

ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA THẢO DƯỢC LÊN MEN BỔ SUNG VÀO THỨC ĂN LÊN TĂNG TRƯỞNG, KHẢ NĂNG SỬ DỤNG THỨC ĂN VÀ KHÁNG BỆNH Ở CÁ CHÉP (*Cyprinus carpio*)

EVALUATION OF THE EFFECTS OF FERMENTED HERBS SUPPLEMENTED IN FEED ON GROWTH, FEED UTILIZATION, AND DISEASE RESISTANCE IN COMMON CARP (*Cyprinus carpio*)

Nguyễn Thị Mai¹, Vũ Văn Sáng², Trần Vĩ Hích³

1. Bộ môn Dinh dưỡng và thức ăn Thủy sản, Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

2. Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

3. Viện Nuôi trồng thủy sản, Trường Đại học Nha Trang

Tác giả liên hệ: TS. Nguyễn Thị Mai, Email: ntmai.ntts@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 03/01/2025; Ngày phản biện thông qua: 15/04/2025; Ngày duyệt đăng: 20/05/2025

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với mục đích đánh giá sự ảnh hưởng của tỉ lệ bổ sung chế phẩm thảo dược lên men (FH) đến tăng trưởng, khả năng sử dụng thức ăn và kháng bệnh ở cá chép (*Cyprinus carpio*). Cá chép giống (~25g/con) được cho ăn thức ăn bổ sung chế phẩm ở các tỉ lệ 0, 2, 5 và 10g/kg thức ăn (tương ứng với các nghiệm thức FH0, FH2, FH5 và FH10) trong vòng 6 tuần, thức ăn được ghi chép hàng ngày. Cuối thí nghiệm, cá được cân đo khối lượng để xác định tăng trưởng và khả năng sử dụng thức ăn. Cá sau đó được cảm nhiễm với vi khuẩn *Aeromonas veronii* với liều LD₅₀ ($4,8 \times 10^7$ CFU/mL), số lượng cá chết được ghi chép hàng ngày trong vòng 14 ngày. Kết quả cho thấy chế phẩm bổ sung không ảnh hưởng đến tăng trưởng, khả năng sử dụng thức ăn và tỉ lệ sống của cá. Chế phẩm bổ sung ở hàm lượng 10g/kg thức ăn gây ra những biến đổi về kích thước gan và chiều dài của ruột cá thí nghiệm. Thảo dược lên men nâng cao khả năng kháng vi khuẩn *A.veronii* và tỉ lệ chết thấp nhất sau cảm nhiễm (10%) thu được ở nhóm sử dụng thức ăn bổ sung 5g/kg thức ăn.

Từ khoá: Thảo dược lên men, , *Aeromonas veronii*, cá chép, kháng bệnh

ABSTRACT

The study was conducted to evaluate the effects of fermented herbal (FH) product supplementations on the growth, feed utilization, and disease resistance in common carp (*Cyprinus carpio*). Juvenile carp (~25g/fish) were fed diets supplemented with the product at 0, 2, 5, and 10g/kg feed (designated as FH0, FH2, FH5, and FH10, respectively) for 6 weeks, with daily feed recording. At the end of the experiment, the fish were weighed to determine the growth and feed utilization. The fish were then challenged with *Aeromonas veronii* at the LD50 dose ($4,8 \times 10^7$ CFU/mL) and mortality was recorded daily for 14 days. The results showed that the supplementation did not affect growth, feed utilization, or survival rates. However, the supplementation of FH at 10g/kg feed induced changes in liver size and intestinal length. The fermented herbal product enhanced resistance against *A.veronii*. The lowest mortality after infection (10%) was observed in the group fed 5g/kg feed.

Keywords: Fermented herbs, *Aeromonas veronii*, common carp, disease resistance

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nuôi trồng thủy sản đóng một vai trò quan trọng trong việc duy trì sinh kế, chiếm 46% tổng sản lượng cá và 52% tiêu dùng của con người (FAO, 2022). Trong các đối tượng nuôi thủy sản, cá chép (*Cyprinus carpio* L., 1758) là một trong những loài cá nước ngọt được nuôi rộng rãi nhất trên thế giới (FIGIS,

2020). Ở Việt Nam, cá chép đang là một trong những đối tượng nuôi ở hầu hết các thủy vực nội địa, đặc biệt phía Bắc nước ta; một phần là do dễ nuôi, dễ chăm sóc; thêm vào đó, thịt cá chép có giá trị kinh tế, hàm lượng dinh dưỡng khá cao. Tuy nhiên, khi được nuôi với mật độ cao, môi trường ao nuôi dễ bị ô nhiễm bởi chất thải, thức ăn thừa trong quá trình

nuôi tạo điều kiện cho mầm bệnh phát triển, cá dễ bị stress... dẫn đến tình hình dịch bệnh bùng phát. Khi ao nuôi bị bệnh, người nuôi thường có xu hướng sử dụng các loại hoá chất, kháng sinh bổ sung vào thức ăn hoặc ao nuôi để phòng và trị bệnh. Tuy nhiên, hệ lụy gây nên hiện tượng kháng kháng sinh đối với chính loài nuôi và tồn dư kháng sinh trong sản phẩm thủy sản có thể ảnh hưởng lớn môi trường sinh thái và sức khỏe người tiêu dùng (Mavraganis et al., 2020; Nguyen et al., 2024). Do đó, việc sử dụng các giải pháp sinh học nhằm nâng cao sức khỏe của động vật thủy sản đang ngày càng được khuyến khích. Trong đó, các loại thảo dược lên men đang được quan tâm và ứng dụng do các hoạt tính sinh học của chúng như kháng khuẩn, kháng nấm, chống oxy hoá (Huayue và cs., 2022; Jiang và cs., 2023; Meng và cs., 2023) hứa hẹn như một chất phụ gia bổ sung trong thức ăn sau kỳ nguyên của kháng sinh. Thảo dược lên men hiện chưa được ứng dụng rộng rãi trong NTTS, tuy nhiên đã có nhiều nghiên cứu chỉ ra việc lên men thảo dược mang lại nhiều lợi ích hơn so với thảo dược thông thường. Quá trình lên men có thể phân hủy cellulose, lignin và các chất khác trong thành tế bào, các thành phần hoạt tính được giải phóng và các thành phần hoạt tính trong thảo mộc được phân tách thành các phần nhỏ để nâng cao hiệu quả của thuốc. Các lợi ích được ghi nhận như kích thích sự thèm ăn, duy trì hệ vi sinh vật đường ruột, tăng khả năng miễn dịch của ĐVTS (Li và cs., 2020). Cho đến nay, những tác động trên chiết xuất thảo dược trong nuôi trồng thủy sản chưa được nghiên cứu kỹ lưỡng và số liệu báo cáo trên cá chép rất hạn chế. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích đánh giá tác động của việc bổ sung thảo dược lên men lên tăng trưởng, khả năng sử dụng thức ăn và sức đề kháng của cá chép. Nghiên cứu này có ý nghĩa quan trọng trong việc nâng cao hiệu quả nuôi cá chép bằng cách tận dụng thảo dược lên men nhằm cải thiện tăng trưởng, tăng cường khả năng sử dụng thức ăn và nâng cao sức đề kháng. Kết quả nghiên cứu

có thể đóng góp vào việc phát triển phương pháp nuôi bền vững, giảm phụ thuộc vào kháng sinh, đồng thời tối ưu hóa chi phí thức ăn trong ngành nuôi trồng thủy sản

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Cá thí nghiệm

Cá chép giai đoạn giống được thu thập về từ Viện Nghiên cứu NTTS I (Đình Bảng, Từ Sơn, Bắc Ninh) có khối lượng ~ 25g/con, kích thước đồng đều, không sây sát, không dị tật, hoạt động tốt, không có biểu hiện bệnh lý. Cá được đưa về trại thí nghiệm và tắm với thuốc tím ở nồng độ 5ppm trong khoảng 10 phút nhằm tiêu diệt mầm bệnh và sát trùng vết sây sát trên cá trong quá trình di chuyển. Sau khi nuôi thích nghi trong hệ thống bể kính trong vòng hai tuần, các cá thể khỏe mạnh không có dấu hiệu bệnh lý được lựa chọn để tiến hành thí nghiệm.

2.2. Thức ăn thí nghiệm

Chế phẩm thảo dược lên men - FH (Syrmabio, Trung Quốc) chứa các thành phần bao gồm thảo dược (hoàng kỳ, cam thảo, ngũ gia bì), lợi khuẩn và nấm men (*Clostridium butyricum*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*). Trong đó, 1kg thảo dược được lên men bởi 0,5kg vi sinh có lợi ở dạng lỏng. Thảo dược lên men sau đó được trộn với tá dược vừa đủ và tạo thành chế phẩm dạng bột. Chế phẩm được trộn với thức ăn công nghiệp dạng viên với các tỉ lệ 0, 2, 5 và 10g/kg thức ăn tương ứng với các nghiệm thức FH0, FH2, FH5 và FH10. Chế phẩm được cân chính xác và trộn với trứng gà tươi với lượng phù hợp (12 mL trứng cho 100g thức ăn) để bao bọc bên ngoài viên thức ăn. Thức ăn sau khi trộn đều được để khô tự nhiên trong không khí khoảng 30 phút ở nhiệt độ phòng. Thức ăn sau đó được cho cá ăn trong ngày. Cho ăn từ từ tránh thừa khó kiểm soát, lượng thức ăn chuẩn bị hàng ngày, không giữ cho ăn cho ngày hôm sau.

2.3. Bố trí thí nghiệm nuôi tăng trưởng

Sau thời gian nuôi thuần hóa, cá có khối lượng trung bình là $30,18 \pm 0,10$ g/con được thả ngẫu nhiên vào 12 bể có thể tích 250L với mật độ 20 con/bể và được sục khí liên tục. Cá được cho ăn thức ăn thí nghiệm (FH0, FH2, FH5, FH10) với tần suất 2 lần/ngày với tỉ lệ 4% khối lượng thân trong vòng 6 tuần. Hệ thống bể nuôi được xi phông hàng ngày để loại bỏ phân thải và 30% thể tích bể được thay mới. Lượng thức ăn, số lượng cá chết và khối lượng cá chết hàng ngày được theo dõi và ghi chép lại để xác định tỷ lệ sống và khả năng sử dụng thức ăn. Cá được cân đo định kì 2 tuần/lần để theo dõi tăng trưởng của cá và điều chỉnh lượng thức ăn.

Trong thí nghiệm nuôi, biến động các thông số môi trường được theo dõi thường xuyên trước khi thay nước và điều chỉnh cho phù hợp với cá chép. Nhiệt độ được xác định bằng nhiệt kế thủy ngân đo với tần suất 2 lần/ngày (dao động từ 26 đến 29°C). Oxy hòa tan (dao động từ 5-7,5 mg/L) được theo dõi 2 lần/ngày bằng cách sử dụng máy đo oxy hòa tan cầm tay (Milwaukee – RumaniMW600). Độ pH được đo hàng ngày bằng bộ test kit của Sera (Đức) và so màu trên bảng màu (từ 7-8). Các yếu tố $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ và NO_2^- được đo hàng tuần để xác định khí độc bằng bộ test kit của Sera và đều có giá trị $\leq 0,5$ mg/L.

2.4. Thí nghiệm cảm nhiễm

Khi kết thúc thí nghiệm nuôi, cá của mỗi nghiệm thức được gộp lại thành một lô cá và chia ngẫu nhiên vào hệ thống bể cảm nhiễm có thể tích thực 100L với mật độ 10 con/bể, trong đó có một bể đối chứng gồm cá từ tất cả các nghiệm thức với mật độ tương ứng. Vi khuẩn gốc phân lập từ cá chép nhiễm bệnh do vi khuẩn *Aeromonas veronii* và lưu trữ tại phòng thí nghiệm Bộ môn Môi trường và Bệnh thủy sản, Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam được trang cấy trên đĩa thạch NA (nutrient agar) với thể tích 15 μL /đĩa. Đĩa vi khuẩn sau đó được ủ trong tủ nuôi vi sinh, nhiệt độ 30°C trong 24 giờ. Sau 24h, một khuẩn lạc đặc trưng được cấy chuyển sang môi trường NB (nutrient broth)

và ủ trong tủ ấm ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ. Sau 24h, dịch vi khuẩn gốc được đo mật độ quang (OD) bằng máy quang phổ kế ở bước sóng 610 nm. Một phần dịch vi khuẩn gốc cũng được pha loãng 100.000 lần và trang cấy trên môi trường NA (20 μL /đĩa thạch) để xác định mật độ vi khuẩn thực tế của dịch vi khuẩn gốc dựa vào công thức:

$Mi (\text{CFU/ml}) = Ai \times Di/V$. Trong đó: Ai : Số khuẩn lạc trung bình/nồng độ; Di : là độ pha loãng; V : là dung tích huyền phù tế bào cho vào đĩa của mỗi nồng độ (mL).

Dịch vi khuẩn gốc còn lại được ly tâm với tốc độ 6000 vòng/phút trong 10 phút trên máy ly tâm lạnh (4°C), rửa trong nước muối sinh lý 0,85% và tạo dịch huyền phù để cảm nhiễm. Dịch vi khuẩn gốc được xác định là $4,8 \times 10^9$ CFU/mL được pha loãng 100 lần để được nồng độ gây chết 50% (LD_{50}) tương ứng $4,8 \times 10^7$ CFU/mL. Liều LD_{50} được tham khảo theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Mai và cs. (2021) và điều chỉnh theo cỡ cá của thí nghiệm này. Cá chép được tiêm với lượng 0,1 mL dung dịch vi khuẩn (10 con/nghiệm thức) với liều LD_{50} ($4,8 \times 10^7$ CFU/mL), lô đối chứng được tiêm với nước muối sinh lý. Theo OECD (2019), các nghiệm thức có thể không cần lặp lại, do đó, thí nghiệm lặp lại một lần cho mỗi nghiệm thức (tổng số 4 nghiệm thức). Nước trong các bể được cách ly hoàn toàn với nhau. Số lượng cá chết được theo dõi hàng ngày trong vòng 14 ngày. Nhiệt độ nước được đo hàng ngày với tần suất 1 lần/ngày. Cá mới chết sau cảm nhiễm ở các lô thí nghiệm được kiểm tra, mổ khám để xác định các dấu hiệu bệnh lý và lấy mẫu (thận và gan) để nhuộm gram.

2.5. Thu thập và xử lý số liệu

Cuối thí nghiệm, số cá còn lại trong mỗi bể nuôi được xác định để tính toán tỉ lệ sống của cá. Khối lượng của cá và lượng thức ăn cá tiêu thụ được sử dụng để xác định tốc độ tăng trưởng và khả năng sử dụng thức ăn của cá. Các chỉ tiêu nội tạng cũng được tính toán.

Các chỉ tiêu theo dõi được tính toán như sau:

Tốc độ tăng trưởng theo ngày (DWG, g/con/ngày) = $(\text{FBW} - \text{IBW})/T$

Tốc độ tăng trưởng đặc trưng (SGR, %/con/ngày) = $100 \times (\ln(\text{FBW}) - \ln(\text{IBW}))/T$

Trong đó FBW, IBW là khối lượng cá khi bắt đầu và kết thúc thí nghiệm, T là số ngày thí nghiệm

Hệ số chuyển đổi thức ăn (FCR) = Khối lượng thức ăn đã sử dụng/Khối lượng cá tăng trọng

Hiệu quả sử dụng protein (PER) = Tăng trọng cá/Protein cá ăn vào

Tỉ lệ sống (%) = $100 \times \text{Số lượng cá cuối thí nghiệm}/\text{Số cá thả ban đầu}$

Tăng trọng (WG, %) = $100 \times (\text{Khối lượng cá kết thúc thí nghiệm} - \text{Khối lượng cá bắt đầu thí nghiệm})/\text{Khối lượng bắt đầu thí nghiệm}$

Chỉ số ruột (GSI, %) = $100 \times (\text{Khối lượng ruột}/\text{Khối lượng cơ thể cá})$

Chỉ số nội tạng (VSI, %) = $100 \times (\text{Khối lượng nội tạng cá}/\text{Khối lượng cơ thể})$

Chỉ số gan (HSI, %) = $100 \times (\text{Khối lượng gan}/\text{Khối lượng cơ thể cá})$

Chiều dài ruột tương đối (%) = $100 \times$

(Chiều dài của ruột/chiều dài của cơ thể)

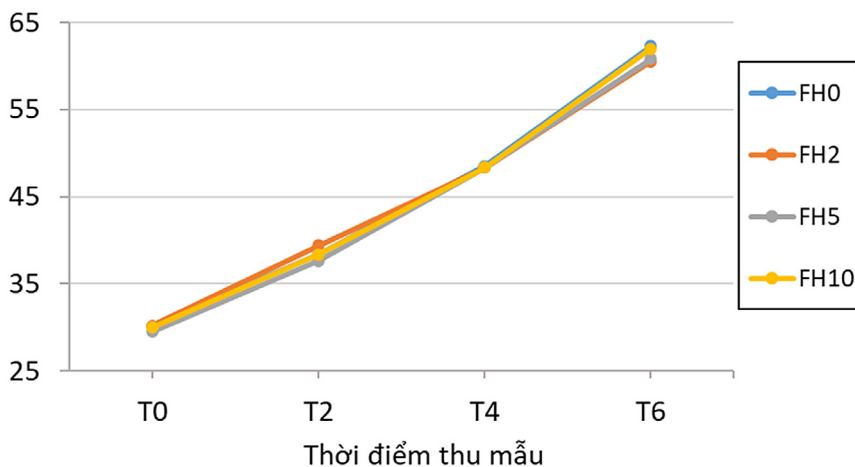
Số liệu được biểu diễn dưới dạng trung bình $\pm$ SD, được xử lý bằng phần mềm STATISTICA 10.0, sử dụng phương pháp phân tích ANOVA một nhân tố và công cụ LSD để so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức với mức $P < 0,05$. Trong đó, số lượng bể nuôi ($n=3$) được coi là số lần lặp lại.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tăng trưởng, sử dụng thức ăn và tỉ lệ sống của cá thí nghiệm

Khối lượng trung bình của cá được theo dõi định kì 2 tuần một lần và kết quả được trình bày ở hình 1. Khi bắt đầu thí nghiệm, khối lượng của trung bình của cá khoảng 30,16 g/con và không sai khác giữa cá lô thí nghiệm. Sau 6 tuần nuôi, khối lượng của cá tăng lên 61,95 g/con và cũng không có sự sai khác giữa các lô thí nghiệm ($P > 0,05$). Cá tăng trưởng khá đồng đều ở các thời điểm theo dõi và trung bình tăng khoảng 10g sau mỗi 2 tuần nuôi.

KLTB cá cuối thí nghiệm (g/con)



Hình 1. Khối lượng trung bình của cá sau 2, 4 và 6 tuần thí nghiệm

Ghi chú: FH0, FH2, FH5, FH10 là công thức thí nghiệm bổ sung 0, 2, 5 và 10g thảo dược lên men/kg thức ăn

Khi quan sát các giá trị về tăng trưởng bao gồm tăng trưởng tuyệt đối (DWG), tăng trưởng đặc trưng (SGR) và tăng trọng (WG) được trình bày trong bảng 1, không có sự sai

khác được ghi nhận giữa các công thức thí nghiệm được ghi nhận ($P > 0,05$). Sau 6 tuần nuôi với thức ăn thí nghiệm, khối lượng cá tăng ~2 lần (WG dao động từ khoảng 100

đến 106%), từ khoảng 30g/con lên ~60g/con. Tăng trưởng đồng đều giữa các nghiệm thức, trong đó DWG dao động từ 0,72-0,76 g/con/ngày; SGR từ 1,66-1,73 %/ngày. Sự tương đồng về tăng trưởng giữa các nghiệm thức

cho thấy thảo dược lên men bổ sung trong thức ăn ở các tỉ lệ thử nghiệm (0, 2, 5 và 10g/kg thức ăn) không có gây ảnh hưởng tiêu cực cũng như không cải thiện tăng trưởng của cá chép.

Bảng 1. Chỉ tiêu tăng trưởng của cá thí nghiệm sau 6 tuần nuôi

Chỉ tiêu	Công thức thí nghiệm			
	FH0	FH2	FH5	FH10
IBW (g/con)	30,18±0,10 ^a	30,16±0,12 ^a	29,50±0,03 ^a	30,04±0,57 ^a
FBW (g/con)	62,29±1,17 ^a	60,49±0,37 ^a	60,79±1,73 ^a	61,95±3,22 ^a
WG (%)	106,43±3,20 ^a	100,55±2,03 ^a	106,06±5,48 ^a	106,38±14,65 ^a
SGR (%/ngày)	1,73±0,04 ^a	1,66±0,02 ^a	1,72±0,08 ^a	1,72±1,15 ^a
DWG (g/con/ngày)	0,76±0,03 ^a	0,72±0,01 ^a	0,75±0,04 ^a	0,76±0,09 ^a

Ghi chú: FH0, FH2, FH5, FH10: thức ăn thí nghiệm có bổ sung thảo dược lên men ở các tỉ lệ 0, 2, 5, 10g/kg thức ăn; IBW: khối lượng khi bắt đầu thí nghiệm, FBW: khối lượng khi kết thúc thí nghiệm, WG: tăng trọng, SGR: tăng trưởng đặc trưng theo ngày, DWG: tăng trưởng theo ngày. Số liệu được trình bày dưới dạng TB±SD, các giá trị có kí hiệu chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P<0.05$).

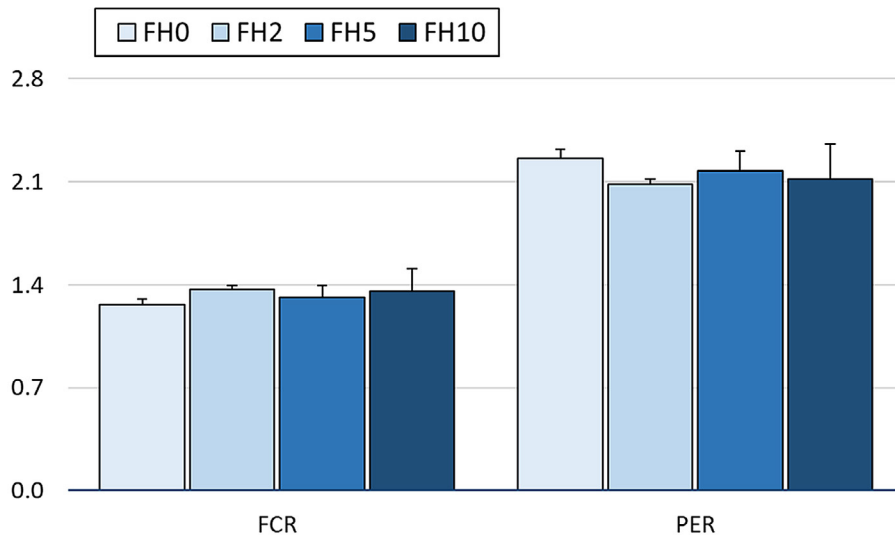
Thảo dược có thể có độc tính nhất định đến sinh vật và luôn có các thí nghiệm xác định độc tính của thảo dược trước khi đưa vào sử dụng (Anywar và cs., 2021; Mugale và cs., 2024). Hỗn hợp thảo dược sử dụng trong thí nghiệm này bao gồm hoàng kỳ, cam thảo và ngũ gia bì đều có độc tính nhất định và gây cản trở sự thèm ăn bên cạnh các hoạt tính sinh học (Saleem và cs., 2024; Zaki và cs., 2012). Việc sử dụng lợi khuẩn lên men thảo dược có thể giúp phân giải các độc tố và các chất kháng dinh dưỡng trong thảo dược, do đó, tốc độ tăng trưởng của cá trong thí nghiệm này không bị ảnh hưởng tiêu cực khi sử dụng chế phẩm. Một nghiên cứu trước đây đã chỉ ra hỗn hợp hoàng kỳ *Astragalus membranaceus* và cam thảo *Glycyrrhiza uralensis* được lên men bằng *Bacillus subtilis* bổ sung trong thức ăn có cải thiện tăng trưởng của cá tráp đen *Acanthopagrus schlegelii* (Huayue và cs., 2022) và cá rô phi vằn (Fujaya và cs., 2023). Thử nghiệm của Ilham và cs. (2024) trên tôm sú và Zhuo và cs. (2021) trên cá chêm *Lates calcarifer* lại cho thấy, thảo dược lên men lại không cải

thiện tăng trưởng. Trong nghiên cứu hiện tại, không có sự khác biệt đáng kể nào về mục tiêu tăng trưởng.

Hệ số chuyển đổi thức ăn (FCR) của cá với thức ăn thí nghiệm sau 6 tuần nuôi ở không có sự chênh lệch giữa các nghiệm thức ($P>0,05$) và dao động trong khoảng 1,31 đến 1,37 (Hình 2). Tương tự, hệ số thu nhận protein (PER) cũng không bị ảnh hưởng bởi tỉ lệ bổ sung thảo dược lên men. Việc sử dụng thảo dược có thể gây ảnh hưởng đến khả năng tiêu hoá của động vật thuỷ sản (Mbokane & Moyo, 2022). Các yếu tố kháng dinh dưỡng có trong thảo dược như tannin, phenol, saponin, lignin và alkaloid liên kết với các enzyme tiêu hóa và làm giảm khả năng tiêu hóa và khả năng cung cấp chất dinh dưỡng (Francis và cs., 2001). Một số loại thực vật có hàm lượng chất ức chế enzyme protease cao, có thể dẫn đến tình trạng thiếu hụt chất dinh dưỡng và hiệu suất tăng trưởng kém ở cá. Lượng chất kháng dinh dưỡng quá mức tìm thấy trong một số loại thực vật cũng có thể ảnh hưởng đến hình thái ruột và quần thể lợi khuẩn đường ruột. Việc lên men thảo

được có tác dụng phân huỷ các chất kháng dinh dưỡng và không bị ảnh hưởng đến khả năng sử dụng thức ăn ở cá. Trong nghiên

cứu này, kết quả cho thấy thảo dược lên men bổ sung ở tỉ lệ cao nhất cùng không có ảnh hưởng tiêu cực nào đến chỉ tiêu FCR và PER.



Hình 2. Hệ số chuyển hoá thức ăn (FCR) và hệ số thu nhận protein (PER) ở cá chép sử dụng thức ăn bổ sung thảo dược lên men sau 6 tuần nuôi

3.2. Chỉ tiêu nội tạng

Kết thúc thí nghiệm nuôi, các chỉ tiêu nội tạng như VSI, HSI, GSI được tính toán dựa trên khối lượng nội tạng, gan, ruột và khối lượng thân cá thí nghiệm. Kết quả cho thấy các chỉ tiêu VSI (dao động từ 6,43 đến 7,26%) và GSI (từ 3,41 đến 4,06) không bị ảnh hưởng bởi thảo dược lên men bổ sung

trong thức ăn (Bảng 2, $P > 0,05$). Kết quả này tương tự với nghiên cứu trên cá rô miệng rộng (*Micropterus salmoides*) được cho ăn thảo dược lên men trong 56 ngày cũng kết luận việc bổ sung thảo dược lên men trong thức ăn không có ảnh hưởng đến VSI của cá thí nghiệm (Jiang và cs., 2023).

Bảng 2. Chỉ tiêu nội tạng của cá thí nghiệm sau sáu tuần nuôi

Chỉ tiêu	Công thức thí nghiệm			
	FH0	FH2	FH5	FH10
VSI (%)	6,76±1,26	7,26±0,68	6,43±0,56	6,88±0,26
HSI (%)	1,52±0,49 ^a	2,15±0,22 ^{ab}	1,75±0,40 ^{ab}	2,15±0,18 ^b
GSI (%)	3,89±0,43	4,06±0,50	3,41±0,40	3,64±0,18
Chiều dài ruột tương đối (%)	151,27±18,30 ^b	147,06±6,89 ^{ab}	142,06±16,39 ^{ab}	129,04±7,90 ^a

Ghi chú: FH0, FH2, FH5, FH10: thức ăn thí nghiệm có bổ sung thảo dược lên men ở các tỉ lệ 0, 2, 5, 10g/kg thức ăn; VSI: Chỉ số nội tạng, HSI: Chỉ số gan, GSI: Chỉ số ruột

Sự sai khác có ý nghĩa thống kê được quan sát thấy ở chỉ tiêu HSI và chiều dài ruột

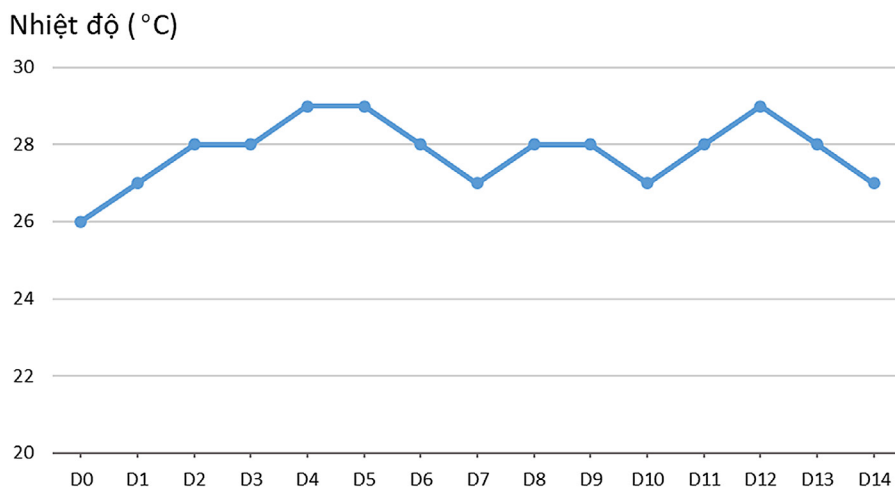
tương đối ($P < 0,05$). Theo đó, khối lượng gan tương đối ở lô FH10 (2,15%) cao hơn lô đối

chúng không bổ sung thảo dược lên men FH0 (1,52%), trong khi đó, FH2 và FH5 không thấy có sự khác biệt về khối lượng gan tương đối so với lô đối chứng. Điều này chứng tỏ khi bổ sung thảo dược lên men với tỉ lệ 10g/kg thức ăn gây ra hiện tượng tăng kích thước của gan cá chép. Ngược lại, thức ăn FH10 lại gây ra hiện tượng chiều dài ruột ngắn hơn (129,04%) so với FH0 (151,27%) ($P < 0,05$). Kết quả này cũng cho thấy những biến đổi bất thường về hình thái ruột của cá sử dụng thức ăn bổ sung thảo dược lên men ở tỉ lệ 10g/kg thức ăn. Các lô cá FH2 và FH5 không tìm thấy sự khác biệt nào về hai chỉ tiêu này so với đối chứng. Các nghiên cứu trước kia cũng đã chỉ ra việc sử dụng thảo dược ở liều lượng bổ sung lớn có thể gây những biến đổi tiêu cực đến các cơ quan nội tạng (Zhou và cs., 2022). Một trong những nguyên nhân chủ yếu là thảo dược có thể làm biến đổi quần thể vi sinh vật đường ruột trong đó có lợi khuẩn và ảnh hưởng xấu đến hoạt động của đường ruột. Một nguyên nhân khác là thảo dược có

thể có độc tính và trong trường hợp này gan của cá sử dụng thảo dược phải hoạt động quá mức để đào thải độc tố trong thảo dược. Ở mức bổ sung 2 và 5 g/kg thức ăn không thấy có ảnh hưởng nào được ghi nhận.

3.3. Tỉ lệ sống và khả năng kháng bệnh

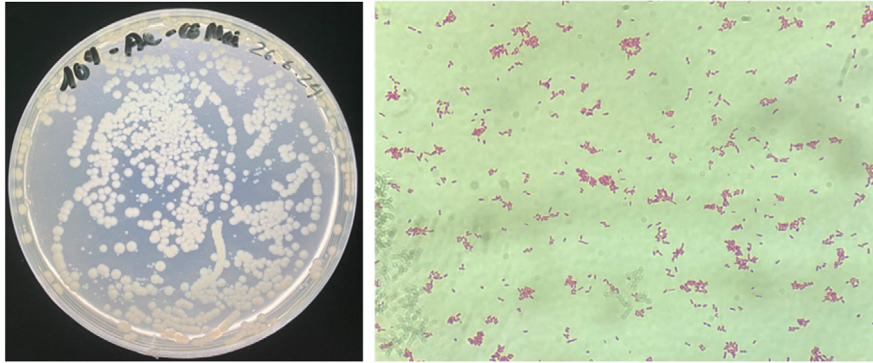
Kết thúc thí nghiệm nuôi tăng trưởng sau 6 tuần, tỉ lệ sống của cá là 100% thể hiện điều kiện nuôi được duy trì tốt và không có ảnh hưởng của chế phẩm bổ sung trong thức ăn. Trong thời gian cảm nhiễm, nhiệt độ nước dao động từ 26°C đến 29°C, trung bình đạt $28,2 \pm 0,8^\circ\text{C}$. Mức nhiệt độ này là mức nhiệt độ thích hợp cho vi khuẩn *A. veronii* phát triển và cũng là mức nhiệt độ phù hợp với các hoạt động sinh lý của cá chép, do đó, môi trường nuôi đảm bảo cho các yếu tố thí nghiệm được theo dõi chính xác. Yếu tố nhiệt độ trong thí nghiệm cảm nhiễm tương đồng với nghiên cứu khả năng gây độc và liều lượng vi khuẩn gây chết 50% của vi khuẩn *Aeromonas veronii* ($2,1 \times 10^7$ CFU/mL) trên cá chép của Nguyễn Thị Mai và cs. (2021).



Hình 3. Nhiệt độ nước trong thời gian cảm nhiễm

Sau 24h nuôi cấy dịch vi khuẩn pha loãng 100.000 lần trên đĩa thạch ở 28°C, số lượng khuẩn lạc đếm được là 960 khuẩn lạc/đĩa, thay vào công thức ta tính được mật độ vi khuẩn thực tế là $4,8 \times 10^9$ CFU/mL. Khi soi tươi, vi khuẩn có dạng hình que, là vi khuẩn

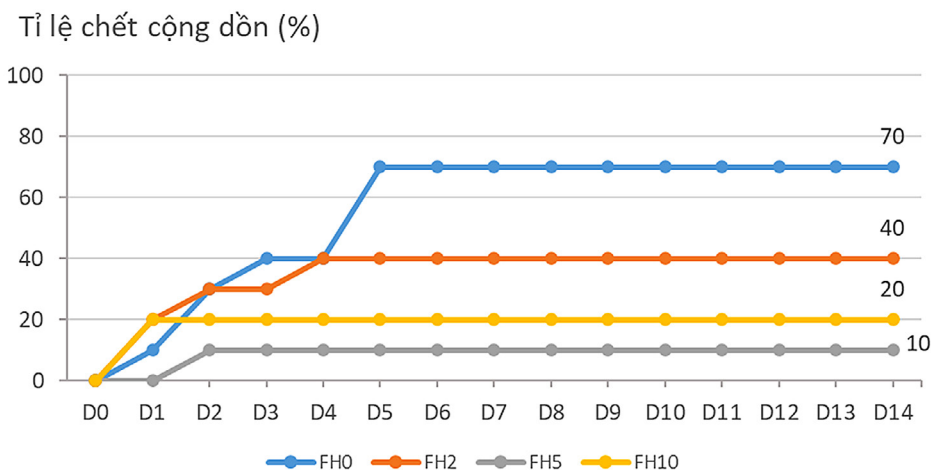
gram âm, bắt màu thuốc nhuộm màu hồng đỏ. Những mô tả này của vi khuẩn *A. veronii* tương đồng với những báo cáo trước đây (Vũ Thị Thanh Hương và cs., 2023; Nguyễn Thị Mai và cs., 2021).



Hình 4. Khuẩn lạc ở nồng độ 10^4 CFU/mL và vi khuẩn nhuộm gram

Sau 14 ngày cảm nhiễm cá chép với vi khuẩn *A. veronii*, kết quả về tỉ lệ chết của cá được trình bày ở hình 5. Cá cảm nhiễm bị chết tập trung chủ yếu trong vòng 1 đến 5 ngày. Cá ở lô đối chứng không quan sát thấy hiện tượng cá chết trong thời gian cảm nhiễm. Ngày thứ nhất sau khi cảm nhiễm, nhóm FH5 không thấy cá chết còn ở FH2 và FH10 có tỷ lệ chết là 20%, ở FH0 là 10%. Ngày thứ 2, lô cá FH10 không thấy hiện tượng chết; F5 bắt đầu xuất hiện cá chết, FH0 và FH2 vẫn tiếp tục xuất hiện cá chết. Từ ngày thứ 4, không còn quan sát thấy cá chết ở các nghiệm thức F2, F5 và F10; trong khi đó, cá vẫn tiếp

tục chết đến hết ngày thứ 5 ở lô cá FH0. Sau 14 ngày, tỷ lệ chết tích lũy của nhóm F0 (70%) cao hơn so với các nghiệm thức sử dụng thức ăn bổ sung thảo dược lên men. Tỷ lệ chết cộng dồn ở FH2, FH5 và FH10, lần lượt là 40, 10 và 20%. Từ kết quả này cho thấy thảo dược lên men bổ sung trong thức ăn của cá chép có ảnh hưởng tích cực đến khả năng kháng *A. veronii* của cá chép; trong đó tỷ lệ chết thấp nhất quan sát được ở nhóm FH5 cho thấy tỷ lệ bổ sung 5g thảo dược lên men trong 1kg thức ăn cho hiệu quả tối ưu về khả năng kháng vi khuẩn *A. veronii*.



Hình 5. Tỉ lệ chết cộng dồn của cá thí nghiệm được cảm nhiễm với vi khuẩn *A. veronii* sau 14 ngày

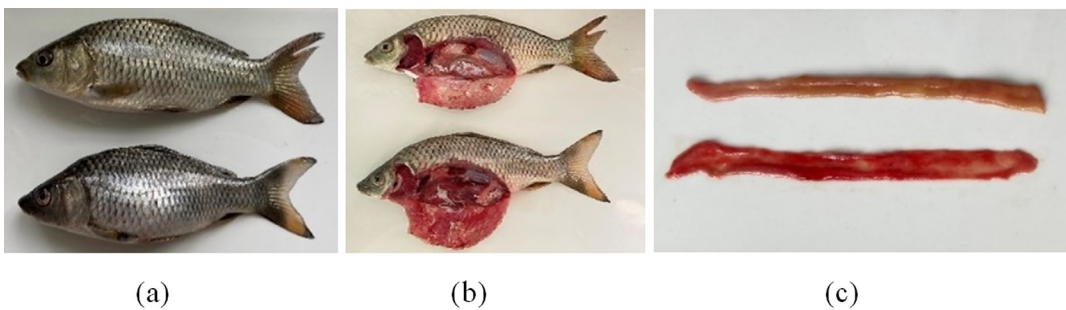
Kết quả trong nghiên cứu này tương đương với kết quả được báo cáo trong nghiên cứu của Jiang và cs. (2023) khi cảm nhiễm cá rô miệng rộng sau khi cho ăn thức ăn bổ sung thảo dược lên men với vi khuẩn *A. hydrophila*. Sau

72h cảm nhiễm, tỉ lệ chết cộng dồn cũng thu được cao nhất ở lô đối chứng không bổ sung thảo dược. Kết quả này được giải thích do các hoạt chất trong thảo dược lên men có khả năng kháng khuẩn và hỗ trợ trạng thái miễn dịch

của cá khi cảm nhiễm. Ngoài ra, các chủng lợi khuẩn sử dụng để lên men thảo dược cũng được báo cáo là các chủng vi sinh vật có khả năng ức chế hoạt động của vi khuẩn gây bệnh. Thêm vào đó, một số báo cáo đã chứng minh rằng việc lên men thảo dược làm các hợp chất có hoạt chất sinh học có khả năng giải phóng tối ưu so với các phương pháp tách chiết thông thường. Các lập luận này cũng là cơ sở để giải thích tỉ lệ chết ở các lô cá sử dụng thảo dược lên men thấp hơn so với đối chứng. Meng và cs. (2023) cũng báo cáo cá sử dụng thức ăn có bổ sung thảo dược lên men cũng có đáp ứng

miễn dịch cao hơn so với đối chứng.

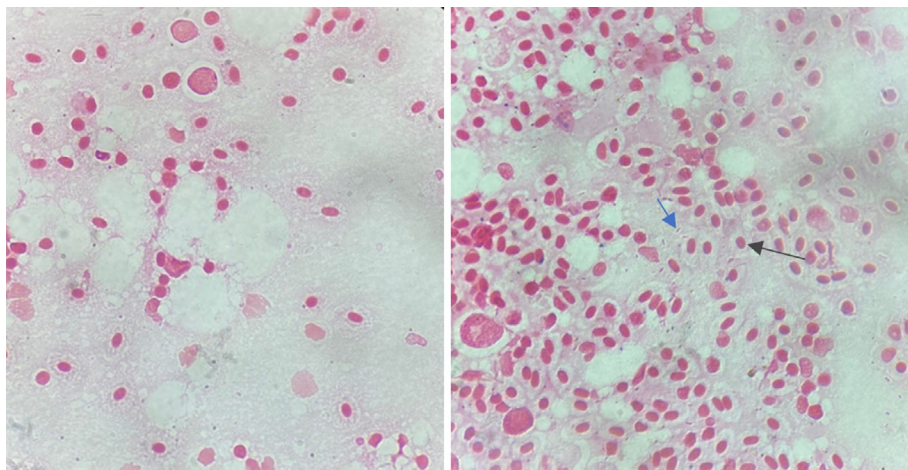
Sau khi cảm nhiễm, cá mới chết được thu mẫu nhuộm gram để định danh vi khuẩn và mô tả các biểu hiện bệnh lý do vi khuẩn *A. veronii* gây ra. Hình ảnh giải phẫu cá được thể hiện trong hình 5. Cá bị bệnh có biểu hiện bụng chướng, sung đỏ, xuất huyết da gốc vây, hậu môn. Các cơ quan nội tạng như gan và lách cá có màu sắc tái nhạt, ruột trương to và xuất huyết. Các đặc điểm này tương đồng với mô tả trong nghiên cứu của các nghiên cứu trước kia trên vi khuẩn *A. veronii*.



Hình 5. Hình thái ngoài (a), giải phẫu (b) và ruột (c) của cá đối chứng (phía trên) và cảm nhiễm với vi khuẩn *A. veronii* (phía dưới)

Mẫu thận của cá chết sau cảm nhiễm được nhuộm gram và soi dưới kính hiển vi như hình 6. Hình ảnh mẫu thận cá đối chứng thấy được hồng cầu và bạch cầu. Hình ảnh mẫu thận cá cảm nhiễm sau khi soi thấy được vi khuẩn *A. veronii* bắt màu thuốc nhuộm màu hồng đỏ,

số lượng hồng cầu gia tăng đáng kể so với cá đối chứng. Các đặc điểm này tương đồng với mô tả trong nghiên cứu của các nghiên cứu trước kia (Vũ Thị Thanh Hương và cs., 2023; Nguyễn Thị Mai và cs., 2021) trên vi khuẩn *A. veronii*.



Hình 6. Hình ảnh nhuộm gram mẫu thận cá cảm nhiễm (bên phải) và cá đối chứng (bên trái) (Mũi tên màu xanh chỉ vi khuẩn, mũi tên màu đen chỉ tế bào trong thận)

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Thảo dược lên men được bổ sung vào thức ăn với các tỉ lệ 2, 5, 10g/kg thức ăn không ảnh hưởng đến sự tăng trưởng, tỉ lệ sống và khả năng sử dụng thức ăn của cá chép. Thảo dược lên men bổ sung ở tỉ lệ 10g/kg thức ăn gây ra một số biến đổi về kích thước gan và chiều dài ruột của cá. Thảo dược lên men được bổ sung vào thức ăn có tác dụng nâng cao khả năng kháng *A. veronii*

ở cá chép và tỉ lệ tối ưu là 5g/kg thức ăn.

Lời cảm ơn

Đề tài xin được gửi lời cảm ơn chân thành tới công ty Syrmabio (Trung Quốc) đã cung cấp sản phẩm thử nghiệm trong nghiên cứu này. Đề tài được thực hiện với nguồn kinh phí từ đề tài: “Đánh giá tác động của thảo dược lên men bổ sung trong thức ăn lên tăng trưởng và khả năng kháng bệnh trên cá chép - Mã số T2025VB-13-12”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vũ Thị Thanh Hương, Trương Đình Hoài và Nguyễn Thị Mai (2023). Khả năng gây độc và liều vi khuẩn gây chết 50% trên cá tra của vi khuẩn *Aeromonas veronii*. Tạp Chí Khoa Học Đại Học Hạ Long, 09, 108–113.
2. Nguyễn Thị Mai, Đỗ Thị Ngọc Anh, Trương Đình Hoài và Trần Thị Năng Thu (2021). Nghiên cứu khả năng gây độc và liều lượng vi khuẩn gây chết 50% của vi khuẩn *Aeromonas veronii* trên cá chép (*Cyprinus carpio*). Tạp chí Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn, Tr. 244–250.
3. Anywar G., Kakudidi E., Byamukama R., Mukonzo J., Schubert A., Oryem-Origa H., and Jassoy C. (2021), “A review of the toxicity and phytochemistry of medicinal plant species used by herbalists in treating people living with HIV/AIDS in Uganda”, *Frontiers in Pharmacology*, 12(April), pp. 1–10. DOI: 10.3389/fphar.2021.615147.
4. Francis G., Makkar H. P. S., and Becker K. (2001), “Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish”, *Aquaculture*, 199 (3–4), DOI: 10.1016/S0044-8486(01)00526-9.
5. Fujaya Y., Hidayani A. A., Sari D. K., Aslamyiah S., Rukminasari N., Muthalib A., Cristianto S., Defist E., Fazhan H., and Waiho K. (2023), “The optimal dosage of fermented herbal extract on growth and feed efficiency of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)”, *Tropical Life Sciences Research*, 34(2), pp. 39–56, DOI: 10.21315/tlsr2023.34.2.3.
6. Huayue N., Liang Q., and Xiaohui X. (2022), “Effects of a probiotic-fermented herbal medicines mixture on the growth performance, immune and antioxidative function of *Acanthopagrus schlegelii*”, *Research Square*, pp. 1–20, <https://www.researchsquare.com/article/rs-1714834/latest.pdf>.
7. Ilham I., Sucipto S., and Fujaya Y. (2024), “Effects of fermented herbal extract as a phytobiotic on growth indices, moulting performance, and feed utilization of juvenile tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabr.)”, *Fishes*, 9(9), pp. 352, DOI: 10.3390/fishes9090352.
8. Jiang L., Zhou X., Bao S., Wu Q., Li J., Wang Y., and Liu B. (2023), “The consumption of fermented Chinese herbs has resulted in better intestinal health and increased resistance to *Aeromonas hydrophila* in juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*)”, *Frontiers in Marine Science*, 10(May), pp. 1–12, DOI: 10.3389/fmars.2023.1199910.
9. Li L., Wang L., Fan W., Jiang Y., Zhang C., Li J., Peng W., and Wu C. (2020) “The application of fermentation technology in traditional Chinese medicine: a review”, *American journal of Chinese medicine*, 48(4), pp. 899–921, DOI: 10.1142/S0192415X20500433.
10. Mavraganis, T., Constantina, C., Kolygas, M., Vidalis, K., & Nathanailides, C. (2020). Environmental issues of aquaculture development. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 24(2), 441–450. <https://doi.org/10.21608/EJABF.2020.85857>

11. Mbokane E. M., and Moyo N. A. G. (2022), “Use of medicinal plants as feed additives in the diets of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and the African Sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) in Southern Africa”, *Frontiers in Veterinary Science*, 9. DOI: 10.3389/fvets.2022.1072369.
12. Meng X., Cai H., Li H., You F., Jiang A., Hu W., Li K., Zhang X., Zhang Y., Chang X., Yang G., and Zhou Z. (2023), “Clostridium butyricum-fermented Chinese herbal medicine enhances the immunity by modulating the intestinal microflora of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)”, *Aquaculture*, 562, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2022.738768.
13. Mugale M. N., Dev K., More B. S., Mishra V. S., Washimkar K. R., Singh K., Maurya R., Rath S. K., Chattopadhyay D., and Chattopadhyay N. (2024), “A comprehensive review on preclinical safety and toxicity of medicinal plants” *Clinical Complementary Medicine and Pharmacology*, 4(1), 100129, DOI: 10.1016/j.ccmp.2024.100129.
14. Nguyen, T. M., Thi, T. H. V., Van, S. V., Hich, T. V., & Le, H. V. (2024). Influence of a peptidoglycan-enriched diet on growth performance, feed utilization and immune response in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Fisheries and Aquatic Sciences*, 27(9), 572–579. <https://doi.org/10.47853/FAS.2024.e54>
15. OECD. (2019). *Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test*. 203, 24. DOI: 10.1787/9789264069961-en
16. Saleem M., Hussain S. M., Ali S., Rizwan M., Al-Ghanim K. A., and Yong, J. W. H. (2024), “Effects of the medicinal plant, *Tamarindus indica*, as a potential supplement, on growth, nutrient digestibility, body composition and hematological indices of *Cyprinus carpio* fingerlings”, *Heliyon*, 10(13), e33901, DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e33901.
17. Zaki M. A., Labib E. M., Nour A. M., Tonsy H. D., and Mahmoud S. H. (2012), “Effect some medicinal plants diets on mono sex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), growth performance, feed utilization and physiological parameters” *APCBEE Procedia*, 4(11), pp. 220–227, DOI: 10.1016/j.apcb.2012.11.037.
18. Zhou X., Wang Y., Yu J., Li J., Wu Q., Bao S., Jiang L., and Liu B. (2022), “Effects of dietary fermented Chinese herbal medicines on growth performance, digestive enzyme activity, liver antioxidant capacity, and intestinal inflammatory gene expression of juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*)”, *Aquaculture Reports*, 25(June), 101269, DOI: 10.1016/j.aqrep.2022.101269.
19. Zhuo L. C., Abang Zamhari D. N. J. B., Yong A. S. K., Shapawi R., and Lin Y. H. (2021), “Effects of fermented lemon peel supplementation in diet on growth, immune responses, and intestinal morphology of Asian sea bass, *Lates calcarifer*”, *Aquaculture Reports*, 21, 100801., DOI: 10.1016/j.aqrep.2021.100801.