

Nghiên cứu khả năng diệt một số loài vi khuẩn và nấm của lá hẹ (*Allium tuberosum*)

Trương Thị Mỹ Hạnh^{1*}, Nguyễn Thị Nguyễn¹,
Trương Thị Thành Vinh², Huỳnh Thị Mỹ Lệ³, Phan Thị Vân¹

¹Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản I

²Đại học Vinh

³Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 2/4/2018; ngày chuyển phản biện 6/4/2018; ngày nhận phản biện 14/5/2018; ngày chấp nhận đăng 22/5/2018

Tóm tắt:

Nghiên cứu nhằm đánh giá khả năng diệt khuẩn và nấm của nước ép lá hẹ (*Allium tuberosum*). Vi khuẩn gây bệnh cho cá rô phi bao gồm *Aeromonas hydrophila* (3 chủng là CED04-008, CED05-004, CED05-005), *Streptococcus* sp. (CEDMA05-043) và nấm gây bệnh (*Saprogenia* sp.) được thử với dịch chiết lá hẹ ở nồng độ và thời gian khác nhau. Kết quả cho thấy, nước ép lá hẹ ở nồng độ 100 µl có khả năng diệt các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và *Streptococcus* sp. với đường kính vòng vô khuẩn (ĐKVVK) lần lượt là 27-31 và 30 mm. Nấm *Saprogenia* sp. bị diệt ở nồng độ 15.000 và 13.000 ppm với thời gian ngâm tương ứng là 6 và 24 giờ. Kết quả này là cơ sở khoa học quan trọng tạo tiền đề phát triển sản phẩm thuốc thảo dược có hiệu quả phòng trị bệnh ở cá rô phi nuôi theo hướng an toàn sinh học và thân thiện với môi trường.

Từ khóa: *Aeromonas hydrophila*, *Allium tuberosum*, hẹ, rô phi, *Saprogenia* sp., *Streptococcus* sp..

Chỉ số phân loại: 4.5

Đặt vấn đề

Với mục tiêu phát triển nuôi cá rô phi trở thành ngành sản xuất hàng hóa lớn, chủ lực, hiệu quả, bền vững với sản phẩm đa dạng, giá trị cao nhằm đáp ứng thị trường tiêu thụ trong nước và xuất khẩu, kế hoạch đã đề ra là đến năm 2030 diện tích nuôi đạt 400.000 ha và 1,8 triệu m³ lồng nuôi trên hệ thống sông và hồ chứa lớn, sản lượng đạt 400.000 tấn, trong đó 45-50% phục vụ xuất khẩu [1]. Để đạt được kế hoạch này, hai yếu tố then chốt cần triển khai hiệu quả là sản xuất con giống có chất lượng cao và kiểm soát tốt dịch bệnh trong quá trình nuôi [2].

Cũng như các loại cá nuôi khác, cá rô phi có thể nhiễm các tác nhân như ký sinh trùng, nấm, và vi rút, đặc biệt là vi khuẩn. Vi khuẩn *Streptococcus* sp. đã gây ra dịch bệnh ở cá rô phi năm 2009 trên diện rộng tại hầu hết các tỉnh/thành phố miền Bắc (Hải Dương, Bắc Ninh, Bắc Giang và Hà Nội...), với tỷ lệ cá nuôi chết 80-100% [3]. Bệnh do vi khuẩn *Streptococcus* sp. vẫn tiếp tục diễn ra tại hộ nuôi trên hầu hết các tỉnh thành cả nước, đặc biệt tại các tỉnh miền Bắc với tỷ lệ chết 50-80%, cá bị bệnh có biểu hiện bệnh lý dễ nhận thấy như lồi mắt, xuất huyết, bơi không định hướng... [4]. Bên cạnh đó, vi khuẩn *A. hydrophila*, nấm *Saprogenia* sp. và *Branchiomyces* đã được báo cáo là có ảnh hưởng đến cá rô phi trong suốt quá trình nuôi, đặc biệt giai đoạn 0,5-100 g

[5, 6]. Trong thực tế, thiệt hại và mất mát lớn nhất của người nuôi khi cá bị bệnh là do cá bội nhiễm đa tác nhân gây bệnh hơn là do đơn lẻ một tác nhân gây ra [7], vì vậy, giải pháp đưa ra có hiệu quả để kiểm soát đa tác nhân gây bệnh cho cá rô phi, tạo ra sản phẩm mang tính an toàn vệ sinh thực phẩm, đồng thời thân thiện với môi trường đang là điều cần hướng tới [8].

Sản phẩm có nguồn gốc từ thảo dược đã và đang được quan tâm phát triển trong nuôi trồng thủy sản với vai trò tăng sức đề kháng, kích thích tăng trưởng, tiêu hóa [9], thay thế thuốc kháng sinh nhằm hạn chế rủi ro do hiện tượng kháng kháng sinh của vi khuẩn, tạo an toàn vệ sinh cho sản phẩm [10, 11], tăng khả năng miễn dịch [12], kháng nấm [8, 13].

Các nghiên cứu hiệu quả và ứng dụng thảo dược trong nuôi trồng thủy sản ở Việt Nam còn rất nhiều hạn chế so với các nước trên thế giới, đến nay loại thảo dược được ứng dụng rộng rãi có tính hiệu quả diệt khuẩn, nấm cao là tỏi, hẹ - loại thảo dược thuộc họ hành cùng với tỏi. Mục đích của nghiên cứu nhằm xác định hiệu quả diệt vi khuẩn, nấm của hẹ, làm cơ sở cho việc nghiên cứu tạo sản phẩm thuốc có nguồn gốc từ thảo dược với hiệu quả diệt vi khuẩn và nấm có thể ứng dụng phù hợp ở mô hình nuôi cá rô phi tại Việt Nam.

*Tác giả liên hệ: tmhanh@ria1.org

The anti-bacterial and anti-fungal effects of garlic chives (*Allium tuberosum*)

Thi My Hanh Truong^{1*}, Thi Nguyen Nguyen¹,
Thi Thanh Vinh Truong², Thi My Le Huynh³,
Thi Van Phan¹

¹Research Institute for Aquaculture No 1

²Vinh University

³Vietnam National University of Agriculture

Received 2 April 2018; accepted 22 May 2018

Abstract:

The study was conducted to evaluate the bacterial and fungal inhibitions of the leaf extract from galic chives (*Allium tuberosum*). The bacteria and fungi that caused the diseases on tilapia included 3 strains of *Aeromonas hydrophila* (CED04-008, CED05-004, and CED05-005), 1 strain of *Streptococcus* sp., and they (CEDMA05-043), and fungi of *Saprolegnia* sp., and they were exposed to the leaf extract at different concentrations and durations. The results showed that the garlic chives leaf juice (100 μ l) killed *A. hydrophila* and *Streptococcus* sp. by the sterile round of 27-31 mm and 30 mm, respectively. *Saprolegnia* sp. was killed at the concentrations of 15,000 ppm and 13,000 ppm after 6 and 24 hours, respectively. This finding is an important scientific evidence to develop herbal products for the prevention and treatment of diseases during tilapia farming towards biosafety and environmental friendliness.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, *Allium tuberosum*, garlic chives, *Saprolegnia* sp., *Streptococcus* sp., Tilapia.

Classification number: 4.5

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Chúng vi khuẩn và nấm phân lập từ cá rô phi bị bệnh và lưu giữ tại Trung tâm Quan trắc môi trường và bệnh thủy sản miền Bắc (CEDMA) thuộc Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản I (RIA1). Vi khuẩn bao gồm *A. hydrophila* (với 3 chủng có ký hiệu lần lượt là CED04-008, CED05-004, CED05-005), *Streptococcus* sp. (CED05-043) và nấm *Saprolegnia* sp.

Lá hẹ (*A. tuberosum*), thuốc kháng sinh Oxytetracycline

(30 μ g), Streptomycine (500 μ g) và các khoan giấy chưa tẩm kháng sinh đạt tiêu chuẩn (CODE 1334-OXOID) được sản xuất bởi Công ty Nam Khoa.

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị nước ép lá hẹ: Lá hẹ được rửa sạch, để ráo nước tự nhiên ở nhiệt độ phòng, thái nhỏ cho vào máy xay ép lấy nước và bảo quản ở nhiệt độ 4°C. Sử dụng lần lượt 50, 70 và 100 μ l nước ép lá hẹ nhỏ lên khoan giấy. Các khoan giấy đã được tẩm nước ép lá hẹ được sử dụng trong bước lập kháng sinh đồ nhằm xác định hiệu quả diệt khuẩn.

Chuẩn bị vi khuẩn: Vi khuẩn được nuôi lắc trong môi trường nutrient broth ở nhiệt độ 29°C, với tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 16h. Mật độ vi khuẩn được đo bằng phương pháp so màu quang điện với bước sóng $\lambda = 600$ nm có giá trị OD = 1, tương ứng với mật độ vi khuẩn dao động trong khoảng 10^8 - 10^9 cfu/ml.

Đánh giá khả năng kháng khuẩn của nước ép lá hẹ: Xác định hiệu quả diệt khuẩn của nước ép lá hẹ bằng phương pháp lập kháng sinh đồ của Kirby-Bauer. Sử dụng môi trường Mueller-Hinton Agar (MHA, Merck) đổ lên đĩa lòng, hút khoảng 10^8 - 10^9 khuẩn lạc/ml/đĩa, trang đều lên bề mặt đĩa, đặt khoan Oxytetracycline 30 μ g (OX); Streptomycine 500 μ g (ST) và các khoan giấy tẩm nước ép lá hẹ tương ứng lượng 50, 70 và 100 μ l/khoan lên mặt đĩa thạch. Sau 24h ủ ở nhiệt độ 28-30°C đọc kết quả ĐKVVK trên đĩa thạch MHA, kết quả sẽ phản ánh khả năng nhạy, nhạy trung bình hay kháng của nước ép lá hẹ đối với vi khuẩn, đồng thời có thể so sánh hiệu quả diệt khuẩn đối với thuốc kháng sinh sử dụng.

Đánh giá khả năng kháng nấm của nước ép lá hẹ: Tác dụng diệt nấm được thực hiện như sau: Nước ép lá hẹ được pha loãng trong nước cất khử trùng lần lượt với tỷ lệ tương ứng nước ép lá hẹ trong nước cất là 5, 6,25, 12,5, 25, 50 và 100%. *Saprolegnia* sp. được nuôi cấy trên môi trường tăng sinh sau 24h được rửa sạch trong nước cất 3 lần, sau đó cho vào dung dịch nước ép lá hẹ với các độ pha loãng % tương ứng nêu trên trong 10 phút, 30 phút, 1h, 2h, 3h, 4 h và 24h. Lấy ra rửa qua nước cất 3 lần, rồi cấy lên môi trường nuôi cấy, theo dõi sự phát triển của sợi nấm sau 24, 48, 72... 168h.

Nghiệm thức đối chứng được bố trí như sau: Chủng nấm sẽ được nuôi cấy trong môi trường yeast extract agar (GYA) không ngâm qua dịch chiết thảo mộc mà chỉ rửa qua nước cất.

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu của nước ép lá hẹ: Nấm *Saprolegnia* sp. được ngâm trong nước ép lá hẹ được pha loãng với nồng độ lần lượt 5.000, 10.000, 12.000, 13.000, 14.000, 15.000, 20.000, 30.000, 35.000, 45.000 và 50.000 ppm trong thời gian 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 24

và 48h. Sau thời gian ngâm ở nồng độ tương ứng, sợi nấm được lấy ra cấy trên môi trường tăng sinh GYA và theo dõi sự phát triển của nấm trong 7 ngày.

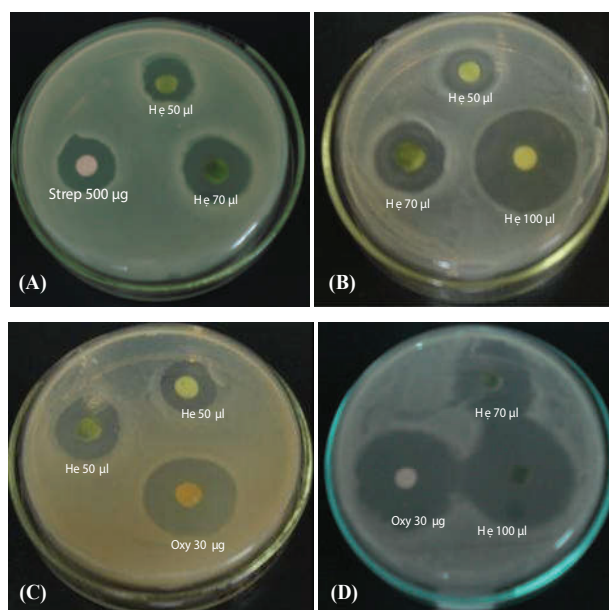
Xử lý số liệu: Dùng phần mềm Microsoft Excell (2007).

Kết quả và thảo luận

Tác dụng diệt khuẩn của nước ép lá hẹ đối với vi khuẩn gây bệnh ở cá rô phi

Nước ép lá hẹ có tính diệt khuẩn *A. hydrophila* và *Streptococcus* sp. gây bệnh cho cá rô phi nuôi được thể hiện rõ ở bảng 1 và hình 1. ĐKVVK tăng lên theo hàm lượng nước ép lá hẹ sử dụng trên khoanh giấy từ 50, 70 và 100 μ l. Với hàm lượng 100 μ l nước ép lá hẹ có khả năng diệt *A. hydrophila* với ĐKVVK dao động trong khoảng 27,2-31 mm, cao hơn so với thuốc Oxytetracycline (20,5-28,3 mm). Trong khi đó chỉ với lượng 70 μ l nước ép lá hẹ có tính diệt *Streptococcus* sp. với ĐKVVK đạt từ 18,9 đến 28,4 mm, cao hơn thuốc Streptomycin (21,9 mm) (bảng 1). Qua đó nhận thấy, hẹ có tính diệt khuẩn mạnh, đặc biệt với vi khuẩn gram dương như *Streptococcus* sp.. Kết quả ở bảng 1 cũng đã thể hiện, chỉ với nước ép lá hẹ (100 μ l), chưa qua tách chiết thô hay tinh nhưng đã có hiệu quả diệt vi khuẩn lớn hơn Oxytetracycline và Streptomycin, đây là 2 loại kháng sinh có phổ rộng đối với nhóm vi khuẩn gram âm và gram dương, đồng thời chúng được sử dụng phổ biến [14]. Tính hiệu quả về diệt khuẩn của thảo dược đã được xác nhận và có xu thế sử dụng rộng rãi, do thảo dược có nhiều ưu điểm vượt trội như nguồn nguyên liệu dễ kiếm, chi phí thấp, thân thiện với môi trường, không ảnh hưởng đến người sử dụng và cho ra sản phẩm đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm. Một số loại có hiệu quả diệt khuẩn tốt ngay cả khi vi khuẩn đã có hiện tượng kháng với thuốc kháng sinh, như cây lô hội (*Aloe barbadensis*), mướp đắng (*Momordica charantia*) có tính diệt khuẩn cao với tác nhân gây bệnh *A.*

hydrophila, *Cellobiococcus* sp., *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Streptobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, khi các chủng vi khuẩn này đã kháng với thuốc kháng sinh nitrofurantoin, amoxycillin, bacitracin, cephalothin, erythromycin, novobiocin, vancomycin, ampicillin, oxacillin và colistin [15]. Nghiên cứu và ứng dụng nhiều nhất là thảo dược thuộc nhóm hành tỏi (Allium), bên cạnh kết quả nghiên cứu bằng lập kháng sinh đồ có hiệu quả ức chế sự phát triển của vi khuẩn gram âm (*Vibrio harveyi*, *Vibrio* spp., *Vibrio parahaemolyticus* và *Aeromonas* spp.) gây bệnh cho động vật thủy sản nuôi [16, 17], còn có các sản phẩm thương mại như KN04-12, TD1-Becanor, TD2-Becanor... với thành phần chính là tỏi [4].



Hình 1. ĐKVVK của nước ép lá hẹ lên vi khuẩn. (A, B) là *Streptococcus* sp; (C, D) là *Aeromonas hydrophila*.

Bảng 1. ĐKVVK của các nồng độ nước ép lá hẹ đối với vi khuẩn gây bệnh ở cá rô phi nuôi.

Chủng vi khuẩn thử nghiệm	ĐKVVK (mm)				
	Nước ép lá hẹ			Khoanh giấy tẩm kháng sinh	
	50 μ l	70 μ l	100 μ l	Oxy (30 μ g)	Str (500 μ g)
<i>A. hydrophila</i> (CED04-008)	17,2 $\pm$ 0,10 ^a	26,4 $\pm$ 0,11 ^b	28,7 $\pm$ 0,09 ^c	20,5 $\pm$ 0,04 ^d	-
<i>A. hydrophila</i> (CED05-004)	19,1 $\pm$ 0,09 ^a	25,3 $\pm$ 0,14 ^b	31,0 $\pm$ 0,04 ^c	28,3 $\pm$ 0,03 ^d	-
<i>A. hydrophila</i> (CED05-005)	15,9 $\pm$ 0,12 ^a	18,9 $\pm$ 0,08 ^b	27,1 $\pm$ 0,10 ^c	25,7 $\pm$ 0,04 ^d	-
<i>Streptococcus</i> sp. (CED05-043)	20,1 $\pm$ 0,03 ^a	28,4 $\pm$ 0,16 ^b	30,3 $\pm$ 0,04 ^c	-	21,9 $\pm$ 0,03 ^a

Ghi chú: Str là Streptomycin; Oxy là oxytetracycline; a, b, c, d chỉ sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê $p < 0,05$.

Tác dụng của nước ép lá họ đối với nấm gây bệnh ở cá rô phi

Kết quả sàng lọc ban đầu ở bảng 2 cho thấy, nước ép lá họ có hiệu quả ức chế, diệt nấm *Saprolegnia* sp. Với lượng nước ép pha loãng trong nước cất ở mức 50 hoặc 5-25% đã hoàn toàn có hiệu quả diệt nấm *Saprolegnia* sp. khi ngâm chúng trong thời gian lần lượt là 10 và 30 phút (bảng 2). Từ kết quả sàng lọc ban đầu, nghiên cứu tiếp tục triển khai nhằm xác định nồng độ tối thiểu ức chế *Saprolegnia* sp. Ngâm sợi nấm trong 3h ở nồng độ pha loãng nước ép lá họ 15.000 ppm, kết quả nhận thấy nước lá họ có khả năng ức chế sự phát triển của nấm tuy rằng chưa triệt để - nấm vẫn phát triển sau 2 ngày nuôi cấy, với nồng độ này cần ngâm sợi nấm trong 6h cho kết quả diệt nấm hoàn toàn (bảng 2, hình 2). Khi nâng nồng độ lên gấp đôi (30.000 ppm ứng với 300 µl nước ép lá họ pha loãng trong 1 ml nước cất), thời gian ngâm *Saprolegnia* sp. giảm xuống còn 2h đã có thể diệt nấm hoàn toàn, nồng độ và thời gian này có kết quả tương tự Green malachite (1 ppm) (bảng 3). Nồng độ tiếp tục nâng lên 35.000-50.000 ppm, ngâm sợi nấm trong 30 phút, có hiệu quả diệt nấm cao hơn khi sử dụng Green malachite (1 ppm). Có thể thấy rằng, họ là thảo dược cần được nghiên cứu sâu hơn để tạo sản phẩm thay thế Green malachite trong trị bệnh nấm gây ra ở cá nuôi.

Hiệu quả diệt nấm của họ đã được nghiên cứu bởi Lam và cs (2000) [18], kết quả nghiên cứu đã nêu phần chồi non của lá họ với nồng độ 2µM, sử dụng ngâm nấm trong 1h có khả năng diệt một số loại nấm *Fusarium oxysporum*, *Coprinus comatus*, *Mycosphaerella arachidicola* và *Botrytis cinerea*. Không chỉ trong thủy sản mà trong nông nghiệp, các nhà nghiên cứu cũng chỉ ra họ có hiệu quả cao trong phòng chống bệnh nấm *Fusarium* sp. gây bệnh héo lá ở chuối bằng cách trồng xen canh họ và chuối [19].

Bảng 2. Kết quả sàng lọc khả năng diệt nấm của nước ép lá họ.

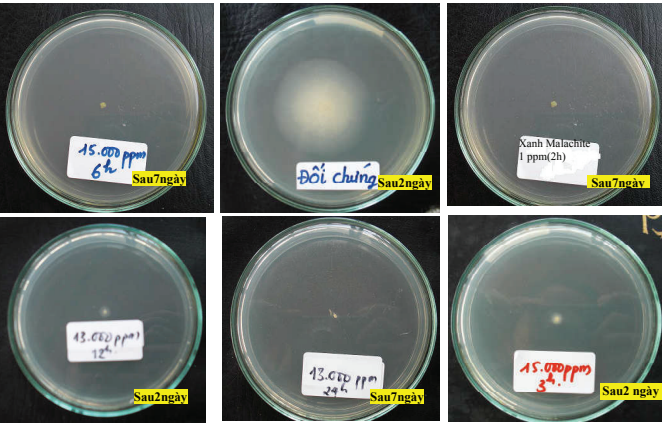
Tỷ lệ hệ sử dụng (%)	Thời gian	Tác dụng của dịch chiết ở các khoảng thời gian khác nhau						
		10 phút	30 phút	1h	2h	3h	4h	24h
100		-	-	-	-	-	-	-
50		-	-	-	-	-	-	-
25		+	-	-	-	-	-	-
12,5		+	-	-	-	-	-	-
6,25		+	-	-	-	-	-	-
5		+	-	-	-	-	-	-
Đối chứng (nước cất)		+	+	+	+	+	+	+

Ghi chú: +: Nấm phát triển sau 1 ngày nuôi cấy; -: Nấm không phát triển sau 4 ngày nuôi cấy.

Bảng 3. Nồng độ ức chế tối thiểu của nước ép lá họ với *Saprolegnia* sp.

Nồng độ (ppm)	Thời gian	Tác dụng diệt nấm của nước ép lá họ trong khoảng thời gian khác nhau (h)											
		0,5	1	1,5	2	3	4	5	6	9	12	24	48
Nồng độ thử nghiệm của nước ép lá họ	50.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	45.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	35.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30.000	+	+	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20.000	+	+	+	+	2	3	-	-	-	-	-	-
	15.000	+	+	+	+	2	3	3	-	-	-	-	-
	14.000	+	+	+	+	+	+	+	2	2	-	-	-
	13.000	+	+	+	+	+	+	+	+	2	-	-	-
	12.000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	-	-
	10.000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Đối chứng	Nước cất	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Green malachite (1 ppm)	+	+	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: +: Nấm phát triển sau 1 ngày; -: Nấm không mọc lại sau 7 ngày nuôi cấy; 2, 3: Nấm phát triển sau 2, 3 ngày nuôi cấy.



Hình 2. Hiệu quả diệt *Saprolegnia* sp. của nước ép lá họ ở các nồng độ pha loãng khác nhau.

Kết luận

Họ có tính diệt vi khuẩn (*Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus* sp.) cao khi sử dụng lượng nước ép ở nồng độ 100 µl/khoanh giấy, có ĐKVVK đạt 27-31 mm, cao hơn so với thuốc Oxytetracycline (30 µg) và Steptomycin (500 µg) có ĐKVVK 20-28 mm.

Họ có tính diệt nấm (*Saprolegnia* sp.) ở nồng độ 15.000

ppm trong 6h và ở 13.000 ppm trong 24h, hiệu quả tương đương Green machite (1 ppm) khi nồng độ hệ đạt 30.000 ppm, tính hiệu quả cao hơn Green machite khi nồng độ nước ép lá hệ sử dụng 35.000 ppm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2016), *Phê duyệt quy hoạch phát triển nuôi cá rô phi đến năm 2020, định hướng đến năm 2030*, Quyết định số 1639/QĐ-BNN-TCTS ngày 6/5/2016.
- [2] Thành Công (2016), *Phát triển cá Rô phi thành ngành sản xuất hàng hóa lớn*, <http://www.tiengiang.gov.vn/SNN/42/668/1125/91816/Tin-tuc---su-kien/Phat-trien-ca-ro-phi-thanh-nganh-san-xuat-hang-hoa-lon.aspx>.
- [3] Nguyễn Văn Khuê và cs (2009), “Xác định nguyên nhân gây chết cá rô phi thương phẩm tại một số tỉnh miền Bắc”, *Báo cáo khoa học Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản I*.
- [4] CEDMA (2006), “Hiệu quả phòng và trị bệnh nhiễm khuẩn của sản phẩm thảo dược lên cá nuôi”, *Báo cáo khoa học Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản I*.
- [5] Aquavet (2006), *Diseases of Tilapia - An Introduction*.
- [6] A.E. Noor El Deen, et al. (2014), “Studies on Aeromonas hydrophila in Cultured Oreochromis niloticus at Kafr El Sheikh Governorate, Egypt with Reference to Histopathological Alterations in Some Vital Organs”, *World J. Fish Mar. Sci.*, **6**, pp.233-240.
- [7] H.T. Dong, et al. (2015), “Naturally concurrent infections of bacterial and viral pathogens in disease outbreaks in cultured Nile tilapia (Oreochromis niloticus) farms”, *Aquaculture*, **448**, pp.427-435.
- [8] C. Chitmanat, et al. (2005), “Antiparasitic, antibacterial, and antifungal activities derived from a Terminalia catappa solution against some tilapia (Oreochromis niloticus) pathogens”, *Acta Horticulturae*, **678**, pp.179-182.
- [9] T. Citarasu (2010), “Herbal biomedicines: A new opportunity for aquaculture industry”, *Aquac. Int.*, **18(3)**, pp.403-414.
- [10] N. Sahoo, P. Manchikanti, S. Dey (2010), “Herbal drugs: Standards and regulation”, *Fitoterapia*, **18(6)**, pp.462-471.
- [11] J. Zhang, et al. (2012), “Quality of herbal medicines: Challenges and solutions”, *Ther. Med.*, **20(1-2)**, pp.100-106.
- [12] M. Minomol (2005), *Culture of Gold fish Carassius auratus using medicinal plants having immunostimulant characteristics*, M. Phil Diss. MS Univ. India.
- [13] A. Adigüzel, et al. (2005), “Antimicrobial Effects of Ocimum basilicum (Labiatae) Extract”, *Turkish J. Biol.*, **29**, pp.155-160.
- [14] Nguyễn Khang (2005), *Kháng sinh học ứng dụng*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- [15] R. Pannu, et al. (2014), “Effect of probiotics, antibiotics and herbal extracts against fish bacterial pathogens”, *Ecotoxicol. and Environ. Contam.*, **9**, pp.15-20.
- [16] F. Sultana, et al. (2015), “In-vitro Antioxidant and Antimicrobial Activity of Allium tuberosum Rottler. ex Spreng”, *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.*, **2**, pp.178-187.
- [17] B. Vaseeharan, et al. (2011), “Antibacterial activity of Allium sativum against multidrug-resistant Vibrio harveyi isolated from black gill-diseased Fenneropenaeus indicus”, *Aquac. Int.*, **19**, pp.531-539.
- [18] Y.W. Lam, et al. (2000), “A robust cysteine-deficient chitinase-like antifungal protein from inner shoots of the edible chive Allium tuberosum”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **279**, pp.74-80.
- [19] H. Zhang, et al. (2013), “Control of Panama Disease of Banana by Rotating and Intercropping with Chinese Chive (Allium Tuberosum Rottler): Role of Plant Volatiles”, *J. Chem. Ecol.*, **39**, pp.243-252.