

**BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG DIỆT KHUẨN  
CỦA TỎI (*Allium sativum* L.) TRONG ĐIỀU TRỊ BỆNH DO *Aeromonas  
hydrophila* TRÊN ẾCH THÁI LAN (*Rana tigerina*)**

**PRELIMINARY STUDY ON ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF GARLIC (*Allium sativum*  
L.) FOR THE TREATMENT OF *Aeromonas hydrophila* DISEASE IN THAI FROG  
(*Rana tigerina*)**

Trần Hồng Thủy, Nguyễn Trung Tính\*, Trần Ngọc Thiên Kim, Nguyễn Thành Nhân  
Khoa Thủy Sản, Trường ĐH Nông Lâm Tp.HCM  
Email:[ngtrungtinhts35@gmail.com](mailto:ngtrungtinhts35@gmail.com)

**ABSTRACT**

The study was carried out to determine the antibacterial activity of garlic (*Allium sativum* L.) of treatment effect on the frog disease caused by *Aeromonas hydrophila*. The results showed that *Aeromonas hydrophila* was highly sensitive with garlic (14.43 – 17.75mm zone inhibition). Frog were fed with commercial diet supplemented with 0g garlic/kg, 30g garlic/kg feed, 40g garlic/kg feed. The survival rate was 60%, 86.7% and 82.2% for 0g/kg, 30g/kg, 40g/kg, respectively. There were significantly different between the treatments supplemented 0g/kg and 30g/kg. No significant difference between treatments supplemented 0g/kg and 40g/kg, however the survival rate of 40g/kg treatment was higher than that of 0g/kg treatment. The RPS (Relative Percent Survival) was 66.7% and 55.7% for 30g/kg, 40g/kg, respectively. The results indicated that garlic can be used to treat the disease caused by *Aeromonas hydrophila* on Thai frog.

**Key words:** *Rana tigerina*, garlic, antibacterial effects

**ĐẶT VẤN ĐỀ**

Nghề nuôi ếch Thái Lan (*Rana tigerina*) đã bắt đầu từ những thập niên 80 tại Thái Lan (Putsatee và ctv, 1995). Năm 2001 – 2002, ếch Thái Lan (*Rana tigerina*) được nuôi thử nghiệm ở ĐH Nông Lâm Tp.HCM, và sau đó phát triển mạnh ở các tỉnh ĐBSCL vào năm 2005 (Báo SGGP, số ngày 19/8/2005). Thịt ếch được đánh giá là một nguồn protein ưu việt, có thể thay thế một số nguồn protein động vật khác (Omoniyi, L.O và ctv, 2012) và là đặc sản được tiêu thụ nhiều trong nước và có tiềm năng xuất khẩu ra nhiều thị trường như Mỹ, EU, Đài Loan,... (Lê Minh Quốc, 2012). Từ năm 2003 đến năm 2006, sản lượng đùi ếch xuất khẩu của Việt Nam đạt 2199 tấn, với giá trị hơn 11 triệu USD (Cơ sở dữ liệu thống kê thương mại hàng hóa của Liên hợp quốc năm 2010, <http://comtrade.un.org/db/>)

Song song với việc phát triển nuôi ếch ngày càng nhiều thì cũng kéo theo nhiều vấn đề như chất lượng ếch giống kém, môi trường suy thoái, tình hình dịch bệnh thường xuyên xảy ra, gây thiệt hại lớn về kinh tế cho người dân (Báo SGGP ngày 19/8/2005).

Trong số các bệnh thường gặp trên ếch Thái Lan (*Rana tigerina*) thì bệnh lở loét có tỷ lệ mắc bệnh cao (64,58%), ảnh hưởng đến nghề nuôi ếch (Trần Hồng Thủy, 2008). Điều đáng nói là việc điều trị các bệnh trên ếch, thường do người dân tự vận dụng kinh nghiệm bản thân. Hơn 50% hộ nuôi sử dụng kháng sinh để điều trị mà không có sự hướng dẫn của cơ quan chức năng (Trần Hồng Thủy, 2008), nên kết quả điều trị không cao, gây ra hiện tượng kháng thuốc của một số loài vi khuẩn, ảnh hưởng đến môi trường và tác động xấu đến sức khỏe của con người (J.Y Lee và ctv, 2012). Ngược lại với kháng sinh nhân tạo, theo Pleasant Grove (1995) thì tỏi được xem như là một loại kháng sinh tự nhiên, giảm nguy cơ ung thư, chất bổ trợ miễn dịch, có thể làm giảm Cholesterol trong máu,...mà không gây tác động xấu đến môi trường. Với ưu điểm như không độc, không tồn dư, dễ hòa tan (Chu Mạnh Thắng và ctv, 2009) nên ngày nay, việc ứng dụng tỏi trong nuôi trồng thủy sản ngày càng phổ biến (J.Y Lee và ctv, 2012).

Có rất nhiều nhà khoa học trên thế giới đã nghiên cứu về ảnh hưởng của tỏi trong việc phòng trị bệnh trên động vật thủy sản (Erol-Florian Garbor và ctv, 2010) và cũng có nhiều báo cáo ghi nhận rằng tỏi có thể loại bỏ hiệu quả các loài vi khuẩn chủ yếu trên nước ngọt bao gồm *Pseudomonas fluorescens*, *Myxococcus piscicola*, *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas punctata*, *Flexibacter intestinalis* và *Yersinia ruckeri* (J.Y Lee, 2012).

Xuất phát từ những thực tiễn trên, chúng tôi tiến hành đề tài nghiên cứu tác dụng diệt khuẩn của cây tỏi (*Allium sativum* L.) trong điều trị bệnh do vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* gây ra trên ếch Thái Lan (*Rana tigerina*) nhằm có những dữ liệu khoa học trong điều trị bệnh ếch.

Mục tiêu chính của đề tài

1. Tìm hiểu khả năng kháng khuẩn của tỏi với vi khuẩn *Aeromonas hydrophila*
2. Xác định liều lượng tỏi hợp lý để bổ sung vào thức ăn trong điều trị bệnh do *Aeromonas hydrophila* gây trên ếch Thái Lan (*Rana tigerina*)

## PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Đề tài được tiến hành thực hiện từ tháng 7/2012 đến tháng 1/2013 tại trại thực nghiệm Thủy Sản, khoa Thủy Sản, trường Đại học Nông Lâm Tp.HCM

### Đối tượng nghiên cứu

Ếch Thái Lan (*Rana tigerina*) có trọng lượng từ 45 – 50gr, được mua từ trại giống Dũng Hạnh ở xã Trung An, huyện Củ Chi, Tp.HCM

Vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* sử dụng trong thí nghiệm, được lấy từ trung tâm nghiên cứu Thủy Sản Novus International.

Tỏi ta (*Allium sativum* L.) được mua từ chợ Thủ Đức, quận Thủ Đức, Tp.HCM

### Phương pháp xử lý số liệu

Trong suốt quá trình thí nghiệm, tỷ lệ chết của tất cả các nghiệm thức sẽ được theo dõi và ghi nhận. Tỷ lệ bảo hộ tương đối sẽ được tính theo công thức của Amend (1981)

RPS (Relative Percent Survival) =

$$\left( 1 - \frac{\text{Tỷ lệ \% cá chết của nghiệm thức dùng thuốc}}{\text{Tỷ lệ \% cá chết của nghiệm thức đối chứng}} \right) \times 100$$

**Phương pháp tách chiết dịch tỏi:** Dịch tỏi dùng trong đề tài được tách chiết như sau:

Tỏi sau khi rửa sạch và tách vỏ được cho vào máy xay nhuyễn với tỷ lệ tỏi/nước cất là 40g/50ml. Thời gian xay là 2 – 5p cho tới khi tỏi được xay nhuyễn. Dung dịch vừa tạo xong được lọc qua giấy lọc Wattman để loại bỏ cặn bã và xơ. Dịch tỏi này được bảo quản trong tủ lạnh với nhiệt độ 4°C thời gian tối đa 30 ngày.

### Bố trí thí nghiệm

Đề tài được thực hiện với 3 thí nghiệm như sau

#### **Thí nghiệm 1. Khảo sát tính kháng khuẩn của tỏi với vi khuẩn *Aeromonas hydrophila***

Xác định tính kháng khuẩn của tỏi bằng phương pháp khuếch tán kháng sinh trên đĩa thạch (Kirby – Bauer, 1950), sử dụng môi trường TSA, với đĩa giấy tẩm dung dịch tỏi ở các nồng độ 20µl/đĩa; 30µl/đĩa; mỗi nồng độ lặp lại 10 lần. Thí nghiệm tương tự với thời gian trữ dịch tỏi trong 1 tháng ở 4°C.

## **Thí nghiệm 2. Thí nghiệm cảm nhiễm thăm dò**

Trước khi chính thức gây bệnh, thí nghiệm thăm dò được tiến hành, nhằm tìm nồng độ vi khuẩn gây nhiễm 50% - ID50 (Infectious bacteria dose 50%) (Reed & Muench, 1938).

Tiêm 0,5 mL huyền dịch vi khuẩn có nồng độ từ  $10^5$  –  $10^8$  cfu/ml vào cơ đùi của ếch khỏe mạnh. Theo dõi biểu hiện của ếch trong 14 ngày sau khi tiêm, thí nghiệm lặp lại 3 lần. Những con yếu, chết sẽ được giải phẫu để phân lập lại vi khuẩn.

Khi xác định được ID50 thì dùng nồng độ này để tiến hành gây nhiễm cho ếch thí nghiệm.

## **Thí nghiệm 3. Xác định liều lượng bổ sung dịch tỏi vào thức ăn để điều trị bệnh lở loét do *Aeromonas hydrophila* trên ếch**

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, với 5 nghiệm thức (NT), mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần

**NT1:** Tiêm 0,5mL huyền phù vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* vào cơ đùi của ếch. Sau 24h, cho ếch ăn thức ăn bình thường (không trộn tỏi) trong 14 ngày

**NT2:** Tiêm 0,5mL huyền phù vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* vào cơ đùi của ếch. Sau 24h, cho ếch ăn thức ăn có trộn 30gr tỏi trong 14 ngày

**NT3:** Tiêm 0,5mL huyền phù vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* vào cơ đùi của ếch. Sau 24h, cho ếch ăn thức ăn có trộn 40gr tỏi trong 14 ngày

**NT4:** Tiêm 0,5mL nước muối sinh lý vào cơ đùi của ếch. Sau 24h, cho ếch ăn thức ăn bình thường

**NT5:** Không gây nhiễm vi khuẩn cho ếch, cho ếch ăn với khẩu phần bình thường

Tỏi được nghiền nhuyễn và trộn vào thức ăn 10 phút trước khi cho ếch ăn. Mỗi ngày cho ếch ăn 3 lần (sáng 6h30; trưa 11h; chiều 14h30)

Môi trường thí nghiệm được kiểm soát tốt như nhau trong suốt quá trình thí nghiệm

## **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

### **Thí nghiệm 1. Khảo sát tính kháng khuẩn của tỏi với vi khuẩn *Aeromonas hydrophila***

**Bảng 1. Kết quả đường kính vòng vô khuẩn của tỏi với *Aeromonas hydrophila***

Nồng độ tỏi/đĩa giấy	Đường kính vòng vô khuẩn ngay sau khi chiết dịch tỏi	Đường kính vòng vô khuẩn sau khi bảo quản dịch tỏi 30 ngày ở 4°C
20µl	16.45	14.43
30µl	17.75	15.47

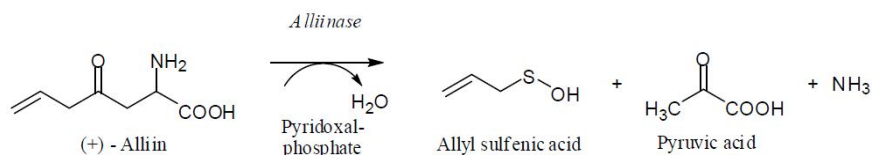
Kết quả ở Bảng 1 tương đồng với nghiên cứu của Shamsudin (2006) trên vi khuẩn *E. Coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* với đường kính vòng kháng khuẩn từ 13 – 24mm với dịch tỏi tươi. Một nghiên cứu khác của Zhang (2003) về nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của tỏi với 2 chủng *Aeromonas hydrophila* AH1 và AH2 lượt là 19,2 và 1,92mg/mL.

Arinee Chatchawanchonteera và ctv (2008) nghiên cứu về tác dụng kháng khuẩn của tỏi và lá ổi với *Aeromonas hydrophila* và *Streptococcus* spp. phân lập trên cá cho kết quả MIC lần lượt 2.64; 13.24 mg/mL đối với *Aeromonas hydrophila*. 17.58; 73.67mg/mL cho *Streptococcus* spp. Ở nghiên cứu này, chúng ta thấy rằng tỏi có tính kháng khuẩn rất cao so với lá ổi.

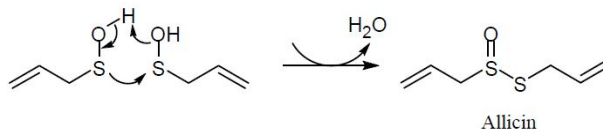
Tỏi có thể giúp cơ thể kiểm soát các tác nhân gây bệnh như vi khuẩn, nấm, gia tăng sức khỏe của cá (Corzo-Martinez et al, 2007). Những nghiên cứu trước đây gợi ý rằng chức năng chủ yếu của tỏi có được là do thành phần sinh học của tỏi chứa các hợp chất lưu huỳnh như allin, diallylsulphydes và allicin (Amagase et al, 1993; Heli Roy, 2005) hợp chất S – allyl cystine, là một loại hợp chất lưu huỳnh, không mùi, tan trong nước (Heli Roy, 2005). Kết quả ở Bảng

1 khẳng định lại lần nữa về khả năng kháng khuẩn của tỏi với vi khuẩn, đặc biệt là *Aeromonas hydrophila* so với những giả thuyết nêu trên.

Bản thân allin hiện diện trong tỏi không có chức năng kháng khuẩn, mà phải qua sự chuyển đổi bởi enzyme allinase và nước (Dušica P. Ilić, 2011) để thành allicine với tính chất kháng khuẩn cao. Nồng độ enzyme allinase trong tỏi tươi là rất lớn, chiếm đến 10% hàm lượng protein tổng số (10mg/g tỏi tươi) được chứa trong các khoang khác nhau của củ tỏi. Enzyme này được giải phóng ra khi củ tỏi bị dập hoặc nghiền nhuyễn (Peter Josling, 2005). Chính vì thế, việc để tỏi lâu ngày trong nhiệt độ lạnh, có thể làm mất đi một phần hoạt lực của enzyme allinase và allicine có trong dịch tỏi.



**Hình 1.** Sự chuyển đổi từ alliin thành allyl sulfenic acid (Nguồn: Stool & Seebeck, 1949)



**Hình 2.** Allyl sulfenic chuyển đổi thành Allicine (Nguồn: Stool & Seebeck, 1949)

Mặc khác, theo Peter Josling (2005), allicin có thể ức chế được enzyme vi khuẩn, như là một hệ thống acetyl-CoA-forming, bao gồm cả các acetate kinase và phosphotransacetyl-CoA synthetase. Sự ức chế không cộng hóa trị và thuận nghịch, <sup>14</sup>C acetate kết hợp vào các acid béo của plasmid vi khuẩn và được cô lập bởi allicine, dẫn tới tiêu diệt vi khuẩn.

### **Thí nghiệm 2. Thí nghiệm cảm nhiễm thăm dò**

Kết quả nồng độ ID<sub>50</sub> là 1,25.10<sup>6</sup> cfu/ml. Chinabut (1996) thực hiện thí nghiệm xác định LD50 trên 2 nhóm ếch có trọng lượng 25 – 30gr (nhóm 1) và 120 – 150gr (nhóm 2) với kết quả LD50 lần lượt là 4.01x10<sup>5</sup> và 8.49x10<sup>5</sup> cfu. Kết quả ID<sub>50</sub> cao là do tiến hành thí nghiệm này trong những tháng mùa lạnh (nhiệt độ phòng từ 29 – 31°C), có thể độc lực của vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* bị yếu đi. Thêm vào đó, cỡ ếch sử dụng trong thí nghiệm này từ 40 – 45gr nên ếch có sức khỏe tốt.

### **Thí nghiệm 3. Xác định liều lượng bổ sung dịch tỏi vào thức ăn để điều trị bệnh lở loét do *Aeromonas hydrophila* trên ếch**

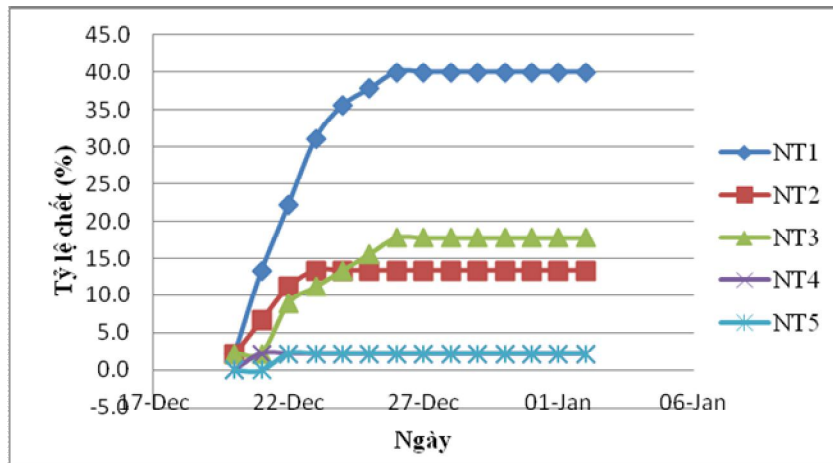
Sau 24h tiêm vi khuẩn, ếch có dấu hiệu mệt mỏi, bắt mồi chậm, bắt đầu có ếch chết. Ghi nhận từ giải phẫu cơ đùi ếch chết (bảy mẫu) thấy có tích dịch, xung huyết và hoại tử. Cấy vi khuẩn và phân lập lại cho ra *Aeromonas hydrophila*. Khi kết thúc thí nghiệm, tỷ lệ chết ở NT1 được ghi nhận là 40% so với NT2 (cho ăn 30gr tỏi/kg T.Ă) xuất hiện ếch chết ngày đầu tiên và kéo dài 4 ngày sau đó thì dừng chết với tỷ lệ 13.3% (Hình 4). Tương tự cho NT3, 7 ngày sau cảm nhiễm ếch ngưng chết, tỷ lệ chết 17.8% (Hình 4) cho đến khi kết thúc thí nghiệm.

Tỷ lệ chết giữa NT1 và NT2 sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê (P<0,05). Giữa NT1 và NT3 không có sự sai biệt về mặt thống kê, tuy nhiên tỷ lệ chết của NT3 ít hơn rất nhiều so với NT1.



**Hình 3. Ếch khi kết thúc thí nghiệm (a):NT1; (b): NT2; (c): NT3**

Năm 2009, Nya và Austin thực hiện thí nghiệm trên cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) cho kết quả tỷ lệ chết là 4% ở lô dùng 0.5 và 1g tỏi/100gr thức ăn. Một nghiên cứu khác của Nya và Austin (2011) về sự phát triển khả năng miễn dịch của cá hồi vân với *A. hydrophila* sau khi cho ăn tỏi 14 ngày cho tỷ lệ sống cao nhất là 88% so với 16% ở lô đối chứng. Kết quả của nghiên cứu này vừa củng cố quan điểm cho rằng tỏi có lợi cho sự kiểm soát *A. hydrophila* của cá và mở rộng các nghiên cứu trước đây bằng cách chứng minh tác dụng bộ nhớ miễn dịch lâu dài khi ngừng cho cá ăn thức ăn có trộn tỏi. Theo Block (1992) thì allicine (diallylthiosulfinate) là chất phổ biến nhất, chiếm khoảng 70% các hợp chất lưu huỳnh chứa trong tỏi nghiền. S-allyl cysteine hiện diện trong tỏi tươi, được xác định rằng nó có thể ức chế khối u và tăng cường miễn dịch (Sumiyoshi, 1997); Allyl sunfides giúp tăng cường hệ thống các enzyme glutathionine S-transferase thông qua con đường sinh hóa, ngoài ra còn thúc đẩy tế bào lympho, giải phóng cytokine, thực bào, và còn là tác nhân cho quá trình apoptosis (Kyo và ctv, 1998).



**Hình 4. Tỷ lệ chết của Ếch thí nghiệm**

Salah Mesahy Aly và ctv (2008) đã chỉ ra rằng, cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) sau khi cho ăn thức ăn có trộn tỏi ở nồng độ 10, 20g.kg<sup>-1</sup> thức ăn nuôi từ 1 – 2 tháng cho kết quả tăng trưởng và tỷ lệ sống cao hơn đáng kể lô đối chứng.

Giá trị RPS (%) được tính lần lượt cho NT2 và NT3 là 66,7% và 55.6%. Nya và Austin thí nghiệm trên cá hồi vân năm 2010 với chế phẩm Allimed® chứa Allicin chiết xuất từ tỏi cho giá trị RPS từ 90 – 100%. Điều này cho thấy rằng, trong điều kiện thí nghiệm, dịch tỏi tự chế có thể làm mất một phần hoạt tính của allinase do nhiệt độ, bởi sự chuyển hóa allicine phụ thuộc hoàn toàn vào allinase. Dušica P. Ilić (2011) cho r · ng, · nhi · t · phòng,



quá trình chuyển hóa allicine mất khoảng 10 – 15 phút. Điều kiện pH tối ưu cho hoạt động xúc tác của enzyme allinase là 6,5 trong khi nhiệt độ tối ưu là 33°C. Trong quá trình thực hiện thí nghiệm, vì vậy sự thích nghi nhiệt độ khoảng 50°C có thể đã làm mất đi một phần hoạt tính của enzyme allinase.

Tỷ lệ chết của Nghiệm thức 4 và Nghiệm thức 5 (Hình 4) là không đáng kể, chủ yếu là do tập tính cắn nhau của ếch.

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Từ những kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi nhận định Tỏi (*Allium sativum* L.) có khả năng kháng vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Cần có nhiều nghiên cứu sâu hơn về tác dụng của tỏi với một số loài động vật thủy sản và một số vi khuẩn khác, để từ đó có được lộ trình điều trị thích hợp cho một số bệnh trên ĐVTS

Từ cơ sở nghiên cứu này, nên có một số nghiên cứu về các con đường cấp hiệu quả khác như ngâm, tắm để tiết kiệm được thời gian và công sức trong điều trị bệnh ếch.

Các thí nghiệm tiếp theo nên đẩy mạnh nghiên cứu ngoài thực địa với việc cung cấp tỏi ở các giai đoạn khác nhau

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Chu Mạnh Thắng và ctv, 2009. Nghiên cứu ảnh hưởng của các phương pháp chế biến, bảo quản (Dịch chiết, Bột khô, Dung dịch) đến hàm lượng kháng sinh và khả năng kháng khuẩn của tỏi và hành tây.

Báo Sài Gòn Giải Phóng, số ngày 19/8/2005. Nuôi ếch Thái Lan, Nhiều rủi ro khi chạy theo phong trào

Trần Hồng Thủy, 2008. Khảo sát một số bệnh trên ếch Thái lan (*Rana tigerina*) tại khu vực ven đô TP.HCM. LVThS, ĐHNL TP.HCM, 2008.

Amend, D.F. 1981. Potency testing of fish vaccines. International symposium on fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines. *Dev. Biol. Standard* 49:447-454.

Amagase H. and J. A. Milner. 1993. Impact of various sources of garlic and their constituents on 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene binding to mammary cell DNA. *Carcinogenesis*, 14: 1627–1631.

A. Stool and E. Seebeck, Allium compounds. I. Alliine, the true mother compound of garlic oil, *Helvetica Chimica Acta*, 32, 197-199 (1949).

Akasay N 1994 Frog culture for Commerce trade, Cooperative Frog culture, Thailand, 10-20p.

Arinee Chatchawanchonteera et al., 2008. Antimicrobial Activity of Guava Leaf and Garlic Extracts against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus* spp. Isolated from Infected Fish. *KKU Veterinary Journal* vol.18, no.1, pp46 – 53.

Block, E. 1992. The organ sulfur chemistry of the genus Allium implications for the organic chemistry of sulfur. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 31, 1135–1178.

Corzo-Martinez M., N. Corzo and Mar Villamiel. 2007. Biological properties of onions and garlic, *Trends in Food Science & Technology*, 18, 609-625.

Erol-Florian Garbor và ctv, 2010. The effects of some phytoadditives on growth, health and meat quality on different species of fish. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 2010, 43 (1); pp61-65

Heli Roy, 2005. Health Benefits of Garlic. Pennington Nutrition Series, Number 20, 2005.

Jeong Yeoul Lee et al, 2012. Review of the application of garlic (*Allium sativum* L.) in aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society.*, Vol43, No4., August 2012.

- Kyo. E., N. Uda, A. Suzuki, M. Kakimoto, M. Ushijima, S. Kasuga and Y. Itakura. 1998. Immunomodulation and antitumor activities of aged garlic extract. *Phytomedicine*, 5, 259–267.
- Le Minh Quoc., 2012. Frog value chain case study in Ho Chi Minh City Vietnam. Master thesis, University of Tromsø
- Nya., Austin. 2009. Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 32:963–970.
- Nya., Austin. 2010. The garlic component, allicin, prevents disease caused by *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 2010, 33, pp 293–300
- Nya., Austin. 2011. Development of immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Aeromonas hydrophila* after the dietary application of garlic., *Fish & Shellfish Immunology* 30 (2011) pp845 – 850.
- Omoniyi, L.O , Ajibola M.E. & J.O. Bifarin., Demand Analysis for Frog Meat in Ondo State, Nigeria, *Global Journal of Science Frontier Research Agriculture & Biology*. Volume 12 Issue 3 Version 1.0 March 2012
- Peter Josling., 2005. Allicin – The heart of garlic. HRC Publishing, 2005. 168pp.
- Pleasant Grove, 1995. Garlic – Nature’s amazing nutritional and medicinal wonder food. Woodland Publishing, Inc.
- Putsatee et al, 1995. Frog farming in Thai Lan. *Infofish international*; pp.25 - 28
- Salah Mesalhy Aly et al., 2008. Effect of garlic in the survival, growth, resistance and quality of *Oreochromis niloticus*. 8<sup>th</sup> International Symposium on Tilapia in Aquaculture 2008. pp277 – 296.
- Siti Nor Haida BT Shamsudin, 2006. Bioactivity of garlic extract. Thesis of the bachelor of science; University Teknologi Malaysia.
- Supranee Chinabut 1996. Bacteria diseases in frog hatcheries and evaluation of strategies to reduce hazards association with antibiotic usage. *World Aquaculture’96* in Bangkok.
- Zhang, L. 2003. Pharmacodynamics research of allicin on *Aeromonas hydrophila*. *Water Conservancy Related Fisheries* 23:49–51.