

SỬ DỤNG CHẾ PHẨM BEKIMI ĐỂ PHÒNG BỆNH DO VI KHUẨN AEROMONAS SP. GÂY RA TRÊN CÁ DĨA (SYMPHYSODON SP.)

NGUYỄN THOẠI ÂN*, ĐOÀN THỊ QUỲNH HƯƠNG**,
NGUYỄN THỊ HIỆU TRANG*, PHAN TRỌNG NGHĨA*, DƯƠNG NGỌC KIỀU THỊ*

TÓM TẮT

Vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* CD1 là nguyên nhân gây bệnh xuất huyết trên cá dĩa được phân lập. Để phòng bệnh do vi khuẩn này gây ra, chế phẩm Bekimi có nguồn gốc từ thảo dược với thành phần chính là lá trầu (*Piper betle*) được sử dụng. Kết quả cho thấy chế phẩm có khả năng kháng khuẩn mạnh đối với *Aeromonas hydrophila* CD1 với đường kính vòng tròn kháng khuẩn là $20,73 \pm 0,87$ mm. Nồng độ Bekimi được pha loãng với tỉ lệ 1:10 có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn. Cá dĩa được cho ăn thức ăn có trộn chế phẩm với nồng độ 100ml/1kg trước khi gây cảm nhiễm 7 ngày sẽ có khả năng phòng được bệnh, cá không có dấu hiệu bị xuất huyết với tỉ lệ sống 77,78%.

Từ khóa: *Aeromonas hydrophila* CD1, Bekimi, cá dĩa, phòng bệnh.

ABSTRACT

Using Bekimi to prevent disease caused by *Aeromonas* sp. in discus fish (*Symphysodon* sp.)

Aeromonas hydrophila CD1 which caused hemorrhagic septicaemia disease in discus fish (*Symphysodon* sp.) was isolated. To prevent disease caused by *A. hydrophila*, the effect of Bekimi was evaluated. Bekimi is a product extracted from the herbal plants especially the betel leaf (*Piper betle*). Bekimi showed significantly antibacterial activity against *A. hydrophila* with the zone of inhibition is 20.73 ± 0.87 mm. The concentration dilution of Bekimi was 1:10 could inhibit the growth of *Aeromonas hydrophila* CD1. After feeding fish with mixed food, with concentration 100ml/1kg, fish did not have signal of diseases, hemorrhage in liver was completely disappeared with the survival rate was 77.78%.

Keywords: *Aeromonas hydrophila* CD1, Bekimi, *Symphysodon* sp., disease prevention.

1. Mở đầu

Cá dĩa (*Symphysodon* sp.) là loài cá được ưa chuộng trong các loại cá cảnh bởi chúng có màu sắc sặc sỡ, đa dạng với các loại hoa văn khác nhau, dáng bơi uyển chuyển, nhẹ nhàng. Tuy nhiên cá dĩa nhạy cảm, dễ bị tác động bởi điều kiện môi trường bên ngoài và các tác nhân như nấm, kí sinh trùng, vi khuẩn và vi rút có khả

* Kỹ sư, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao, TPHCM;
Email: thoai_an90@yahoo.com

** Thạc sĩ, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao, TPHCM

năng lây nhiễm cao gây chết cá hàng loạt. Trong đó, vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* là một trong những tác nhân có thể gây chết cấp tính làm cho màu sắc cơ thể sậm lại, vây tùm, cá lơ đờ, bơi mất thăng bằng, bỏ ăn, chướng bụng, thận và lách sưng, mật sung chuyển màu đen, gan sung huyết và có mũ, tiết nhiều nhớt. Khi cá bị nhiễm khuẩn nặng, mắt và cơ thể cá bị ăn sâu tạo thành vết loét. [2]

Thông thường, khi cá bị bệnh, người nuôi trồng thường sử dụng kháng sinh để phòng và trị bệnh nhiễm khuẩn. Tuy nhiên trong những năm gần đây, việc dùng kháng sinh quá nhiều và không đúng theo quy định nên hiện tượng kháng kháng sinh của vi khuẩn đã gia tăng rất nhiều, đồng thời việc dùng kháng sinh còn ảnh hưởng tiêu cực đến môi trường do các chất kháng sinh khó bị phân hủy. Do đó, các chất kháng khuẩn từ thiên nhiên rất được quan tâm vì chúng có khả năng ức chế và tiêu diệt các mầm bệnh, thân thiện với môi trường. Dựa vào những đặc tính ưu việt của thảo dược và khả năng kháng khuẩn của trà [1], [5], Bekimi – một chế phẩm có nguồn gốc từ thảo dược với thành phần chính từ trà đã được nghiên cứu bởi Viện Phát triển Công nghệ và Đào tạo, được sản xuất thử nghiệm tại Công ty TNHH Sản xuất Mĩ phẩm Lan Hào. Hiện nay việc sử dụng Bekimi đã đem lại những hiệu quả đáng kể trong việc phòng và trị một số bệnh trên tôm. Tuy nhiên, việc ứng dụng sản phẩm này trong thủy sản còn hạn chế về mặt đối tượng áp dụng. Thấy được tác dụng của Bekimi và để mở rộng phạm vi ứng dụng của chế phẩm trong nuôi trồng thủy sản, chúng tôi đã thực hiện nghiên cứu này nhằm đánh giá hiệu quả của chế phẩm đối với loại cá cảnh, trước tiên là cá đĩa.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Cá đĩa được nuôi tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao TP Hồ Chí Minh, chế phẩm Bekimi được cung cấp bởi Công ty TNHH Sản xuất Mĩ phẩm Lan Hào.

Môi trường trypton soybean agar (TSA) (Liofilchem), Rimler-Shotts agar (RSA) (Himedia), Bile Salt Irgasan Brilliant Green Agar (BSGA) (Himedia), môi trường canh thang Luria Bertani (LB) (Liofilchem) và môi trường thạch Mueller-Hinton (MH) (Himedia). Các môi trường này được hấp khử trùng ở 121°C, 15 phút trước khi sử dụng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp phân lập vi khuẩn

Cá đĩa với dấu hiệu bệnh được thu nhận, giải phẫu cá, cơ quan nội tạng được cho vào dung dịch Phosphate buffered saline (PBS), nghiền nhỏ. Dung dịch đồng nhất được cấy trên môi trường TSA. Ủ ở 37°C trong 24- 48h. Vi khuẩn tiếp tục được làm thuần cho đến khi thu được khuẩn lạc đơn. Các dòng thuần sau khi được phân lập trên môi trường TSA được thử khả năng sinh catalase bằng H₂O₂ 3% (Sigma-Aldrich), sau đó cấy trên môi trường chọn RSA và BSGA và đem nhuộm Gram.

Phương pháp định danh vi khuẩn

Vi khuẩn sau khi sàng lọc được định danh bằng kỹ thuật giải trình tự vùng 16S rRNA. DNA của vi khuẩn được li trích bằng kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit của Promega, Mỹ. Phản ứng PCR khuếch đại vùng 16S – rRNA sử dụng cặp mồi 27F và 1488R (Invitrogen) có trình tự. [8]

27F (5'-CCA GAG TTT GAT CGT GGC TCA G -3')

1488R (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TTC ACC -3')

Phản ứng khuếch đại được thực hiện trong máy luân nhiệt (C-1000Biorad) với chu trình nhiệt như sau

Bước	Giai đoạn	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Số chu kỳ
1	Biến tính ban đầu	94°	2 phút	1
2	Biến tính	94°	1 phút	} 35
3	Bắt mồi	50°	1 phút	
4	Kéo dài	72°	1 phút	
5	Kéo dài cuối cùng	72°	10 phút	1
6	Giữ mẫu	4°	1 giờ	1

Các sản phẩm PCR được đem đi gửi giải trình tự ở Công ti First BASE Laboratories Sdn. Bhd., Singapore. Các trình tự đại diện của các mẫu được so sánh với các trình tự sẵn có trong NCBI GenBank bằng cách sử dụng BLAST alignment để nhận diện.

Phương pháp đánh giá khả năng kháng khuẩn của chế phẩm

Khả năng kháng khuẩn của chế phẩm Bekimi được dựa trên phương pháp kháng sinh đồ khuếch tán trên đĩa thạch Kirby-Bauer. Huyền phù vi khuẩn được chuẩn bị có độ đục tương đương với độ đục của ống chuẩn 0,5 Mc-Farland với nồng độ vi khuẩn $1-2 \times 10^8$ CFU/ml. Mẫu đối chứng dương: Kháng sinh Oxytetracyclin nồng độ 0,02g/l. Mẫu đối chứng âm: nước cất đã được hấp khử trùng. Dùng tăm bông vô trùng cấy khuẩn lên mặt thạch MH, chờ thạch khô trong vòng 3 đến 5 phút. Đục lỗ trên mặt thạch với đường kính 6mm/lỗ. Mỗi lỗ thạch, nhỏ 100µl chế phẩm Bekimi (nồng độ Bekimi không pha loãng). Đĩa được ủ ở 37°C, sau 24 giờ, đường kính vòng kháng khuẩn được đo. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Phương pháp xác định nồng độ pha loãng ức chế tối đa của chế phẩm

Nồng độ pha loãng ức chế tối đa của chế phẩm được thực hiện dựa vào phương pháp của Anja K. và cộng sự (2010). Chế phẩm được pha loãng với nước theo những nồng độ 1:1, 1:10, 1: 100, 1: 1000. Chuẩn bị dung dịch vi khuẩn với nồng độ 10^6-10^7 CFU/ml trong môi trường MH. Mẫu đối chứng dương: vi khuẩn trong môi trường MH

không bổ sung chế phẩm. Mẫu đối chứng âm: chế phẩm và dung dịch môi trường MH. Cho 50 µl của chế phẩm pha loãng với nồng độ khác nhau vào mỗi giếng của khay 96 giếng, thêm 50µl của huyền dịch vi khuẩn. Khay 96 giếng được đem lắc 900 vòng trong 1 phút và ủ ở 37°C trong 24 giờ. Để quan sát rõ hơn kết quả, sau khi ủ 24 giờ, chất chỉ thị màu 2,3,5-triphenyltetrazoliumchloride (TTC) được bổ sung vào các giếng, ủ khay giếng ở 37°C tránh ánh sáng sau đó quan sát hiện tượng màu. Vi khuẩn khử muối tetrazolium thành những dẫn xuất màu formazan có thể quan sát được. [4]

Thử nghiệm chế phẩm trên cá dĩa

Trước khi thử nghiệm chế phẩm, cho cá dĩa ăn thức ăn trộn với chế phẩm nhằm thực hiện thí nghiệm an toàn.

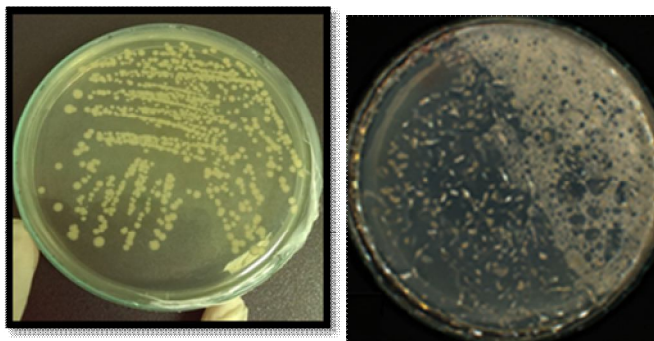
Thí nghiệm cảm nhiễm được thực hiện bằng cách tiêm vào bụng cá 0,1 ml vi khuẩn ở các nồng độ 10^9 cfu/ml, 10^8 cfu/ml, 10^7 cfu/ml. Cá đối chứng được tiêm bằng nước muối sinh lí. Mật độ vi khuẩn gây chết 50% cá thí nghiệm được xác định từ thí nghiệm sẽ được sử dụng để gây cảm nhiễm cá bố trí ở thí nghiệm phòng bệnh bằng chế phẩm.

Thí nghiệm phòng bệnh được bố trí với 5 nghiệm thức thí nghiệm, mỗi nghiệm thức gồm 30 con cá dĩa: NT đối chứng: cá không sử dụng chế phẩm; NT1: cá cho ăn thức ăn có trộn chế phẩm nồng độ 10ml/kg; NT2: cá cho ăn thức ăn có trộn chế phẩm nồng độ 30ml/kg; NT3: cá cho ăn thức ăn có trộn chế phẩm nồng độ 60ml/kg; NT4: cá cho ăn thức ăn có trộn chế phẩm nồng độ 100ml/kg. Cho cá ăn chế phẩm trước 7 ngày trước khi tiêm khuẩn và sau 10 ngày sau khi tiêm khuẩn thì kết thúc thí nghiệm. Số lượng cá chết được ghi nhận mỗi ngày. Cá bệnh được mổ khám và quan sát bệnh tích.

3. Kết quả và thảo luận

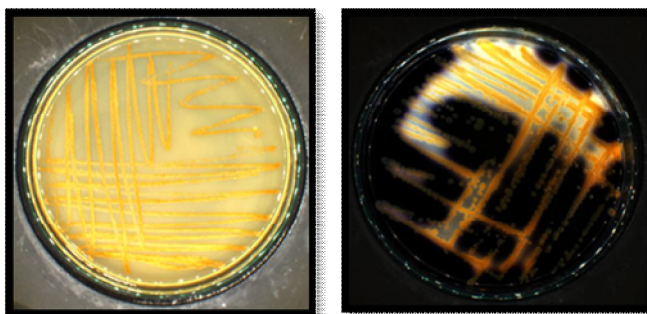
Phân lập vi khuẩn

Quan sát khuẩn lạc được phân lập trên môi trường TSA, khuẩn lạc thuộc nhóm *Aeromonas* sp. có dạng hình tròn, lồi, màu kem, kích thước từ 2-3mm và có khả năng sinh catalase (Hình 1).



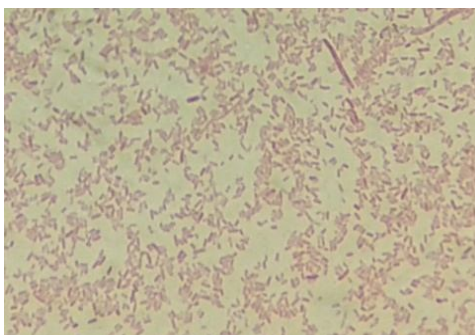
Hình 1. Hình dạng khuẩn lạc trên môi trường TSA và khả năng sinh catalase

Những dòng thuần có khuẩn lạc cho kết quả catalase dương tính được cấy sang môi trường chọn lọc RSA có màu cam. Đối với môi trường chọn lọc BSGA, sau khi nhỏ dung dịch KI lên các khuẩn lạc mọc trên môi trường BSGA thấy xuất hiện các vòng sáng (Hình 2).



Hình 2. Hình dạng khuẩn lạc trên môi trường RSA và môi trường BSGA

Quan sát nhuộm gram dưới kính hiển vi, các vi khuẩn có tế bào dạng hình que, màu hồng (Hình 3).

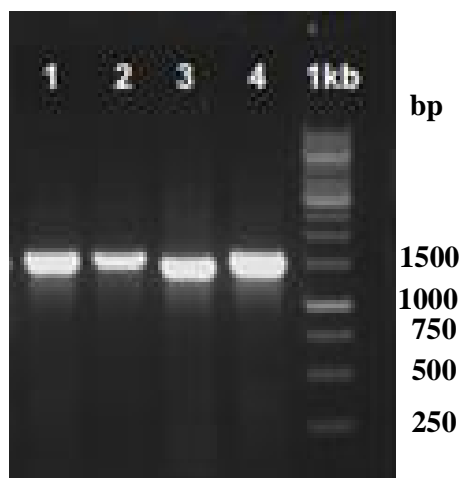


Hình 3. Hình dạng tế bào của vi khuẩn dưới kính hiển vi

Từ những đặc tính đó, bước đầu phân lập được 4 dòng vi khuẩn thuần có đặc điểm giống *Aeromonas* sp. được phân lập từ gan, mang và vây cá.

Kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự vùng 16S rRNA

Phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen mã hóa cho 16S rRNA của 4 chủng được phân lập dùng cặp mồi 27F- 1488R cho ra sản phẩm PCR có kích thước duy nhất khoảng 1500bp trong tất cả các mẫu được phân lập (Hình 4).



Hình 4. Gel điện di sản phẩm PCR khuếch đại vùng 16S của 4 dòng vi khuẩn phân lập được dùng primer 27F và 1488R. Ladder 1kb

Vùng trình tự 16S rRNA được giải trình tự và so sánh độ tương đồng di truyền với các loài trên ngân hàng gen NCBI bằng công cụ BLAST. Kết quả được trình bày trong Bảng 1

Bảng 1. Danh sách tên các dòng vi khuẩn phân lập được từ cá dĩa dựa trên kết quả giải trình tự vùng 16S rRNA dùng primer 27F và 1488R tra trên NCBI/BLAST

STT	Tên loài	Nguồn gốc mẫu tương đồng/ địa chỉ trên genbank	Độ tương đồng	Nguồn gốc mẫu phân lập
1	<i>A. hydrophila</i> strain TB2	Cá họ Chìa vôi (<i>Ephippus orbis</i>) Trung Quốc, KC252599	93%	Vùng miệng cá dĩa trắng
2	<i>Aeromonas</i> <i>sp. HR8</i>	Ruột của con ốc sên (<i>Helisoma</i> sp.) USA, KM363229	80%	Mang cá dĩa bò câu
3	<i>A. veronii</i> strain B7	Cá vàng (<i>Carassius auratus</i>) Ấn Độ, KF661548	98%	Gan cá dĩa bò câu
4	<i>Citrobacter</i> <i>freundii</i>	Ghẹ chấu bị bệnh (<i>Portunus trituberculatus</i> L.) Trung Quốc, HQ 170626	98%	Vây cá dĩa đỏ

Dựa vào kết quả phân tích trình tự vùng 16S rRNA xác định được 1 chủng *Aeromonas hydrophila* có khả năng gây bệnh trên cá. *A. hydrophila* là một trong 2 loài có khả năng gây bệnh trên cá nước ngọt và *A. hydrophila* là một trong những nguyên nhân chính gây bệnh xuất huyết ở cá [9]. Do đó, vi khuẩn được phân lập có đặc điểm hình thái giống *A. hydrophila* được kí hiệu là *Aeromonas hydrophila* CD1 và là nguồn vi khuẩn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

Đánh giá khả năng kháng khuẩn của chế phẩm

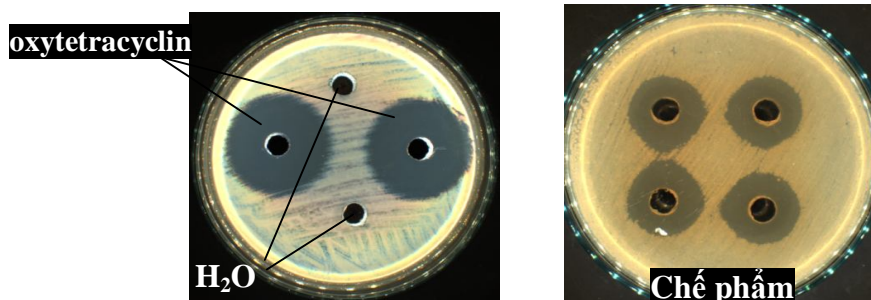
Sau 24h thực hiện ủ đĩa chứa chế phẩm và vi khuẩn *A. hydrophila* CDI, kết quả đường kính vòng tròn kháng khuẩn được trình bày trong Bảng 2 và Hình 6. Sau đó đĩa được ủ tiếp trong vòng một tuần, kết quả vẫn không thay đổi. Điều đó chứng tỏ rằng chế phẩm có khả năng tiêu diệt hoàn toàn vi khuẩn gây bệnh.

Dựa vào kết quả cho thấy Bekimi với nồng độ chưa pha loãng từ sản phẩm ban đầu kháng khuẩn mạnh với đường kính vòng tròn kháng khuẩn là $20,73 \pm 0,87$ mm. Kết quả này cao hơn nghiên cứu về khả năng kháng khuẩn của thảo dược với vi khuẩn *A. hydrophila* của Panuwat Suppakul và cộng sự với đường kính vòng tròn kháng khuẩn là $12,40 \pm 0,28$ mm. [7]

Bảng 2. Đường kính vòng tròn kháng khuẩn của Bekimi và oxytetracycline

	Đường kính vòng tròn kháng khuẩn (mm)
Đối chứng âm (nước)	0
Đối chứng dương (oxytetracycline)	$31,7 \pm 0,53^a$
Chế phẩm	$20,73 \pm 0,87^b$

Trong cùng một cột các giá trị trung bình có kí tự theo sau khác nhau có sự khác biệt về mặt thống kê

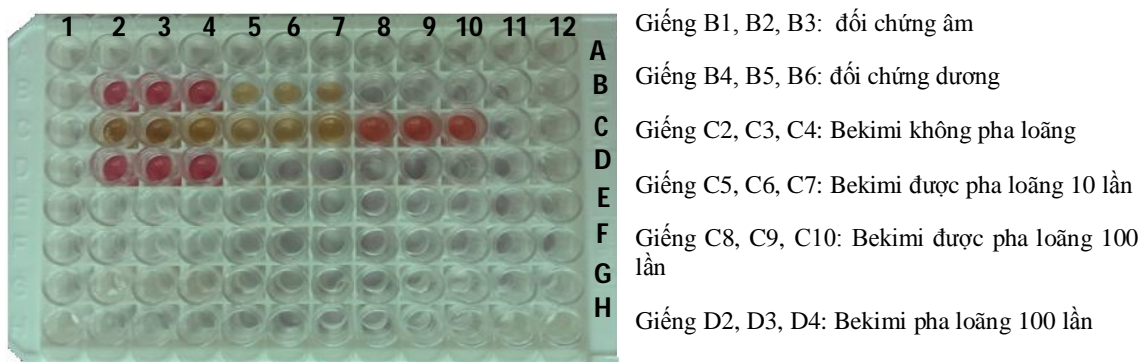
**Hình 5.** Đường kính vòng tròn kháng khuẩn

Bekimi có khả năng kháng khuẩn do trong thành phần chứa lá trà có các chất có khả năng kháng khuẩn như eugenol, chavibetol, chavibetol acetate và 4-allilpyrocatechol diacetate [3]. Các chất này tương tác với thành phần của màng tế bào của vi khuẩn làm tổn thương màng tế bào, gây rối loạn quá trình trao đổi chất trên màng tế bào, ức chế quá trình sinh tổng hợp protein và nucleic acid dẫn đến việc ngăn cản sự phát triển và tiêu diệt vi khuẩn. [6]

Xác định nồng độ pha loãng tối đa của chế phẩm ức chế vi khuẩn

Quan sát màu sắc trên các giếng cho kết quả như sau, giếng B2, B3, B4 chứa dịch khuẩn, không chứa Bekimi làm đối chứng dương, vi khuẩn có khả năng khử TTC thành chất formazan tạo màu đỏ. Ở giếng B5, B6, B7 chỉ chứa dung dịch Bekimi không chứa

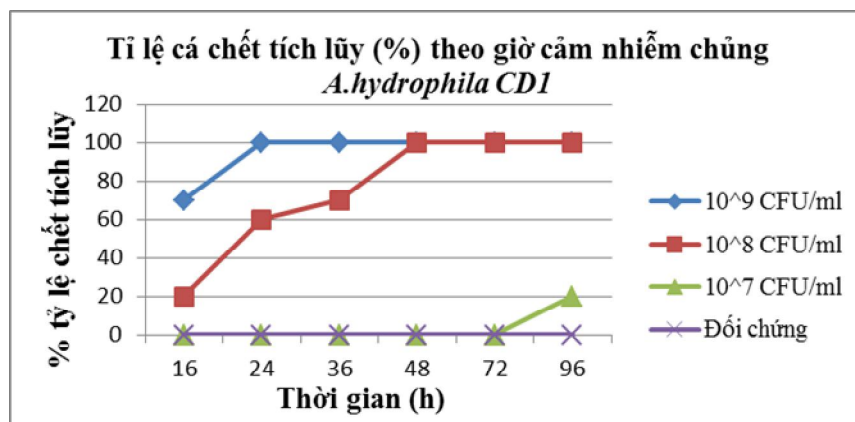
dịch khuẩn làm đối chứng âm B5, B6, B7 có màu vàng. Ở giếng C1, C2, C3 chứa bekimi không pha loãng và dịch khuẩn có màu vàng, chứng tỏ rằng Bekimi đã ức chế sự phát triển của vi khuẩn sau 24h nên không còn vi khuẩn để khử TTC tạo màu. Giếng C4, C5, C6 chứa Bekimi pha loãng 10 lần (1:10) và dịch khuẩn có màu vàng, chứng tỏ với nồng độ pha loãng 1:10, Bekimi vẫn có khả năng tiêu diệt sự phát triển của vi khuẩn. Ở hai nồng độ pha loãng Bekimi tiếp theo là 1:100 và 1:1000, giếng C7, C9, C10 và giếng G2, G3, G4 đều có màu đỏ, chứng tỏ ở hai nồng độ pha loãng này Bekimi không còn khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn. Như vậy, nồng độ pha loãng tối đa để chế phẩm là 1:10 có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *A. hydrophila* CD1 trong điều kiện in vitro (hình 6).



Hình 6. Xác định nồng độ ức chế bằng phương pháp pha loãng nồng độ

Kết quả thử nghiệm cảm nhiễm

Ở các nghiệm thức cảm nhiễm, cá bệnh có những dấu hiệu bệnh lí tương tự nhau và gần giống với dấu hiệu bệnh lí của cá bệnh ngoài tự nhiên. Sau khi tiêm cá đều có dấu hiệu bơi lờ đờ, mất thăng bằng, ăn ít, đồng thời cũng có các dấu hiệu điển hình như xuất huyết ở cơ quan nội tạng như gan, ruột, tì tạng bị thâm đen với tỉ lệ chết ở các nồng độ khác nhau (Hình 7).



Hình 7. Tỉ lệ chết của cá ở các nghiệm thức thí nghiệm gây cảm nhiễm

Ở thí nghiệm cảm nhiễm nồng độ cao nhất 10^9 CFU/ml cá bắt đầu chết sau 16h với tỉ lệ cao khoảng 70% và toàn bộ số cá trong bể chết sau 24h tiêm. Ở nồng độ 10^8 CFU/ml, theo dõi sau 16h cá chết với tỉ lệ thấp 20%, sau 24h thì cá chết trên 50% và chết từ từ, đến sau 48h thì cá chết hoàn toàn. Ở thí nghiệm cảm nhiễm nồng độ 10^7 CFU/ml, cá chỉ có dấu hiệu lơ đờ, ăn ít và yếu, không có chết hàng loạt, cá chết sau 96h với tỉ lệ thấp khoảng 20%. Ở lô cá đối chứng, cá khỏe mạnh bình thường, không có dấu hiệu bệnh. Với mỗi nồng độ khác nhau, cá biểu hiện bệnh với những triệu chứng khác nhau nhưng đều có dấu hiệu xuất huyết bên trong cơ thể (Hình 8).



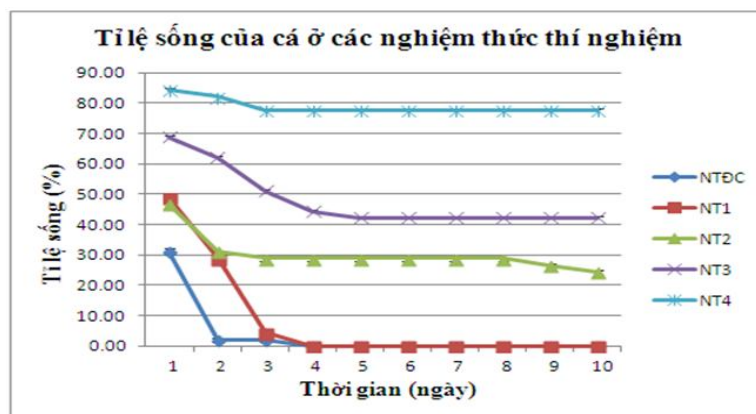
Hình 8. Biểu hiện của cá sau khi tiêm vi khuẩn (1) Xuất huyết vây; (2) Nội tạng bị xuất huyết; (3) Nội tạng bị thâm đen

Sau kết quả của thí nghiệm cảm nhiễm ngược, với liều lượng gây chết trên 50% số cá thí nghiệm, *A. hydrophila* CD1 được sử dụng ở nồng độ 10^8 cfu/ml để tiêm vào cá trong thí nghiệm thử hiệu quả của chế phẩm Bekimi.

Kết quả thử nghiệm chế phẩm

Để khẳng định chế phẩm an toàn cho cá đĩa, những con cá khỏe được chọn để cho ăn thức ăn có trộn chế phẩm, sau khi cho cá ăn ở nồng độ cao 100ml/kg, quan sát vẫn thấy cá ăn như bình thường, cá không bị ảnh hưởng của chế phẩm. Tuy nhiên, khi sử dụng chế phẩm bằng cách ngâm vào nước với 2 nồng độ 10ml/L và 30ml/L, cá chết sau khoảng 5 giờ đối với nồng độ cao hơn, còn nồng độ 10ml/L thì cá chết hàng loạt sau 12 giờ. Do đó việc sử dụng phương pháp ngâm chế phẩm để phòng bệnh không được thực hiện, chỉ thực hiện thí nghiệm trộn chế phẩm vào thức ăn để phòng bệnh cho cá.

Trong thí nghiệm sử dụng chế phẩm trộn vào thức ăn để phòng bệnh cho cá. Ban đầu cá được cho ăn thức ăn tim bò có trộn chế phẩm hai lần trong một ngày, quan sát thấy cá ăn bình thường. Sau 1 tuần, nồng độ vi khuẩn 10^8 cfu/ml được tiêm vào toàn bộ cá ở các nghiệm thức và cá tiếp tục được cho ăn thức ăn có trộn chế phẩm với 4 nồng độ khác nhau. Cá vẫn ăn nhưng lượng ăn ít hơn trước khi tiêm khuẩn. Sau 1 ngày cho cá ăn sau khi tiêm khuẩn, tỉ lệ sống của cá có sự thay đổi rõ rệt.



Hình 9. Tỷ lệ sống của cá ở các nghiệm thức thí nghiệm: NT đối chứng: cá không sử dụng chế phẩm; NT1: cá cho ăn thức ăn có trộn chế phẩm nồng độ 10ml/kg; NT2: cá cho ăn thức ăn có trộn chế phẩm nồng độ 30ml/kg; NT3: cá cho ăn thức ăn có trộn chế phẩm nồng độ 60ml/kg; NT4: cá cho ăn thức ăn có trộn chế phẩm nồng độ 100ml/kg

Ở nghiệm thức không cho ăn chế phẩm và cho ăn với nồng độ 10ml/kg và 30ml/kg, cá sống với tỉ lệ dưới 50%. Nhưng với nồng độ cao hơn là 60ml/kg và 100ml/kg thì tỉ lệ sống của cá cao hơn lần lượt là 68,89% và 84,44%. Sau 4 ngày, cá chết 100% ở nghiệm thức không cho ăn chế phẩm (NT đối chứng) và NT trộn chế phẩm với nồng độ 10ml/kg. Ở hai nồng độ 30ml/kg, 60ml/kg, liều bổ sung vào thức ăn còn thấp nên tỉ lệ cá sống sau 4 ngày tiêm vi khuẩn dưới 50% với tỉ lệ lần lượt là 28,89% và 44,44%. Tuy nhiên, ở nồng độ 30ml/kg, cá tiếp tục chết với tỉ lệ sống chỉ còn 24,44% sau 10 ngày. Ở nồng độ 100ml/kg, cá chết ở ngày đầu với tỉ lệ thấp khoảng 15,56% sau khi gây cảm nhiễm. Sau đó cá chết từ từ và đến ngày thứ 3, tỉ lệ sống của cá là 77,78% và cá ngưng chết cho đến khi kết thúc thí nghiệm (Hình 9). Với cá chết trong thí nghiệm được đem đi mổ để quan sát nội tạng. Kết quả điều trị cho thấy, ở nồng độ trộn chế phẩm cao nhất 100ml/kg, cá không còn xuất hiện tình trạng xuất huyết ở gan như ở các nồng độ khác (Hình 10). Điều này chứng tỏ chế phẩm có tác dụng phòng bệnh với liều bổ sung vào thức ăn là 100ml/kg.



Hình 10. (1) gan bị xuất huyết nặng khi không dùng chế phẩm; (2) gan bị xuất huyết nhẹ khi dùng chế phẩm ở nồng độ thấp 30ml/kg, 60ml/kg; (3) gan bình thường khi dùng chế phẩm ở nồng độ 100ml/kg

4. Kết luận

Chế phẩm Bekimi có khả năng kháng khuẩn mạnh với đường kính vòng tròn kháng khuẩn cao $20,73 \pm 0,87$ mm và vi khuẩn bị tiêu diệt hoàn toàn. Bekimi được sử dụng ở mức độ pha loãng tối đa là 1:10 trong điều kiện in vitro có thể ức chế được vi khuẩn. Đối với việc sử dụng phương pháp ăn để phòng bệnh cho cá, phương pháp này đem lại hiệu quả cho cá khi sử dụng với nồng độ 100ml/kg thức ăn tim bò. Sử dụng Bekimi với liều lượng 100ml/kg không gây hại cho cá đồng thời việc sử dụng chế phẩm có nguồn gốc từ thiên nhiên không gây ô nhiễm nguồn nước và thân thiện với môi trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Huỳnh Kim Diệu và Nguyễn Thành Văn (2011), “Sự thuần chủng và hoạt tính kháng khuẩn của cây trầu không (*Piper betle*) và cây lốt (*Piper lolot*) ở đồng bằng sông Cửu Long”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, tr. 282-288
2. Nguyễn Ngọc Du (2008), “Bệnh thường gặp trên cá Koi (*Cyprinus carpio*), cá đĩa (*Symphysodon discus*) và các biện pháp phòng trị”, *Đề tài Sở Khoa học Công nghệ TP Hồ Chí Minh và Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 2*.
3. Nguyễn Thị Lý và Trần Thị Hồng Vân (2007), “Tách tinh dầu và carotenoid từ lá trầu (*Piper betle* L.)”, *Hội nghị Khoa học và Công nghệ lần 9*, TPHCM.
4. Anja, K. Sasa, P. Barbara, J., & Sonja, M. (2010), “Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts”, *Journal of Microbiological Methods*, 81, 121- 126.
5. Jahir, K., & Naveen, K. (2011), “Evaluation of antibacterial properties of extract of piper betel leaf”, *Journal of pharmaceutical and biomedical sciences*, 11(01), 1-3.
6. Oyedemi, S., Okoh, A., Mabinya, L., Pirochenva, G., & Afolayan, A. (2009), “The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, α -terpineol and γ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*”, *African Journal of Biotechnology*, 8 (7), 1280-1286.
7. Panuwat, S., Nutchana, S., & Panchuti, P. (2006), “Antimicrobial and Antioxidant Activities of Betel Oil”, *Kasetsart Universiti*, 40, 91-100.
8. Rajesh, P., Madhav, U., Varsha, K., Katchi, V., Kulkarni, G., & Shouche, Y. (2011), “Isolation and identification of two new strains of *Aeromonas* spp. from diseased golurami fish and aquarium water”, *International Journal of Life Sciences*, 5(1), pp.25-31.
9. Ruth Francis-Floyd. (2002), “*Aeromonas* infection”, http://www.simplidiscus.com/library/disease_medications/external/aeromonas_infections.shtml.

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 22-10-2015; ngày phản biện đánh giá: 03-11-2015;
ngày chấp nhận đăng: 13-6-2016)