Chủng SA-2.1-CC có độc lực cao nhất ( $LD_{50} = 1,3 \times 10^3$  CFU/ml). Giá trị LD<sub>50</sub> của chủng SA-12.1 và SA-26.1 cao hơn trên chủng SA-2.1-CC và tương đương với giá trị LD<sub>50</sub> trên cá rô phi đã được công bố (khoảng  $10^5 - 10^6$  CFU/ml). Chủng SA-2.1-CC được chọn để cảm nhiễm cá trong các thí nghiệm *in vivo* tiếp theo và được chọn để giải trình tự toàn bộ bộ gen để xác định các yếu tố độc lực.

#### **3.2.2.2 Xác định các yếu tố độc lực**

Chủng vi khuẩn SA-2.1-CC được giải trình tự toàn bộ bộ gen để xác định các yếu tố độc lực, khẳng định thêm cơ sở về độc lực thông qua kiểu hình. Kết quả cho thấy, hệ gene của chủng này chứa bảy locus là *adhP*(9), *pheS*(5), *atr*(7), *glnA*(1), *sdhA*(3), *glcK*(3) và *tkt*(2), được xếp thuộc nhóm ST 283 khi sử dụng cơ sở dữ liệu phân loại vi sinh vật PubMLST. Bên cạnh đó, tìm thấy 11/14 gen độc lực hiện diện ở chủng SA-2.1-CC, trong đó gồm 3/5 gen nhóm bám dính, 5/6 gen nhóm xâm lấn (quan trọng nhất) và toàn bộ 4 gen nhóm kháng miễn dịch (Bảng 3.4). Hai gen phổ biến là *cfb* (CAMP factor) và *cylE* ( $\beta$ -hemolysin/cytolysin) (Zhang, 2021) đều hiện diện trong chủng *S. agalactiae* CC-2.1. Nhìn chung, chủng SA-2.1-CC mang các yếu tố độc lực quan trọng đã được công bố trên vi khuẩn *S. agalactiae*, gồm 11/14 gen độc lực đã được biết và thuộc phức hợp chủng riêng biệt CC283 với kiểu trình tự ST283.

**Bảng 3.4** Các gen độc lực tìm thấy trong chủng *S. agalactiae* SA-2.1-CC

STT	Nhóm	Tên gen (Lin và ctv, 2011)	Ghi chú	Sự hiện diện	Cơ sở dữ liệu gen độc lực
1	Bám dính	<i>fbsA</i>	Fibrinogen-binding protein A	-	
		<i>fbsB</i>	Fibrinogen-binding protein B	-	
		<i>pavA</i>	Fibronectin-binding protein	Có	-
		<i>lmb</i>	Laminin-binding protein	Có	-
		<i>scpB*</i>	C5a peptidase	Có	-
2	Xâm lấn	<i>cfb</i>	CAMP factor	Có	VFDB
		<i>cylE</i>	$\beta$ -hemolysin/cytolysin	Có	Victors
		<i>bca</i>	C- $\alpha$ protein	-	
		<i>hylB</i>	Hyaluronate lyase	Có	VFDB
		<i>spb1</i>	Hemolysin III	Có	-
3	Kháng/Né tránh miễn dịch	<i>rib</i>	Surface protein	Có	-
		<i>bac</i>	C- $\beta$ protein	Có	-
		<i>pbp1A/ ponA</i>	Penicillin-binding protein1A	Có	Victors
		<i>cspA</i>	Serine protease	Có	-
		<i>scpB*</i>	C5a peptidase	Có	-

\*: gen *scpB* được xếp cả nhóm bám dính và nhóm né tránh miễn dịch

### 3.2.3 Xác định ảnh hưởng của cao chiết lên khả năng bảo vệ cá rô phi

Sau khi cảm nhiễm, cá ở các nghiệm thức (trừ nghiệm thức cá được tiêm nước muối sinh lý, NT1.1) bắt đầu có các biểu hiện bệnh lý và chết với số lượng khá nhiều trong vòng 24 giờ. Số lượng cá chết bắt đầu giảm từ ngày thứ 2, ngưng chết ở ngày thứ 7 đối với các nghiệm thức bổ sung cao chiết vào thức ăn và ở ngày thứ 8 đối với nghiệm thức cá được tiêm vi khuẩn nhưng cho ăn thức ăn không bổ sung cao chiết (NT1.2); đồng thời cá ở các nghiệm thức đều có biểu hiện các dấu hiệu bệnh lý trên cơ thể. Kết thúc thời gian 10 ngày theo dõi, tỷ lệ chết tích lũy ghi nhận được cho thấy ở nghiệm cá được tiêm vi khuẩn nhưng cho ăn thức ăn không bổ sung cao chiết (NT1.2) là cao nhất (77,8%), nghiệm thức tiếp tục bổ sung cao chiết vô quế với hàm lượng 20 g/kg thức ăn sau khi cảm nhiễm vi khuẩn là thấp nhất (37,8%), các nghiệm thức còn lại dao động từ 51,1% đến 68,9%. Ở cả hai nhóm nghiệm thức, cao chiết vô quế với hàm lượng 20 g/kg đều cho hiệu quả bảo vệ cao nhất. Ở nhóm 2, nhìn chung hiệu quả bảo vệ của cao chiết vô quế cao hơn khi so sánh với cao chiết gừng, tuy nhiên chỉ số RPS đều thấp hơn 50% (Bảng 3.5).

**Bảng 3.5** Hiệu quả bảo vệ của cao chiết gừng và cao chiết vô quế với cá rô phi khi được cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae*

STT	Loại cao chiết thảo dược	Hàm lượng cao chiết (g/kg thức ăn)	RPS (%)	
			Nhóm 2	Nhóm 3
1	Gừng	10	20,0	34,3
2		20	21,4	24,3
3		40	20,0	11,4
4	Quế	10	21,4	17,1
5		20	<b>34,3</b>	<b>51,4</b>
6		40	22,9	30,0

Ghi chú: Nhóm 2: không tiếp tục cho ăn thảo dược sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn; Nhóm 3: tiếp tục cho ăn thảo dược sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn; Nghiệm thức không cảm nhiễm với vi khuẩn và không bổ sung cao chiết: tỷ lệ sống của cá là 100% nên không có kết quả RPS.

### 3.3 Nội dung 3: Xác định ảnh hưởng của cao chiết lên các chỉ tiêu máu, chỉ tiêu miễn dịch và hình thái ruột của cá rô phi

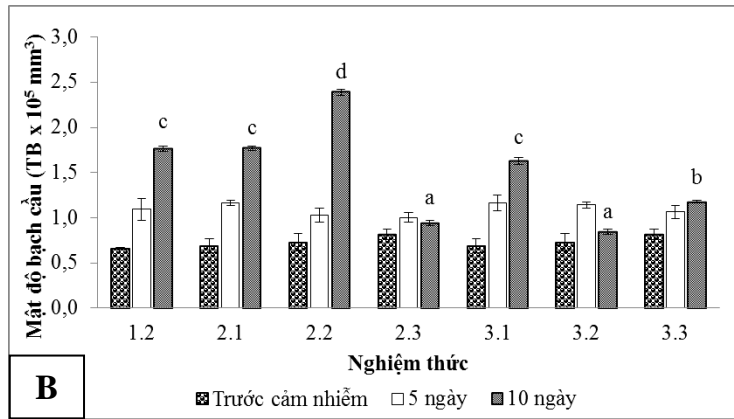
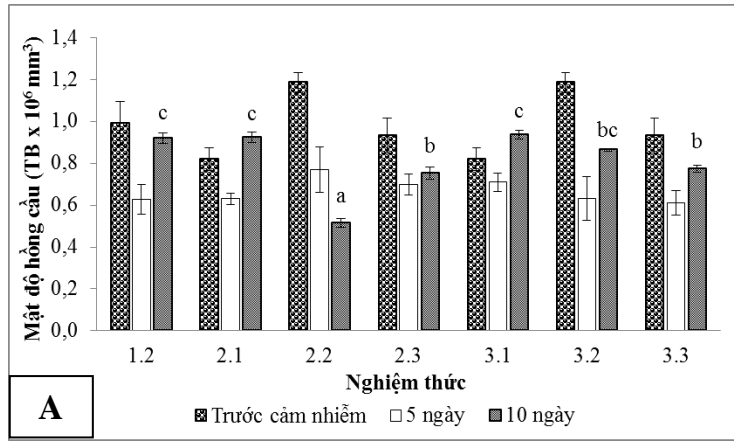
### 3.3.1 Xác định ảnh hưởng lên chỉ tiêu máu và chỉ tiêu miễn dịch

#### 3.3.1.1 Mật độ hồng cầu và bạch cầu

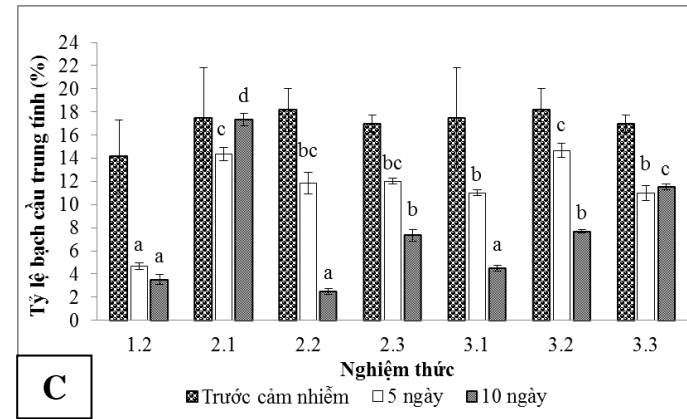
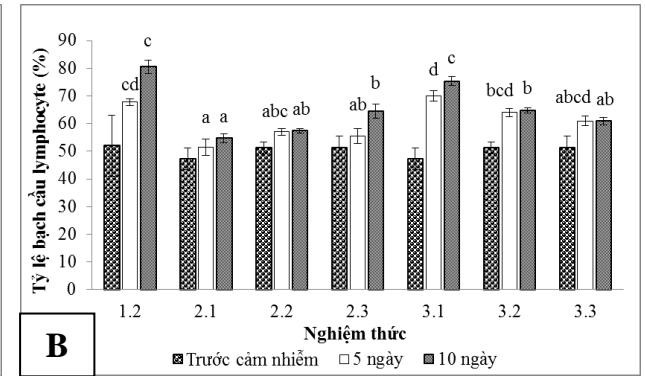
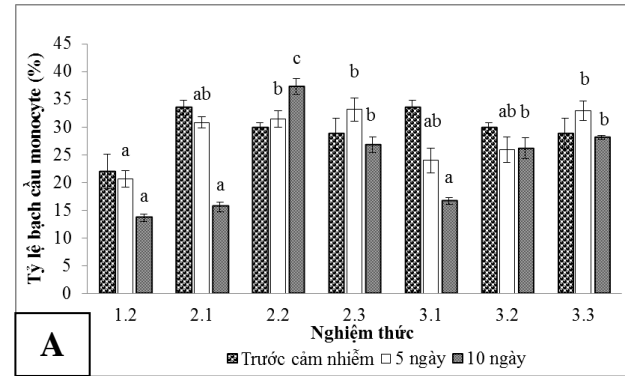
Kết quả phân tích mật độ hồng cầu, bạch cầu trong nghiên cứu này hoàn toàn phù hợp với các công bố trước đây. Ở thời điểm trước khi cảm nhiễm (tức là sau 28 ngày thí nghiệm), mật độ hồng cầu trong máu cá thí nghiệm nằm trong khoảng phù hợp, dao động từ  $1 - 3,5 \times 10^6$  tế bào/mm<sup>3</sup> trên cá nước ngọt (Glomski và Pica, 2006). Bạch cầu trong máu cá có số lượng ít hơn hồng cầu khoảng từ 10 – 100 lần. Tỷ lệ (%) của bạch cầu lympho luôn cao nhất, tiếp theo là bạch cầu đơn nhân, và cuối cùng là bạch cầu đa nhân, hoàn toàn phù hợp với công bố của Hrubec và ctv (2000) và Goda (2008) trên cá rô phi. Đối với cao chiết gừng, sau thời gian cảm nhiễm vi khuẩn (5 và 10 ngày), nghiên cứu ghi nhận được sự khác biệt không có ý nghĩa về mật thống kê ( $P > 0,05$ ) giữa mật độ hồng cầu của cá ở nghiệm thức NT 1.2 với các nghiệm thức tiếp tục bổ sung cao chiết gừng; và ở thời điểm sau 5 ngày cảm nhiễm vi khuẩn, mật độ hồng cầu đều giảm ở tất cả các nghiệm thức. Đối với mật độ bạch cầu, ở thời điểm trước khi cảm nhiễm và sau 5 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn, sự khác biệt mật độ bạch cầu của cá ở các nghiệm thức không có ý nghĩa về mật thống kê ( $P > 0,05$ ); đến thời điểm sau 10 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn, có sự gia tăng mật độ bạch cầu ở nghiệm thức 1.2 và ở hầu hết các nghiệm thức bổ sung cao chiết gừng; đồng thời sự khác biệt này có ý nghĩa về mật thống kê ( $P < 0,05$ ) giữa nghiệm thức NT 1.2 và NT 2.2 (Hình 3.1). Bên cạnh đó, kết quả phân tích tỷ lệ các loại bạch cầu cho thấy, sau khi cảm nhiễm vi khuẩn thì tỷ lệ bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính ở các nghiệm thức được bổ sung cao chiết gừng với tất cả các hàm lượng đều cao hơn ở nghiệm thức 1.2 và sự khác biệt này có ý nghĩa về mật thống kê ( $P < 0,05$ ); tuy nhiên điều này chưa rõ ràng ở tỷ lệ bạch cầu lymphocyte (Hình 3.2).

Đối với cao chiết vỏ quế, sau 5 ngày cảm nhiễm vi khuẩn, mật độ hồng cầu đều giảm ở tất cả các nghiệm thức và ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa về mật thống kê ( $P < 0,05$ ) giữa mật độ hồng cầu của cá ở nghiệm thức NT 1.2 với nghiệm thức tiếp tục bổ sung cao chiết vỏ quế hàm lượng 20 g/kg (NT 3.5); sau ngày thứ 10 cảm nhiễm vi khuẩn, mật độ hồng cầu tăng ở các nghiệm thức tiếp tục bổ sung cao chiết vỏ quế nhưng tiếp tục giảm ở các nghiệm thức không tiếp tục bổ sung cao chiết vỏ quế (Hình 3.3). Đối với mật độ bạch cầu, ở thời điểm trước khi cảm nhiễm và sau 5 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn, mật độ bạch cầu của cá ở hầu hết các nghiệm thức bổ sung cao chiết vỏ quế đều cao hơn so với của cá ở nghiệm thức cho ăn thức ăn không bổ sung cao chiết, tuy nhiên những sự khác biệt này không có ý nghĩa về mật thống kê ( $P > 0,05$ ); đến thời điểm sau 10 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn, có sự gia tăng mật độ bạch cầu ở nghiệm thức 1.2 và các nghiệm thức không tiếp tục bổ sung cao chiết vỏ quế, trong khi ở các nghiệm thức tiếp tục bổ sung cao chiết vỏ quế thì lại giảm; đồng thời sự khác biệt này có ý nghĩa về mật thống kê ( $P < 0,05$ ) (Hình 3.9). Bên cạnh đó, kết quả phân tích tỷ lệ các loại bạch cầu cho thấy, sau khi cảm nhiễm vi khuẩn thì tỷ lệ bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính ở các nghiệm thức được bổ sung cao chiết vỏ quế với hàm lượng 20 và 40 g/kg thức ăn đều cao hơn ở nghiệm thức 1.2 và sự khác biệt này có ý nghĩa về mật thống kê ( $P < 0,05$ ) (Hình 3.4).



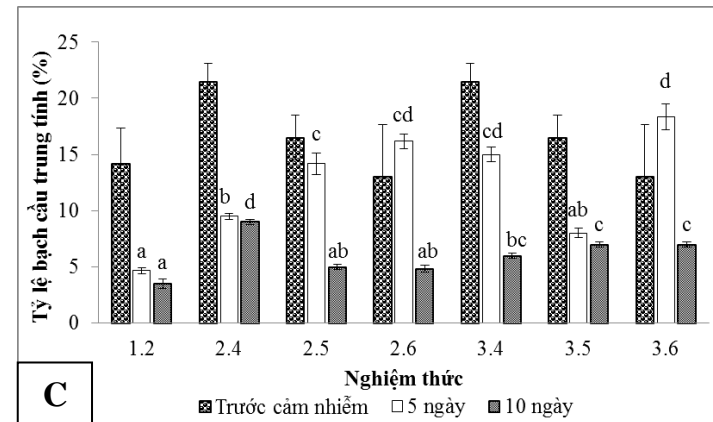
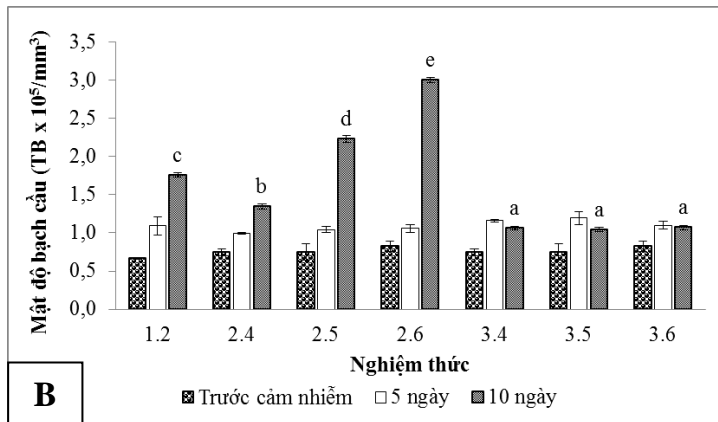
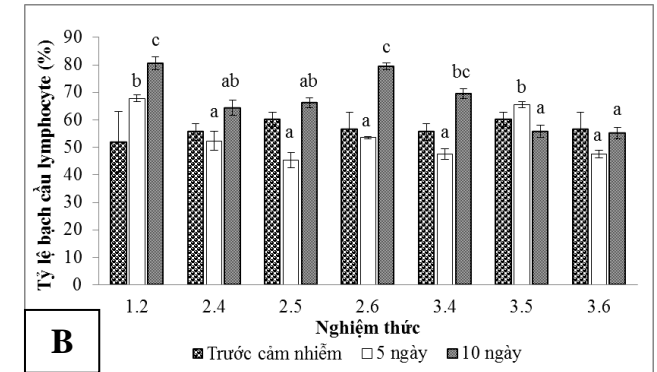
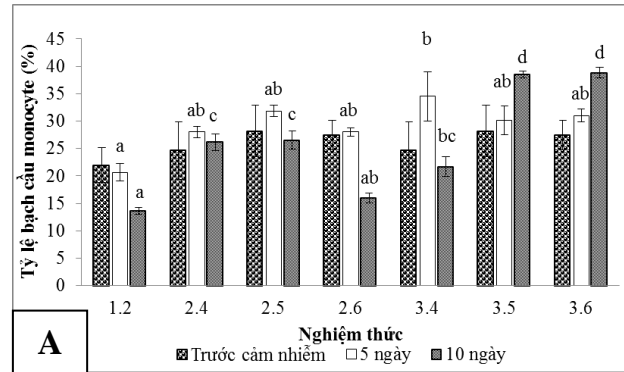
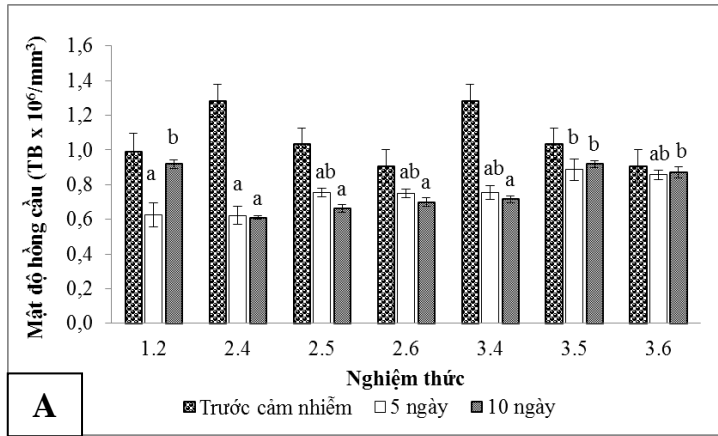


**Hình 3.1** Mật độ hồng cầu (A) và bạch cầu (B) của các nghiệm thức bổ sung cao chiết gừng tại các thời điểm cảm nhiễm khác nhau



**Hình 3.2** Tỷ lệ các loại bạch cầu của các nghiệm thức bổ sung cao chiết gừng tại các thời điểm cảm nhiễm khác nhau (A: bạch cầu đơn nhân, B: bạch cầu lympho; C: bạch cầu trung tính)

*Ghi chú (chung cho Hình 3.1 và 3.2): Trong cùng thời điểm và đối với mỗi loại bạch cầu, các nghiệm thức có các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. NT 1.2: cá cảm nhiễm với vi khuẩn và không bổ sung cao chiết vào thức ăn; NT 2.1: bổ sung 10 g/kg cao chiết gừng trước khi cảm nhiễm; NT 2.2: bổ sung 20 g/kg cao chiết gừng trước khi cảm nhiễm; NT 2.3: bổ sung 40 g/kg cao chiết gừng trước khi cảm nhiễm; NT 3.1-3.3: bổ sung cao chiết gừng với hàm lượng tương ứng nghiệm thức 2.1-2.3, trước và sau khi cảm nhiễm.*



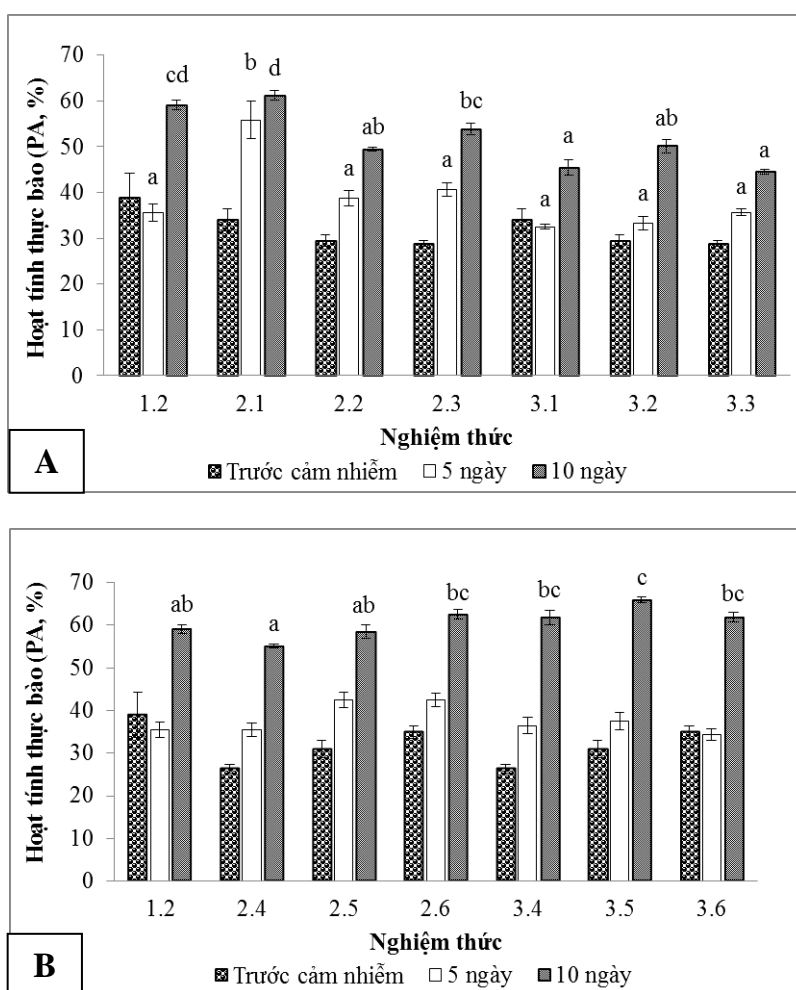
**Hình 3.3** Mật độ hồng cầu (A) và bạch cầu (B) của các nghiệm thức bổ sung cao chiết vỏ quế tại các thời điểm cảm nhiễm khác nhau

**Hình 3.4** Tỷ lệ các loại bạch cầu của các nghiệm thức bổ sung cao chiết vỏ quế tại các thời điểm cảm nhiễm khác nhau (A: bạch cầu đơn nhân, B: bạch cầu lympho; C: bạch cầu trung tính)

*Ghi chú (chung cho Hình 3.3 và 3.4): Trong cùng thời điểm, các nghiệm thức có các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. NT 1.2: cá cảm nhiễm với vi khuẩn và không bổ sung cao chiết vào thức ăn; NT 2.4: bổ sung 10 g/kg cao chiết vỏ quế trước khi cảm nhiễm; NT 2.5: bổ sung 20 g/kg cao chiết vỏ quế trước khi cảm nhiễm; NT 2.6: bổ sung 40 g/kg cao chiết vỏ quế trước khi cảm nhiễm; NT 3.4-3.6: bổ sung cao chiết vỏ quế với hàm lượng tương ứng nghiệm thức 2.4-2.6, trước và sau khi cảm nhiễm.*

### 3.3.1.2 Hoạt tính thực bào

Ở thời điểm trước khi cảm nhiễm, chỉ số thực bào của cá ở các nghiệm thức bổ sung thảo dược vào thức ăn cho thấy sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P > 0,05$ ) so với cá ở nghiệm thức cho ăn thức ăn không bổ sung cao chiết thảo dược (NT 1.2). Ở thời điểm 5 ngày sau cảm nhiễm vi khuẩn, chỉ số thực bào ở các nghiệm thức đa số tăng nhẹ so với thời điểm trước khi cảm nhiễm. Đến thời điểm 10 ngày sau cảm nhiễm vi khuẩn, chỉ số thực bào tiếp tục tăng ở các nghiệm thức, tuy nhiên các nghiệm thức tiếp tục bổ sung cao chiết gừng ở các hàm lượng khác nhau đều có chỉ số thực bào thấp và có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ) so với nghiệm thức 1.2. Bên cạnh đó, ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ) về chỉ số thực bào giữa nghiệm thức tiếp tục bổ sung cao chiết vỏ quế hàm lượng 20 g/kg thức ăn (nghiệm thức có RPS cao nhất) so với nghiệm thức 1.2 (Hình 3.5).



**Hình 3.5** Chỉ số hoạt tính thực bào của các nghiệm thức bổ sung cao chiết gừng (A) và cao chiết vỏ quế (B) tại các thời điểm cảm nhiễm khác nhau

*Ghi chú:* Trong cùng thời điểm, các nghiệm thức có các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. NT 1.2: cá cảm nhiễm với vi khuẩn và không bổ sung cao chiết vào thức ăn; NT 2.1: bổ sung 10 g/kg cao chiết gừng trước khi cảm nhiễm; NT 2.2: bổ sung 20 g/kg cao chiết gừng trước khi cảm nhiễm; NT 2.3: bổ sung 40 g/kg cao chiết gừng trước khi cảm nhiễm; NT 2.4: bổ sung 10 g/kg cao chiết vỏ quế trước khi cảm nhiễm; NT 2.5: bổ sung 20 g/kg cao chiết vỏ quế trước khi cảm nhiễm; NT 2.6: bổ sung 40 g/kg cao

chiết vỏ quế trước khi cảm nhiễm; NT 3.1-3.6: bổ sung cao chiết gừng/quế với hàm lượng tương ứng nghiệm thức 2.1-2.6, trước và sau khi cảm nhiễm.

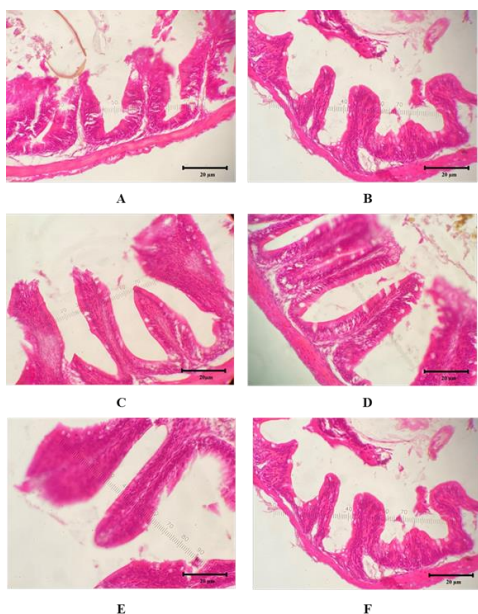
Nghiên cứu này đã chỉ ra được rằng, ở kích thước cá thí nghiệm (4 gram/con), với thời gian bổ sung 28 ngày và tiếp tục bổ sung sau 10 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn, cao chiết vỏ quế (hàm lượng bổ sung 10, 20 và 40 g/kg thức ăn) đã giúp nâng cao chỉ số huyết học (hồng cầu), giúp làm tăng bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính; đồng thời ở hàm lượng bổ sung 20 g/kg thức ăn giúp gia tăng hoạt tính thực bào. Còn đối với cao chiết gừng trên cùng kích thước cá và thời gian bổ sung cho thấy giúp cải thiện chỉ số bạch cầu (tăng số lượng bạch cầu tổng, bạch cầu đơn nhân và bạch cầu trung tính). Nhìn chung, kết quả cho thấy cao chiết vỏ quế cho kết quả hỗ trợ nâng cao miễn dịch tốt hơn cao chiết gừng khi thí nghiệm trên cá rô phi giống.

### 3.3.2 Xác định ảnh hưởng của cao chiết lên hình thái mô ruột cá

Ở nghiên cứu này, các chỉ số hình thái biểu mô ruột (diện tích nhung mao và độ dày lớp cơ niêm mạc) được quan sát tại ruột trước, giữa và sau của cá biến động lớn giữa các nghiệm thức cho ăn bằng cao chiết gừng và cao chiết vỏ quế ở các hàm lượng khác nhau. Tuy nhiên, nghiên cứu chưa ghi nhận được sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê của các chỉ số này trên cả ba đoạn ruột ở cả hai thời điểm sau cảm nhiễm (5 và 10 ngày) với vi khuẩn *S. agalactiae* giữa đa số các nghiệm thức có bổ sung hai loại cao chiết so với nghiệm thức không bổ sung cao chiết (NT 1.2). Như vậy, việc bổ sung cao chiết vỏ quế và cao chiết gừng vào thức ăn với các hàm lượng trong nghiên cứu này chưa ghi nhận sự ảnh hưởng bất lợi đến hình thái mô học ruột của cá (Hình 3.6), tương tự quan sát của Agbebi và ctv (2013) khi cho cá trê phi (*Clarias gariepinus*) ăn thức ăn bổ sung tỏi và kết luận của Lewis và ctv (2019) rằng hầu hết các sản phẩm thảo dược được bổ sung vào chế độ ăn của cá không gây ra bất kỳ sự thay đổi bất lợi nào đến hình thái ruột của cá được quan sát.

Đối với cao chiết gừng, kết quả phân tích ở cả ba thời điểm cảm nhiễm với vi khuẩn cho thấy, diện tích nhung mao và độ dày lớp cơ niêm mạc của cả ba đoạn ruột hầu như không ghi nhận sự khác biệt về mặt thống kê ( $P > 0,05$ ) khi so sánh giữa nghiệm thức cá ăn thức ăn không bổ sung và có bổ sung cao chiết gừng (Hình 3.7 và 3.8). Đối với cao chiết vỏ quế, kết quả phân tích ở thời điểm trước cảm nhiễm với vi khuẩn cho thấy, ở đoạn ruột trước, diện tích nhung mao của cá ở nghiệm thức bổ sung cao chiết vỏ quế với hàm lượng 20 g/kg thức ăn là cao nhất, tuy nhiên không ghi nhận sự khác biệt về mặt thống kê ( $P > 0,05$ ) khi so sánh với nghiệm thức không bổ sung cao chiết; trong khi đó, ở đoạn ruột sau, diện tích nhung mao của cá ở nghiệm thức bổ sung cao chiết vỏ quế với hàm lượng 40 g/kg thức ăn là cao nhất và sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ) khi so sánh với nghiệm thức không bổ sung cao chiết. Ở thời điểm sau 5 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn, diện tích nhung mao và độ dày niêm mạc ghi nhận được ở cả ba đoạn ruột đều giảm ở tất cả các nghiệm thức và hầu như không ghi nhận sự khác biệt về mặt thống kê ( $P > 0,05$ ) giữa các nghiệm thức. Ở thời điểm sau 10 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn, diện tích nhung mao ở đoạn ruột trước và đoạn ruột giữa của cá thuộc các nghiệm thức không cho ăn cao chiết vỏ quế tiếp tục giảm so với thời điểm sau 5 ngày, trong khi đó chỉ số này ở nghiệm thức cá ăn thức ăn không bổ sung cao chiết nhưng có cảm nhiễm với vi khuẩn (NT 1.2) và các nghiệm thức tiếp tục cho ăn cao chiết vỏ quế tăng; và hầu như không ghi nhận sự khác biệt về mặt thống kê ( $P > 0,05$ ) giữa các nghiệm thức. Đối với chỉ số độ dày niêm mạc, chỉ ghi nhận sự khác

biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ) giữa nghiệm thức tiếp tục bổ sung cao chiết vỏ quế hàm lượng 10 g/kg thức ăn với nghiệm thức 1.2 (Hình 3.10). Nghiên cứu đã chứng minh rằng việc bổ sung cao chiết vỏ quế với các hàm lượng 40 g/kg thức ăn trong thời gian 28 ngày nuôi đã giúp gia tăng khả năng hấp thu chất dinh dưỡng của tế bào ruột sau cá.



Ghi chú:

A: Ruột trước của NT không bổ sung và không cảm nhiễm sau 5 ngày cảm nhiễm;

B: Ruột trước của NT bổ sung cao chiết vỏ quế 20 g/kg sau 5 ngày cảm nhiễm;

C: Ruột trước của NT bổ sung cao chiết gừng 20 g/kg sau 5 ngày cảm nhiễm;

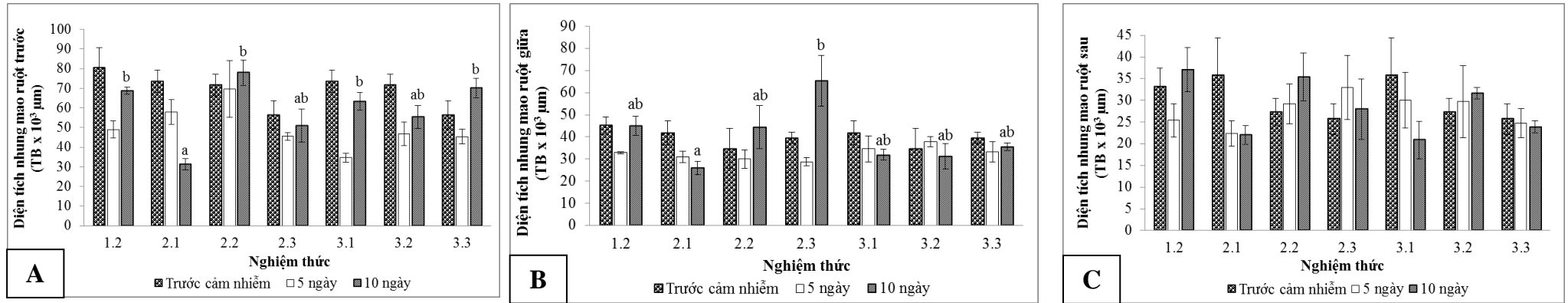
D: Ruột trước của NT bổ sung cao chiết vỏ quế 20 g/kg sau 10 ngày cảm nhiễm;

E: Ruột giữa của NT bổ sung cao chiết vỏ quế 20 g/kg sau 10 ngày cảm nhiễm;

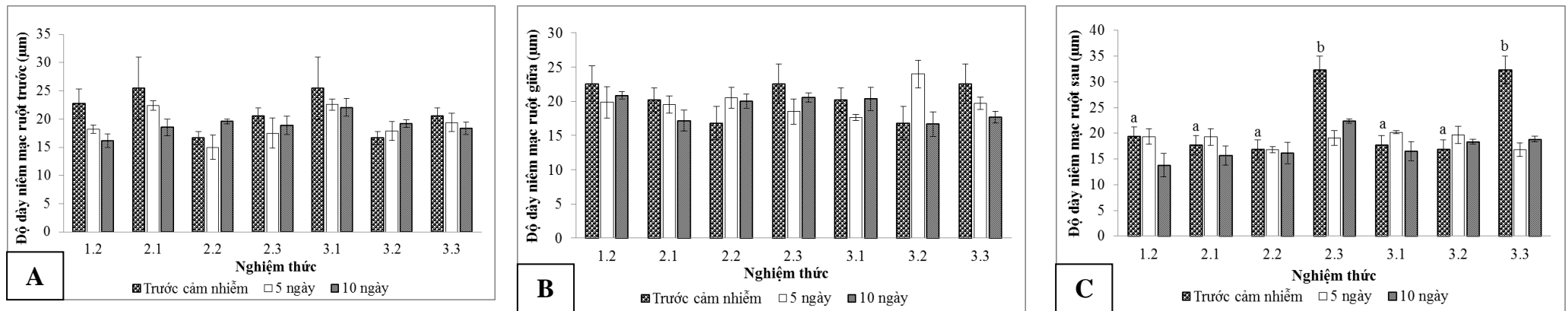
F: Ruột sau của NT bổ sung cao chiết vỏ quế 20 g/kg sau 10 ngày cảm nhiễm.

**Hình 3.6** Hình ảnh mô học ruột cá trong nghiên cứu

Hình thái mô học của ruột phản ánh sức khỏe của cá do liên quan đến khả năng hấp thu chất dinh dưỡng và chức năng miễn dịch. Nghiên cứu này cho thấy, diện tích nhung mao của nghiệm thức cá ăn thức ăn không bổ sung cao chiết nhưng có cảm nhiễm với vi khuẩn (NT 1.2) cũng tăng tương tự ở các nghiệm thức tiếp tục cho ăn cao chiết vỏ quế. Công bố của Ayotunde và ctv (2011) đã chỉ ra rằng, có những tổn thương bệnh lý và thay đổi mô học ghi nhận được ở mang, gan, da và thận của cá rô phi vằn (giai đoạn và trưởng thành) khi cho tiếp xúc với chiết xuất nước của hạt chùm ngây (*Moringa oleifera*) với các nồng độ dưới mức gây chết và có sự thiệt hại của các cơ quan khác nhau khi cá tiếp xúc với thời gian dài và nồng độ cao. Ngoài ra, An và ctv (2019) cũng đã chỉ ra rằng, sự tương tác giữa hệ vi sinh vật đường ruột và các loại thuốc thảo dược có thể được quy cho các phân tử nhỏ hoạt động có thể hấp thụ và thay đổi hệ vi sinh vật đường ruột và các chất bài tiết của nó. Tuy nhiên, do việc kiểm tra hàm lượng cao chiết trong môi trường nước sau khi cảm nhiễm chưa được thực hiện, do đó tác giả chưa nhận định được chính xác về việc có hay không sự ảnh hưởng từ cao chiết trong môi trường nước lên hình thái mô học ruột cá. Bên cạnh đó, nghiên cứu này ghi nhận diện tích nhung mao và độ dày niêm mạc ở một số nghiệm thức bổ sung thảo dược thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê theo từng thời điểm thu mẫu (ngày 0, 5 và 10 ngày sau cảm nhiễm). Theo Adeniyi và ctv (2022), việc giảm tỷ lệ chiều cao nhung mao cho thấy khả năng hấp thu chất dinh dưỡng bị suy giảm, sự hiện diện của độc tố và hiệu suất giảm. Các tế bào cốc tổng hợp chất nhầy, tạo thành một lớp bảo vệ trong màng biểu mô ruột chống lại vi khuẩn và chất độc. Các tế bào cốc ở ruột cao hơn giúp cá có khả năng bảo vệ chống lại các mối đe dọa từ mầm bệnh. Nghiên cứu này chưa tiến hành đo chiều cao tế bào cốc ở ruột của cá, do đó tác giả chưa đưa ra được lý giải chính xác cho việc thay đổi hình thái ruột trong thời gian ngắn xảy ra ở một số nghiệm thức bổ sung thảo dược.

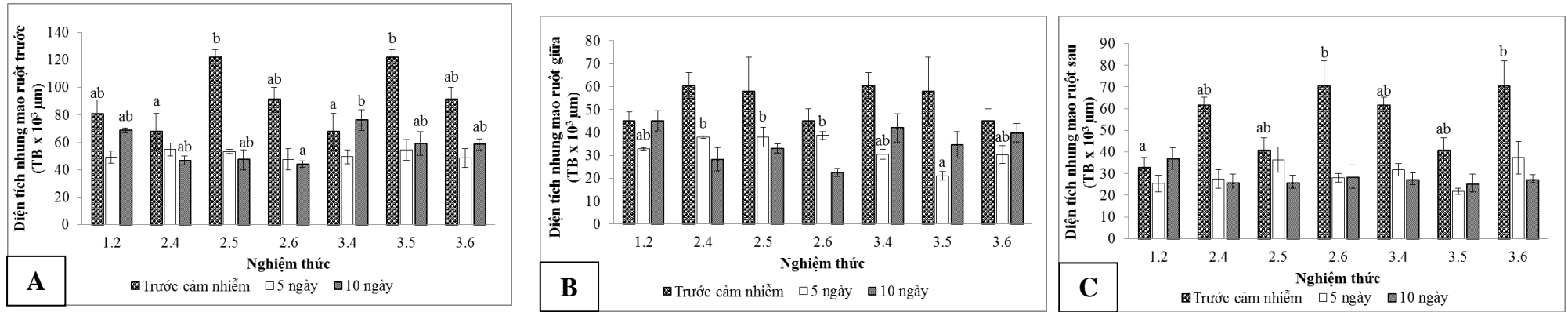


**Hình 3.7** Diện tích nhung mao ruột cá của các nghiệm thức bổ sung cao chiết gừng tại các thời điểm cảm nhiễm khác nhau (A: ruột trước; B: ruột giữa; C: ruột sau)

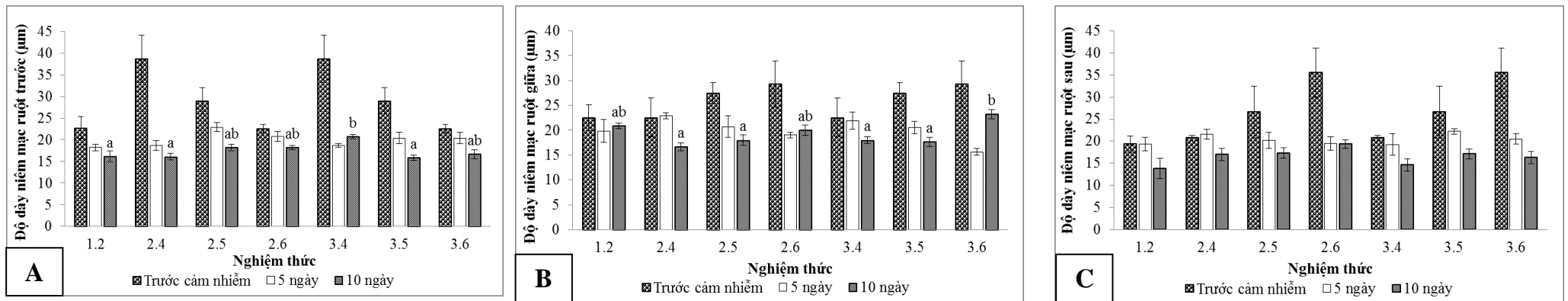


**Hình 3.8** Độ dày lớp đệm niêm mạc ruột cá của các nghiệm thức bổ sung cao chiết gừng tại các thời điểm cảm nhiễm khác nhau (A: ruột trước; B: ruột giữa; C: ruột sau)

*Ghi chú: Trong cùng thời điểm, các nghiệm thức có các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. NT 1.2: cá cảm nhiễm với vi khuẩn và không bổ sung cao chiết vào thức ăn; NT 2.1: bổ sung 10 g/kg cao chiết gừng trước khi cảm nhiễm; NT 2.2: bổ sung 20 g/kg cao chiết gừng trước khi cảm nhiễm; NT 2.3: bổ sung 40 g/kg cao chiết gừng trước khi cảm nhiễm; NT 3.1-3.3: bổ sung cao chiết gừng với hàm lượng tương ứng nghiệm thức 2.1-2.3, trước và sau khi cảm nhiễm.*



**Hình 3.9** Diện tích nhung mao ruột cá của các nghiệm thức bổ sung cao chiết vỏ quế tại các thời điểm cảm nhiễm khác nhau (A: ruột trước; B: ruột giữa; C: ruột sau)



**Hình 3.10** Độ dày lớp đệm niêm mạc ruột cá của các nghiệm thức bổ sung cao chiết vỏ quế tại các thời điểm cảm nhiễm khác nhau (A: ruột trước; B: ruột giữa; C: ruột sau)

*Ghi chú: Trong cùng thời điểm, các nghiệm thức có các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. NT 1.2: cá cảm nhiễm với vi khuẩn và không bổ sung cao chiết vào thức ăn; NT 2.4: bổ sung 10 g/kg cao chiết vỏ quế trước khi cảm nhiễm; NT 2.5: bổ sung 20 g/kg cao chiết vỏ quế trước khi cảm nhiễm; NT 2.6: bổ sung 40 g/kg cao chiết vỏ quế trước khi cảm nhiễm; NT 3.4-3.6: bổ sung cao chiết vỏ quế với hàm lượng tương ứng nghiệm thức 2.4-2.6, trước và sau khi cảm nhiễm.*

### 3.4 Nội dung 4: Xác định hàm lượng và khả năng kháng khuẩn của hoạt chất chính

#### 3.4.1 Xác định hàm lượng hoạt chất chính

Kết quả xác định hàm lượng 6-gingerol và cinnamic aldehyde được trình bày trong Bảng 3.6 và Bảng 3.7.

**Bảng 3.6** Kết quả phân tích hàm lượng 6-gingerol

TT	Nguyên liệu	Hàm lượng 6-gingerol trung bình (%)
1	Củ gừng	0,52
2	Cao lỏng gừng tỷ lệ 1:20 (1 ml)	0,48
3	Cao đặc gừng	12,41
4	Chê phẩm thức ăn (1 ml)	0,0048

**Bảng 3.7** Kết quả phân tích hàm lượng cinnamic aldehyde

TT	Nguyên liệu	Hàm lượng cinnamic aldehyde trung bình (%)
1	Vỏ thân quế	1,56
2	Cao lỏng vỏ quế tỷ lệ 1:30 (1 ml)	1,46
3	Cao đặc vỏ quế	12,56
4	Chê phẩm thức ăn (1 ml)	0,0086

#### 3.4.2 Khả năng kháng *S. agalactiae* của cao chiết theo hoạt chất chính

Nhằm chuẩn hóa hàm lượng cao chiết phù hợp phối trộn vào thức ăn cho cá rô phi ở các thí nghiệm trong tương lai, khảo sát khả năng kháng *S. agalactiae* theo hàm lượng hoạt chất chính đã được thực hiện. Kết quả cho thấy, hoạt chất cinnamic aldehyde trong vỏ quế và hoạt chất 6-gingerol trong củ gừng đều có khả năng kháng đối với vi khuẩn khảo sát, và khả năng kháng khuẩn ở hàm lượng hoạt chất 200 µg khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ) so với hai hàm lượng còn lại. Tuy nhiên, chỉ có hàm lượng 200 µg hoạt chất cinnamic aldehyde cho kết quả kháng khuẩn gần tương đương kháng sinh Doxycycline 30 µg (Bảng 3.8).

**Bảng 3.8** Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) tạo thành xung quanh các đĩa giấy tẩm cao chiết thảo dược theo hàm lượng hợp chất chính sau 24 giờ tiếp xúc với vi khuẩn SA-2.1-CC

TT	Nghiệm thức	Tỷ lệ hợp chất chính trong cao chiết thô (%)	Hàm lượng cao chiết thô (µg)	Hàm lượng hợp chất chính (µg)	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
1	Gừng (6-gingerol)	12,41	402,9	50	8,02 ± 0,29 <sup>a</sup>
			805,8	100	8,58 ± 0,44 <sup>a</sup>
			1.611,6	200	10,22 ± 1,06 <sup>b</sup>
					20,12 ± 0,45
2	Quế (cinnamic aldehyde)	12,56	398,1	50	9,28 ± 0,69 <sup>a</sup>
			796,2	100	10,13 ± 0,77 <sup>a</sup>
			1.592,4	200	19,48 ± 1,45 <sup>b</sup>
					20,25 ± 0,48

*Ghi chú:* Số liệu thể hiện giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn; trên cùng một cột và đối với mỗi loại cao chiết, các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ).

Cao chiết vỏ quế tiếp tục được xác định giá trị MIC và MBC tính theo hàm lượng hoạt chất chính đối với vi khuẩn *S. agalactiae* CC-2.1 ( $10^4$  CFU/ml). Kết quả cho thấy, giá trị MIC của cao chiết vỏ quế là 62,5 µg/ml và giá trị MBC là 250 µg/ml (tỷ lệ MBC/MIC = 4).



Như vậy, cao chiết vỏ quế tính trên hàm lượng chất chính trong dung môi ethanol có khả năng diệt khuẩn.

Kết hợp kết quả thí nghiệm *in vitro* trên cao chiết dạng thô và kết quả các thí nghiệm *in vivo*, kết quả của nghiên cứu có thể làm mô hình tham khảo cho các nghiên cứu tiếp theo, cũng như có khả năng phát triển các mô hình thử nghiệm thuốc thay cho chuột. Nghiên cứu này chưa đánh giá ảnh hưởng riêng từng hoạt chất nên có thể đề xuất các mô hình thí nghiệm trong tương lai bao gồm: (1) Sử dụng cao chiết vỏ quế với hàm lượng bổ sung khoảng 20-23 g/kg thức ăn (tương đương hàm lượng cinnamic aldehyde 100 µg/g thức ăn) trong quá trình nuôi cá giai đoạn giống để hỗ trợ nâng cao sức khỏe của cá, giúp làm tăng sức đề kháng của cá trước tác nhân gây bệnh là vi khuẩn *S. agalactiae* (hiệu quả phòng bệnh); (2) Sử dụng cao chiết vỏ quế với hàm lượng bổ sung khoảng 46-47 g/kg thức ăn (tương đương hàm lượng cinnamic aldehyde 200 µg/g thức ăn) thay thế kháng sinh khi cá bị nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae*, và sử dụng trong thời gian ngắn (hiệu quả trị bệnh); (3) Xác định thời gian phù hợp để sử dụng cao chiết vỏ quế (hàm lượng trong khoảng 46-47 g/kg thức ăn) như một liệu pháp thay thế hoàn toàn cho kháng sinh khi cá bị nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae*; (4) Sử dụng cao chiết vỏ quế với hàm lượng bổ sung khoảng 46-47 g/kg thức ăn (tương đương hàm lượng cinnamic aldehyde 200 µg/g thức ăn), khảo sát khả năng bảo hộ RPS và các tác động dược lý của cao chiết trên cá rô phi giống và cá thương phẩm ở điều kiện ao nuôi bình thường và ao nuôi khi bị tác động bởi các điều kiện thời tiết, khí hậu bất lợi; (5) Sử dụng cao chiết vỏ quế trong nuôi cá rô phi thương phẩm và thực hiện tính toán giá thành, chi phí sản xuất. Từ đó mở rộng, áp dụng trong quy mô sản xuất thực tế để đánh giá tính khả thi của việc sử dụng cao chiết vỏ quế để kiểm soát vi khuẩn *S. agalactiae*, thời gian sử dụng cao chiết trong phòng trị bệnh và kết luận về hiệu quả kinh tế khi ứng dụng trong điều kiện sản xuất.

Hạn chế: Nghiên cứu này chưa thực hiện kiểm tra hàm lượng của vi khuẩn và hàm lượng cao chiết trong môi trường nước sau khi cảm nhiễm, do đó chưa đưa ra được nhận định về sự hiện diện cũng như tác động của vi khuẩn và cao chiết trong môi trường nước đến cá thí nghiệm. Trong tương lai, nghiên cứu bổ sung cần được tiến hành để có đầy đủ cơ sở xác định chính xác tác động của cao chiết gừng và cao chiết vỏ quế đối với cá và môi trường nước.

Như vậy, các kết quả trong nghiên cứu này đã giúp khẳng định tiềm năng ứng dụng của cao chiết vỏ quế và cao chiết gừng trong việc nâng cao khả năng kháng bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi giống. Đồng thời, các kết quả của nghiên cứu gợi mở các vấn đề cần nghiên cứu trong tương lai, như nghiên cứu hiệu quả của hỗn hợp hai loại cao chiết (vỏ quế, gừng) nhằm phát huy tối đa ưu thế của mỗi loại trong từng thời điểm bổ sung vào thức ăn; khảo sát khả năng kháng khuẩn của hoạt chất cinamic aldehyde tinh khiết đối với vi khuẩn *S. agalactiae*; đánh giá ảnh hưởng của cao chiết vỏ quế khi bổ sung vào thức ăn lên khả năng hấp thu dưỡng chất của cá thí nghiệm sau thời gian cảm nhiễm dài hơn.

## **CHƯƠNG 4** **KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ**

#### 4.1 Kết luận

Cao chiết vỏ quế và cao chiết gừng được chiết xuất trong dung môi ethanol 96% và methanol 99,8% có khả năng diệt vi khuẩn *S. agalactiae* (MBC/MIC = 2).

Cao chiết vỏ quế và cao chiết gừng được bổ sung với các hàm lượng 10, 20 và 40 g/kg vào thức ăn trong 8 tuần chưa ghi nhận ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của cá rô phi giống.

Cao chiết vỏ quế và cao chiết gừng (10, 20 và 40 g/kg thức ăn) được bổ sung vào thức ăn cho cá rô phi giống trong 28 ngày và tiếp tục trong 10 ngày sau khi cá được cảm nhiễm với *S. agalactiae* giúp tăng cường khả năng kháng bệnh của cá và giúp nâng cao chỉ số huyết học và một số chỉ tiêu miễn dịch không đặc hiệu (mật độ hồng cầu, mật độ bạch cầu tổng, số lượng bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính và hoạt tính thực bào), và chưa ghi nhận sự ảnh hưởng đến hình thái biểu mô ruột của cá.

Cao chiết vỏ quế được bổ sung với hàm lượng 20 g/kg thức ăn có hiệu quả bảo vệ cao nhất (RPS đạt 51,4%) đối với cá rô phi giống gây nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*.

Cao chiết vỏ quế được bổ sung vào thức ăn với hàm lượng 40 g/kg thức ăn trong thời gian 28 ngày nuôi giúp gia tăng khả năng hấp thu chất dinh dưỡng của tế bào ruột sau của cá.

Hoạt chất cinnamic aldehyde (trong cao chiết vỏ quế) với hàm lượng 100 µg/g thức ăn và 200 µg/g thức ăn có khả năng kháng vi khuẩn *S. agalactiae*, trong đó hàm lượng 200 µg/g thức ăn có khả năng kháng khuẩn gần tương đương kháng sinh Doxycycline 30 µg.

Nghiên cứu xác nhận sự hiện diện của vi khuẩn *S. agalactiae* mang các yếu tố độc lực quan trọng, thuộc CC283, kiểu trình tự ST 283 tại khu vực huyện Củ Chi, Thành phố Hồ Chí Minh (chủng SA-2.1-CC).

#### 4.2 Đề nghị

Thực hiện nghiên cứu phối hợp hai loại cao chiết (vỏ quế, gừng) để nâng cao khả năng kháng bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá rô phi; đồng thời khảo sát khả năng kháng *S. agalactiae* của hoạt chất cinnamic aldehyde tinh khiết.

Thực hiện các nghiên cứu đánh giá khả năng hấp thu dưỡng chất của cá thí nghiệm sau thời gian cảm nhiễm dài hơn và ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau của cá.

Thực hiện phân tích hệ vi khuẩn đường ruột của cá sau thời gian cho ăn thức ăn bổ sung cao chiết vỏ quế và cao chiết gừng.

Thực hiện nghiên cứu xác định chính xác tác động của cao chiết gừng và cao chiết vỏ quế đối với cá và môi trường nước.

Thực hiện các mô hình sử dụng cao chiết vỏ quế, khảo sát khả năng bảo hộ RPS và các tác động dược lý của cao chiết trên cá rô phi giống và cá thương phẩm ở điều kiện ao nuôi bình thường và ao nuôi khi bị tác động bởi các điều kiện thời tiết, khí hậu bất lợi.

Thực hiện các mô hình sử dụng cao chiết vỏ quế trong nuôi cá rô phi thương phẩm để đánh giá tính khả thi, thời gian sử dụng cao chiết trong phòng trị bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* và kết luận về hiệu quả kinh tế khi ứng dụng trong điều kiện sản xuất.

## DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. **Nguyễn Thị Trúc Quyên**, Lê Linh Chi, Đoàn Văn Cường, Nguyễn Diễm Thu, Mã Tú Lan, Trần Hoàng Bích Ngọc, Nguyễn Thành Nhân, **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 của Trường Đại học Nha Trang, 3, 124-132.
2. **Nguyễn Thị Trúc Quyên**, Đoàn Văn Cường, Mã Tú Lan, Nguyễn Thành Nhân, **Từ Thanh Dung**, **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*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ bản B, 65(7), 53-59.
3. **Nguyễn Thị Trúc Quyên**, Đoàn Văn Cường, Mã Tú Lan, **Từ Thanh Dung**, **Nguyễn Thị Ngọc Tĩnh**, 2023. Ảnh hưởng của cao chiết vỏ quế (*Cinnamomum verum*) lên một số chỉ tiêu miễn dịch và hình thái ruột cá rô phi (*Oreochromis spp.*) cảm nhiễm với vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam, 6(148), 105-113.
4. **Nguyễn Thị Trúc Quyên**, Trần Hoàng Bích Ngọc, Nguyễn Ngô Bích Hiếu, Trần Anh Khoa, **Nguyễn Thị Ngọc Tĩnh**, 2018. Khả năng đối kháng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* phân lập trên cá rô phi đỏ (*Oreochromis sp.*) bởi một số dịch chiết có nguồn gốc thảo dược. *Tóm tắt và Poster*. Hội nghị khoa học trẻ toàn quốc ngành thủy sản lần thứ 9, Cần Thơ, Việt Nam.
5. **Nguyen Thi Ngoc Tinh**, **Nguyen Thi Truc Quyen**, Doan Van Cuong, Nguyen Diem Thu, Ma Tu Lan, Tran Hoang Bich Ngoc, and Nguyen Thanh Nhan, 2019. Growth-inhibiting Effect towards *Streptococcus agalactiae* Isolated from Red Tilapia (*Oreochromis sp.*) by Herbal Extracts. Abstract. International Fisheries Symposium 2019, Kuala Lumpur, Malaysia, 160.