

THÔNG BÁO KHOA HỌC

KHẢO SÁT MỘT SỐ THẢO DƯỢC KHÁNG *Vibrio parahaemolyticus* pVPA3-1 GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP TÍNH TRÊN TÔM NUÔI

EVALUATION OF SOME HERBS THAT ARE RESISTANT TO *Vibrio parahaemolyticus* pVPA3-1 CAUSES ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE AHPND IN FARMED SHRIMP

Nguyễn Thị Diễm Phương¹, Trần Phạm Vũ Linh¹, Bùi Thị Thanh Tịnh¹,
Bùi Thị Mỹ Hạnh¹, Trần Thị Yến Nhi¹, Ngô Huỳnh Phương Thảo¹

Ngày nhận bài: 28/6/2019; Ngày phân biện thông qua: 12/9/2019; Ngày duyệt đăng: 19/9/2019

TÓM TẮT

Vibrio parahaemolyticus pVPA3-1 là tác nhân gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính AHPND trên cả tôm thẻ và tôm sú, gây tỷ lệ chết cao 90 – 100% chỉ trong vòng một tuần nhiễm bệnh. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm sàng lọc *in vitro* (phương pháp Khuếch tán đĩa thạch, xác định Nồng độ ức chế và diệt khuẩn tối thiểu MIC/MBC) một số cây bản địa có hoạt tính cao kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* pVPA3-1. Ngoài ra, nghiên cứu cũng đã bước đầu tiến hành các kiểm tra trên tôm (Liều gây độc LD₅₀, độ an toàn) để từ đó xây dựng phương pháp đánh giá *in vivo* hoạt tính của cao thảo dược trong phòng và trị bệnh AHPND. Nồng độ ức chế tối thiểu MIC và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu MBC của 6 loại cao chiết trên *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 cho giá trị dao động từ 6,25 đến 12,5 mg mL⁻¹, chính là kết quả tiền đề cho các đánh giá *in vivo* trên tôm. Bên cạnh đó, kết quả ổn định từ kiểm tra liều gây chết trung bình LD₅₀ của *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 và độ an toàn của thức ăn thảo dược góp phần quan trọng cho các đánh giá *in vivo* sau này trên tôm thẻ.

Từ khóa: bệnh hoại tử gan tụy cấp tính, bệnh chết sớm, cao thảo dược, *V. parahaemolyticus* pVPA3-1,

ABSTRACT

Vibrio parahaemolyticus pVPA3-1 is the causative agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease AHPND in both *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus monodon*, causing a high mortality rate of 90 - 100% within about one week of infection. This study aims to *in vitro* screening (Agar Disk Diffusion, Minimum Inhibitory and Minimum Bactericidal Concentration MIC/MBC) some indigenous plants with high antimicrobial activity against *V. parahaemolyticus* pVPA3-1. Also, the study initially conducted tests on shrimp (LD₅₀, the safety) to develop an *in vivo* assessment method. Minimum Inhibition Concentration MIC and Minimum Bactericidal Concentration MBC of 6 herbal extracts on *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 are ranging from 6.25 to 12.5 mg mL⁻¹, which is a prerequisite for further *in vivo* assessments. In addition, stable results from the Lethal Dose LD₅₀ and the safety of herbal foods might contribute significantly to *in vivo* evaluation in shrimp.

Key words: Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease, Early mortality syndrome, herbal extract, *V. parahaemolyticus* pVPA3-1.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính AHPND xuất hiện ở cả hai loài tôm sú và tôm thẻ, được báo cáo chi tiết lần đầu tiên bởi nhóm J.E. Han 2015 (Mỹ), báo cáo nêu rõ sự xuất hiện lần đầu tiên của căn bệnh này tại Bắc Trung Quốc

và đảo Hainan vào năm 2009 và sau đó là tại Việt Nam và Malaysia năm 2011. Tác nhân gây bệnh AHPND là vi khuẩn *V. parahaemolyticus* mang plasmid pVPA3-1 chứa 2 gen gây độc *PirA* và *PirB* (Jee Eun Han, Tang, Tran, & Lightner, 2015). Từ năm 2010 đến năm 2012, diện tích thiệt hại do bệnh Chết sớm gây ra là 7.068 ha (Bộ NN&PTNT, 2013). Theo thống

¹ Phòng Công nghệ Sinh học Thủy sản, Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp Hồ Chí Minh

kê của Chi cục Chăn nuôi và Thú Y tỉnh Quảng Trị, trong nửa đầu năm 2019 toàn tỉnh Quảng Trị đã có 15 héc ta diện tích ao nuôi tôm bị nhiễm bệnh hoại tử gan tụy cấp tính. Hiện dịch bệnh vẫn đang diễn biến phức tạp, có chiều hướng gia tăng, gây thiệt hại lớn cho người nuôi tôm.

Giải pháp phổ biến để phòng và trị bệnh trên tôm hiện nay là sử dụng kháng sinh hay hóa chất, tuy nhiên đã bộc lộ nhiều bất cập như hiện tượng kháng thuốc và tồn lưu trong tôm gây ảnh hưởng khá nghiêm trọng đến điều trị bệnh khi dịch bùng phát và gây hạn chế tiềm năng xuất khẩu. Thời gian gần đây, thảo dược được nghiên cứu và sử dụng nhiều để phòng và điều trị bệnh trong nuôi trồng thủy sản, được xem là một sự thay thế có tiềm năng cao cho các loại kháng sinh. Xuất phát từ những cấp thiết đã trình bày, nhóm nghiên cứu đã chọn lọc và sử dụng một số loài thảo dược bản địa để đánh giá hoạt tính *in-vitro* trên vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* pVPA3-1 gây hoại tử gan tụy cấp tính ở tôm, đồng thời tiến hành kiểm tra độ an toàn của thảo dược khi cho tôm ăn trực tiếp nhằm xây dựng quy trình đánh giá *in-vivo* hoạt tính của thảo dược trên tôm.

II. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Phương pháp thu nhận thảo dược và chiết cao

Các cây thảo dược được thu nhận toàn bộ cây hoặc từng bộ phận riêng lẻ như lá, thân/cành hoặc quả/củ. Sau đó, được rửa sạch, cắt nhỏ, phơi/sấy khô và bảo quản ở nơi khô ráo, thoáng mát – Bảng 1.

Thảo dược được thu cao chiết bằng phương pháp chiết ngâm (Vongsak et al., 2013) như sau: 25 g bột thảo dược được ngâm với 1 lít ethanol 70% (VNChemsol, Việt Nam) trong erlen dung tích 2 lít (Duran, Đức) trong 72 giờ ở điều kiện 28°C, khuấy đều 2-3 lần/ngày. Hỗn hợp ngâm sau đó được lọc qua giấy lọc $\Phi 2,5$ μm (Whatman, Anh) để thu dịch chiết, phần cặn còn lại được tiếp tục ngâm thu dịch chiết lần thứ hai và sau đó loại bỏ cặn. Dịch chiết được cô quay chân không bằng máy Buchi R-300 (Phoenix, Đức) với các thông số kỹ

thuật như sau: cô quay ethanol trong điều kiện vacuum start/ end 112 mbar/ 45 phút/ 150 rpm/ heating 50°C/ chiller 10°C và cô quay nước trong điều kiện vacuum start/ end 46 mbar/ 30 phút/150 rpm/ heating 50°C/ chiller 10°C. Dịch sau cô quay được sấy khô ở tủ sấy (Mettmert, Đức) từ 3-4 ngày tùy từng loại thảo dược. Khi cao đã khô hoàn toàn, có khối lượng không đổi thì bảo quản ở tủ 4°C.

2. Đánh giá *in-vitro* hoạt tính kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 của cao chiết

2.1. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch:

Cao chiết thảo dược được pha loãng 100 mg/mL trong DMSO (BioBasic, Canada) và bảo quản ở tủ 4°C, Doxycycline (Biobasis, Canada) được pha loãng tới nồng độ 10 mg/mL trong nước vô khuẩn (Milli-Q IQ7000, Anh) dùng làm đối chứng dương cho thí nghiệm. Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 (bảo quản - 80°C MDF-U55V, Panasonic, Nhật Bản) được ria kích hoạt trên đĩa môi trường LBagarNaCl3% (LabM, Anh) và nuôi ủ ở tủ nuôi cấy tĩnh 28°C (Panasonic Cooled Incubator MIR – 254, Nhật Bản) trong thời gian từ 16-18 giờ. Một khuẩn lạc đơn sau đó được chọn để tăng sinh khối trong tủ nuôi cấy lắc 28°C (Innova 42, Canada) bằng môi trường lỏng LBbrothNaCl3% (LabM, Anh) từ 16-18 giờ. Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 được kiểm tra PCR với cặp primer đặc hiệu AP3 F/R(336 bp):F – ATGAGTAACAATATA-AAAC ATGAAAC/R'- GTGGTAATAGATT-GTACAGAA (336 bp) (TY-TS, 2014) trước khi được dùng trong thí nghiệm. Tương tự, chủng vi khuẩn *Escherichia coli* ATCC 25922 được sử dụng song song để kiểm soát quá trình thực hiện và đảm bảo độ chính xác cho thí nghiệm. Doxycycline theo dãy nồng độ từ 30 - 100 $\mu\text{g}/100$ μl và vi khuẩn *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 được khảo sát theo 0.5 McFarland nhằm xác định nồng độ Doxycycline và mật độ *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 phù hợp cho các thí nghiệm tiếp theo.

Thí nghiệm khảo sát *in vitro* hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 của thảo dược gồm 6 nghiệm thức, đối chứng dương là

Doxycycline với nồng độ được khảo sát ở thí nghiệm trước đó, đối chứng âm là DMSO, và 4 nghiệm thức còn lại là cao chiết thảo dược ở các nồng độ là 1, 5, 10 và 15 mg/ 100 μ L. Dịch vi khuẩn *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 tăng sinh qua đêm được trải trên đĩa môi trường MHANaCl3% (Merck, Đức) bằng que tăm bông tiệt trùng. Sau đó, giếng chứa thảo dược (gồm 6 giếng/đĩa) được tạo trên đĩa thạch bằng dụng cụ đục lỗ tiệt trùng. Dịch cao chiết của 1 mẫu thảo dược ở các nồng độ khảo sát, kháng sinh Doxycycline và DMSO (100 μ L/giếng) được bổ sung lần lượt vào các giếng. Đĩa được ủ ở điều kiện nhiệt độ 28°C. Đường kính vòng kháng khuẩn của thảo dược ở các nồng độ trên vi khuẩn *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 được so sánh với nghiệm thức Doxycycline và DMSO để đánh giá hoạt tính của thảo dược (CLSI M100, 2017).

2.2. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của thảo dược bằng phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu MBC

Nồng độ ức chế tối thiểu (Minimal inhibitory concentration MIC) là nồng độ thấp nhất của dịch thảo dược ức chế sự phát triển của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 (>80%) – nghĩa là không làm đổi màu thuốc thử Resazurin, còn nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (Minimal bactericidal concentration MBC) là nồng độ thấp nhất của dịch thảo dược mà ở đó vi khuẩn bị tiêu diệt hoàn toàn (100%). MIC và MBC được kiểm tra theo phương pháp pha loãng bậc 2 cao chiết trên đĩa 96 giếng (Costar 3596, Corning, Mỹ) (My Ngan, Linh, Quy, & Thanh Ho, 2016; CLSI M45, 2016).

Dịch vi khuẩn và cao chiết thảo dược được chuẩn bị tương tự như ở thí nghiệm khảo sát hoạt tính thảo dược trên đĩa thạch. Bao gồm 4 nghiệm thức: đối chứng dương Doxycycline, đối chứng âm DMSO, nước vô khuẩn, và nghiệm thức cao thảo dược (nồng độ 100 mg/mL). Chủng *E. coli* ATCC 25922 (chủng đối chứng, control strain) cũng được sử dụng song song để kiểm soát tính ổn định và độ chính xác của thí nghiệm.

Thí nghiệm được thực hiện như sau, môi

trường MHBNaCl1% (Merck, Đức) được bổ sung 100 μ L vào giếng trên đĩa 96 giếng bằng pipet 8 kênh (Eppendorf, Đức), sau đó mỗi loại cao thảo dược/kháng sinh Doxycycline/DMSO/nước vô khuẩn được thêm 100 μ L mỗi loại vào mỗi giếng khác nhau, các giếng này được pha loãng bậc 2 bằng cách trộn đều và chuyển 100 μ L hỗn hợp sang cột bên cạnh. Quy trình pha loãng bậc 2 này được lặp lại cho đến giếng thứ mười hai của hàng, 100 μ L của dịch sau khi trộn ở giếng cuối cùng được hút bỏ. Dịch vi khuẩn *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 (OD_{600nm} 0,5) được bổ sung 100 μ L vào các giếng và được ủ trong điều kiện nhiệt độ 28°C từ 16 đến 18 giờ. Thuốc thử Resazurin 0,01% (Sigma, Đức) được bổ sung 40 μ L vào tất cả các giếng để đánh giá tỷ lệ sống của vi khuẩn (màu xanh chuyển sang màu hồng nghĩa là có sự tồn tại của vi khuẩn) trên từng giếng.

Để xác định giá trị MBC, 100 μ L mẫu ở các giếng không làm đổi màu thuốc thử sẽ được trải trên LBagarNaCl3% (LabM, Anh), sau đó tiếp tục ủ ở điều kiện nhiệt độ 28°C. Sự xuất hiện hay không của vi khuẩn trên đĩa thạch được quan sát để xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của thảo dược (CLSI M45, 2016)

3. Đánh giá độ an toàn của thức ăn chứa thảo dược

Thử nghiệm được tiến hành nhằm chọn ra tỷ lệ trộn phù hợp từ đó đánh giá độ an toàn của thức ăn này trên tôm bằng phương pháp cho ăn. Thức ăn chứa thảo dược được chuẩn bị bằng cách trộn thảo dược vào thức ăn công nghiệp (UniPresident, Việt Nam) trên đĩa thủy tinh, thảo dược được dùng ở dạng lỏng nhằm giúp hấp thụ dễ dàng vào thức ăn (Balasubramanian và cs, năm 2008).

Nồng độ cuối của cao thảo dược trong thức ăn được giữ cố định là $1,5 \times 10^{-3}$ Kg/ Kg thức ăn, thí nghiệm gồm 4 nghiệm thức tương ứng với tỷ lệ phối trộn là 1:2.000, 1:4.000, 1:5.000 và 1:10.000. Thức ăn trộn thảo dược được để ở nhiệt độ phòng 15 phút và phủ bên ngoài bằng lớp dầu gan mực (4%) nhằm giữ cố định thảo dược trong thức ăn, tránh bị thấm ngược ra môi trường nước nuôi khi cho tôm ăn, sau đó được để khô ở nơi thoáng mát (26-27°C). Quan sát

và đánh giá độ kết dính và độ bền khi thử bằng tay của thức ăn thảo dược để chọn ra tỷ lệ phối trộn tốt nhất.

Thử nghiệm độ an toàn của thức ăn trên tôm được bố trí gồm nghiệm thức đối chứng âm và nghiệm thức thức ăn thảo dược (theo tỷ lệ phối trộn thu được trước đó). Thức ăn thảo dược được dùng cho tôm ăn liên tục trong 14 ngày với liều lượng 5-7% trọng lượng tôm, mỗi nghiệm thức gồm 10 con tôm và lặp lại 3 lần, theo dõi và đánh giá tỷ lệ sống trong suốt thời gian thử nghiệm. Dựa trên kết quả theo dõi lượng thức ăn tiêu thụ và tỷ lệ sống của tôm để

đánh giá độ an toàn của thức ăn thảo dược.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1. Thu nhận thảo dược và chiết cao

Thảo dược gồm 4 nhóm chia theo bộ phận của cây được thu nhận: nhóm Lá, nhóm Thân/cành, nhóm Quả/ hạt và nhóm Củ/ rễ - Bảng 1. Các bộ phận cần thiết của từng nhóm được thu thập, rửa sạch và phơi khô, bảo quản nơi khô ráo thoáng mát tại phòng CNSH Thủy sản, Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. Hồ Chí Minh.

Bảng 1. Danh sách các loài thảo dược được thu thập và cao chiết được thu nhận

Nhóm	Tên cây/Nguồn tham khảo	Thu cao chiết tổng số (g/cây)
Lá	1. Bàng (Huỳnh Kim Diệu et al., 2010)	5
	2. Chùm ngây (Ali et al., 2004).	
	3. Cọc trắng (D'Souza et al., 2010).	
	4. Dà quánh (Chandrasekaran et al., 2009)	
	5. Dà vôi (ASudheer et al., 2012).	
	6. Đưng (Gurudeeban et al., 2015)	
	7. Đước (S.H.Lim et al., 2011)	
	8. Lốt (Zaidan et al., 2005)	
	9. Mắm đen (Gnanadesigan et al., 2012)	
	10. Mắm trắng (Gnanadesigan et al., 2012)	
	11. Ô rô hoa tím (Huyền, Huy, & Hoa, 2018).	
	12. Ôi Manikandan & Anand, 2015)	
	13. Trầu không (An et al., 2016)	
Thân/cành	14. Cỏ đuôi gà (Balasubramanian et al., 2007).	6
	15. Cỏ mực (Karthikumar et al., 2007)	
	16. Cỏ sữa (Tai Nang & Quyen, 2015)	
	17. Hẹ (Kim Dieu & Tuyet, 2014)	
	18. Bìm bịp (Yang et al., 2013)	
19. Cà gai leo		
20. Diệp hạ châu (Eldeen et al., 2011).		
21. Hương nhu tím (Małgorzata Nabrdalik et al., 2016)		
Quả/hạt	22. Xuyên tâm liên (Roy et al., 2010)	5
	23. Chanh (Pathan et al., 2012)	
	24. Mướp đắng (Ozusaglam et al., 2013)	
	25. Sim (Saising & Voravuthikunchai, 2012)	
26. Thầu dầu (Huyền et al., 2018)		
Củ/rễ	27. Bạch chỉ (Le et al., 2012)	5
	28. Cà gai leo (Nguyen & Eun, 2013)	
	29. Gừng (Dhanik et al., 2017)	
	30. Rẻ quạt (Woźniak & Matkowski, 2011)	
	31. Riềng (Tam et al., 2018).	
	32. Tỏi (Benkeblia, 2004)	

2. Đánh giá *in-vitro* hoạt tính kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 của cao chiết

2.1. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch

Kiểm tra hoạt tính của Doxycycline 30 µg trên chủng *E. coli* ATCC25922 cho kết quả đúng với Tiêu chuẩn M100S, đường kính của vòng kháng khuẩn là 17±1 mm (lớn hơn 14 mm) và với dãy nồng độ kháng sinh tăng dần cho kết quả đường kính vòng tròn kháng khuẩn tương ứng tăng dần. Vậy, từ kết quả kiểm tra trên *E. coli* ATCC 25922 có thể thấy rằng thí nghiệm được bố trí hợp lý và kết quả kiểm tra đáng tin cậy (CLSI M100, 2017).

Hai chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* và *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 được phân lập vào 2016, đã được định danh và đánh giá độc lực hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm (chủng *V. parahaemolyticus* là chủng hiện diện nhiều trên mẫu thủy hải sản, thực phẩm và không có khả năng gây bệnh chết sớm, trong khi đó *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 là chủng gây bệnh chết sớm trên tôm) (Diem Phuong *et al.*, 2019.). Bên cạnh đó, kết quả thu được còn cho thấy chủng *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 khi được pha loãng tới $4,5 \times 10^7$ thì cho kết quả vòng kháng khuẩn rõ, dễ quan sát và ổn định ở liều Doxycycline 100 µg - Φ ≥14 mm. Như vậy, liều Doxycycline là 100 µg và mật độ vi khuẩn được pha loãng tới $4,5 \times 10^7$ CFU/mL

được chọn sử dụng trong đánh giá hoạt tính *in-vitro* của thảo dược.

Trong một số nghiên cứu gần đây, Doxycycline 30 µg tạo vòng kháng khuẩn 23 – 24 mm khi kiểm tra trên vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây AHPND ở tôm (Lua *et al.*, 2015a; Lua *et al.*, 2015b), và hoàn toàn khác với kết quả thu được trên chủng *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 ($\geq 11 \pm 1$ mm) nhưng lại khá tương đồng với chủng *V. parahaemolyticus* là ($\geq 27 \pm 1$) mà chúng tôi thu được. Sự biến đổi phức tạp của vi khuẩn gây hoại tử gan tụy cấp tính AHPND trên tôm được đề cập trong nhiều nghiên cứu gần đây có thể giải thích phần nào lý do của sự khác nhau trong kết quả kiểm tra mà chúng tôi gặp phải (Han *et al.*, 2017).

Thông qua kiểm tra độ nhạy của *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 đối với Doxycycline, chúng tôi thu nhận được kết quả mới về tính nhạy của vi khuẩn phân lập được từ tôm bệnh chết sớm này. Đặc tính này phần nào có thể sẽ làm giảm tác dụng của kháng sinh hay các hợp chất khác từ thảo dược lên vi khuẩn.

Bảng 2 trình bày chi tiết các mẫu thảo dược cho hoạt tính kháng khá tốt trên *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 ở liều 10 mg, đều cho đường kính vòng kháng khuẩn ≥14 mm. Vì vậy, 21 loại cao thảo dược trên được tiếp tục kiểm tra nồng độ ức chế tối thiểu MIC và nồng

Bảng 2. Bảng tổng hợp kết quả khảo sát *in-vitro* hoạt tính cao thảo dược bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch

Nhóm cây	Doxycycline 100 µg	Cao chiết 10 mg	DMSO
1. Bàng	14,0±0,0	22,3±0,9	8,0±0,0
2. Cọc trắng	16,3±0,9	19,0±3,6	8,0±0,0
3. Đà quánh	15,7±1,1	14,7±0,9	8,0±0,0
4. Đung	14,7±2,2	17,3±1,8	8,0±0,0
5. Đước	16,3±0,9	16,0±0,7	8,0±0,0
6. Mắm đen	14,0±0,7	14,7±1,6	8,0±0,0
7. Mắm trắng	15,3±1,6	18,0±1,3	8,0±0,0
8. Ô rô hoa tím	14,3±1,8	21,0±2,7	8,0±0,0
9. Ôi	14,7±0,3	14,5±0,3	8,0±0,0
10. Tràu không	13,7±0,4	20,0±0,7	8,0±0,0

	Nhóm cây	Doxycycline 100 µg	Cao chiết 10 mg	DMSO
Thân/cành	11. Cỏ sữa	15,0±0,0	17,7±0,4	8,0±0,0
	12. Cỏ mực	15,0±0,0	16,0±0,0	8,0±0,0
	13. Hẹ	14,7±1,1	17,7±0,4	8,0±0,0
	14. Diệp hạ châu	13,3±0,4	16,7±0,4	8,0±0,0
	15. Xuyên tâm liên	14,3±1,8	17,0±0,0	8,0±0,0
Quả/hạt	16. Chanh	15,7±2,2	18,0±1,3	8,0±0,0
	17. Mướp đắng	14,7±1,1	17,7±0,4	8,0±0,0
	18. Sim	13,0±0,7	15,0±0,0	8,0±0,0
Củ/rễ	19. Bạch chi	16,7±0,4	16,7±0,1	8,0±0,0
	20. Rễ quạt	13,7±0,4	14,3±2,4	8,0±0,0
	21. Riềng	16,0±0,0	28,7±0,4	8,0±0,0

độ diệt khuẩn tối thiểu MBC.

III.2.2. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu MBC

Kiểm tra MIC của Doxycycline trên *E. coli* ATCC 25922 cho kết quả 1.5625 µg mL⁻¹, nằm trong khoảng 0,5 – 2 µg/mL; trong khi DMSO ức chế vi khuẩn khi ở tỷ lệ thể tích với vi khuẩn là 1:4, thì nước vô khuẩn không tác động đến khả năng sống của vi khuẩn. Các kết quả này cho thấy bố trí thí nghiệm và thao tác thực hiện thí nghiệm xác định MIC là đáng tin cậy (CLSI M100, 2017).

Giá trị MIC của Doxycycline trên *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 là 7,8125 µg mL⁻¹, còn MIC của nước vô khuẩn và DMSO hoàn toàn giống với trên *E. coli* ATCC25922. Theo CLSI M45, nhóm vi khuẩn *Vibrio* spp. có tiêu chuẩn về giá trị MIC đối với Doxycycline như sau: ≤ 4 µg mL⁻¹ – nhạy, 8 µg mL⁻¹ – trung bình, ≥16 µg mL⁻¹ – kháng, như vậy cùng với kết quả kiểm tra khuếch tán đĩa thạch ở trên cho thấy *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 có tính nhạy trung bình với kháng sinh Doxycycline. Điều này giải thích cho việc cần tăng liều Doxycycline khi kiểm tra khuếch tán đĩa thạch, đồng thời mật độ tế bào cũng phải giảm đi (trong khi hai chủng *V. parahaemolyticus* và *E. coli* ATCC25922 không cần phải điều chỉnh) để có thể quan sát được vòng kháng khuẩn (CLSI M45, 2016)

V. parahaemolyticus pVPA3-1 là một chủng

vi khuẩn mới do sự xuất hiện plasmid pVPA3-1 trong tế bào, làm cho vi khuẩn này từ một loài gây ngộ độc thực phẩm thông thường trở thành vi khuẩn có độc tố gây hoại tử gan tụy cấp trên tôm sú và tôm thẻ. Có thể đây chính là lý do của sự khác nhau về tính nhạy với Doxycycline của chủng vi khuẩn này với *V. parahaemolyticus* thông thường.

Đối với kiểm tra MIC của các cao thảo dược, việc quan sát sự đổi màu của thuốc thử khó hơn vì mỗi thảo dược có màu đặc trưng riêng, do đó việc kiểm tra MIC đòi hỏi lặp lại nhiều lần và được đối chứng với kết quả kiểm tra MBC – Bảng 3. Giá trị MIC/ MBC của 6 loại thảo dược cho kết quả tốt nhất dao động từ 6,25 đến 12,5 mg mL⁻¹. Củ riềng thể hiện khả năng ức chế và diệt vi khuẩn *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 mạnh nhất trong các cây được khảo sát, MIC là MBC đều cho giá trị 6,25 mg mL⁻¹.

Năm 2006, nghiên cứu của nhóm Oonmettaree phát hiện riềng có hoạt tính ức chế vi khuẩn *Staphylococcus aureus* với MIC 0.325 mg mL⁻¹ và MBC là 1.3 mg mL⁻¹. Thời gian gần đây, nhiều nghiên cứu khác đã chứng minh được rằng cây riềng còn có nhiều hoạt tính quý khác như kháng nấm, tăng cường hệ miễn dịch... Trong công bố gần đây của Chawee-pack và es (2015), cây riềng có MIC và MBC đối với *V. parahaemolyticus* gây bệnh chết sớm lần lượt là 2,5 và 5 mg mL⁻¹, kết quả này khá tương đồng với kết quả mà chúng tôi đã thu được.

Bảng 3. Bảng kết quả đánh giá nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của 6 loại thảo dược trên *V. parahaemolyticus* pVPA3-1

Nhóm cây		MIC mg mL ⁻¹	MBC mg mL ⁻¹
Lá	1. Tràu không	6,25	12,5
Thân/ cành	2. Diệp hạ châu	6,25	12,5
Quả/ hạt	3. Chanh	6,25	12,5
	4. Sim	12,5	12,5
Củ/ rễ	5. Bạch chỉ	6,25	12,5
	6. Riềng	6,25	6,25
Doxycycline		7,8125 µg mL ⁻¹	62,5 µg mL ⁻¹

Như đã thảo luận trước đó về sự khác nhau của đường kính vòng kháng khuẩn dưới cùng liều Doxycyclin 30 µg trên các chủng *V. parahaemolyticus* khác nhau (cùng gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm), sự biến đổi đa dạng này của vi khuẩn gây bệnh cũng rất có thể là nguyên nhân dẫn đến sự khác nhau về giá trị MIC/MBC của riềng mà chúng tôi ghi nhận được (Oonmetta-aree et al., 2006; Chawee-pack, Muenthaisong, Chawee-pack, & Kamei, 2015).

3. Đánh giá độ an toàn của thức ăn chứa thảo dược

Kết quả đánh giá độ kết dính và độ bền trong khảo sát tỷ lệ trộn thảo dược với thức ăn như sau: tỷ lệ 1:2.000 (2,5 mL:5.000 mg) – dịch thảo dược bị đọng lại trên khay sau khi trộn với thức ăn, thức ăn sau áo dầu mực bị vón cục và dễ thay đổi hình dáng; tỷ lệ 1:4.000 (1,25 mL: 5.000 mg) - thức ăn vẫn còn hiện tượng vón cục, tuy

nhiên đã có độ xốp nhất định; tỷ lệ 1:5.000 (1 mL: 5.000 mg) – thức ăn không còn bị vón cục, xốp và ổn định khi được vò nhẹ bằng tay; và tỷ lệ 1:10.000 (0,5 mL: 5.000 mg) – thảo dược không thấm đều vào thức ăn (thể tích thảo dược không đủ). Nhìn chung, tỷ lệ 1:5.000 được chọn để tiếp tục thực hiện thử nghiệm đánh giá độ an toàn của thức ăn thảo dược trên tôm.

Theo dõi tỷ lệ sống của tôm trong thử nghiệm đánh giá độ an toàn của thức ăn thảo dược có kết quả như sau – Bảng 4: đối chứng âm – tỷ lệ sống 96,67 %; nghiệm thức thức ăn trộn với cao hạt sim - tỷ lệ sống 93,33 %; nghiệm thức thức ăn trộn cao củ bạch chỉ - tỷ lệ sống 93,33 %. Do đó, kết quả bước đầu trong đánh giá độ an toàn cho thấy thức ăn thảo dược có khả năng cao sẽ đem lại hiệu quả khi sử dụng trong xây dựng phương pháp đánh giá *in-vivo* trên tôm nuôi.

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ an toàn của thức ăn thảo dược trên tôm thẻ chân trắng

	Cao hạt sim	Cao củ bạch chỉ	Đối chứng âm
Tỷ lệ sống (%)	93.335.77 ^a	93.3311.54 ^a	96.675.77 ^a

Ghi chú: P = 0.8503; Giá trị ± độ lệch chuẩn; N = 30 tôm/nghiệm thức

IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu đã thu được 32 mẫu cao chiết thảo dược và đánh giá hoạt tính *in-vitro* trên vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính ở tôm (*V. parahaemolyticus* pVPA3-1), kết quả thu được lần lượt bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch (21 mẫu có hoạt tính mạnh) và xác định nồng độ ức chế/điệt khuẩn tối thiểu MIC/MBC (kết quả từ 6,25-12,5 mg mL⁻¹) cho thấy chúng tôi đã thu nhận được 6 loài thảo dược có hoạt tính ức chế

vi khuẩn *V. parahaemolyticus* pVPA3-1 khá tốt. Tỷ lệ trộn thảo dược vào thức ăn cũng đã được khảo sát và thu được kết quả tỷ lệ 1:5.000 phù hợp, ngoài ra độ an toàn của thức ăn thảo dược được đánh giá trên tôm thẻ cho thấy tôm thẻ tiêu thụ thức ăn và phát triển bình thường trong thời gian 14 ngày. Như vậy, những kết trên là cơ sở quan trọng cho các thử nghiệm tiếp theo để đánh giá hoạt tính *in-vivo* của thảo dược trong phòng và điều trị bệnh chết sớm cho tôm nuôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Cục Thú Y. Tiêu chuẩn cơ sở 02- 2014/TY-TS (2014). Tiêu chuẩn cơ sở xét nghiệm phát hiện vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* có gen gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính ở tôm bằng kỹ thuật PCR.
2. Đặng Thị Lua, Lại Thị Ngọc Hà, Nguyễn Thanh Hải (2015). Tác dụng diệt khuẩn của dịch chiết lá sim và hạt sim (*Rhodomyrtus tomentosa*) đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm nuôi nước lợ. *Tạp Chí Khoa Học và Phát Triển* 2015, 13(7), 1101–1108.
3. Đặng Thị Lua, Nguyễn Thị Hạnh, Hoàng Hải Hà, Trương Thị Mỹ Hạnh, Phan Thị Vân (2015). Tác dụng diệt khuẩn in-vitro của dịch chiết lá trầu không (*Piper betle* L.) và dịch chiết lá ổi (*Psidium guajava*) đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm nuôi nước lợ. *Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn, kỳ 1*, 92–97.
4. Hồng Mộng Huyền, Võ Tấn Huy, Trần Thị Tuyết Hoa (2018). Hoạt tính kháng khuẩn của một số cao chiết thảo dược kháng vi khuẩn gây bệnh ở tôm nuôi. *Tạp chí khoa học trường Đại học Cần Thơ, tập 54, số chuyên đề Thủy sản (2018)2*, 143-150.
5. Lương Thị Mỹ Ngân, Nguyễn Thị Thùy Linh, Nguyễn Ngọc Quý, Phạm Thị Ngọc Huyền, Trương Thị Huỳnh Hoa, Trần Trung hiếu, Phạm Thành Hồ (2016) Nghiên cứu hoạt tính kháng *Staphylococcus aureus* và *Klebsiella pneumoniae* của cao chiết lá dâm bụt (*Hibiscus rosa-sinensis* L.). *Tạp chí Phát Triển Khoa học và Công nghệ, tập 19(15)*, 84 – 94.
6. Nguyễn Thị Diễm Phương, Võ Nguyễn Thanh Thảo, Trần Thị Thanh Hương, Ngô Huỳnh Phương Thảo, Nguyễn Quốc Bình (2019). Nghiên cứu tạo KIT LAMP phát hiện vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy AHPND/ hay bệnh chết sớm EMS trên tôm. *Đề tài nghiên cứu cấp cơ sở, Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh*.
7. Nguyễn Thanh Hải, Nguyễn Văn Thanh (2016). Nghiên cứu tác dụng ức chế in vitro của cao khô dịch chiết dược liệu trên vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus app.* và *E. coli* phân lập từ dịch viêm từ cung chó và thử nghiệm điều trị. *Khoa Học Kỹ Thuật Thú Y, XXIII(4)*, 26–36.
8. Nguyễn Tài Năng, Nguyễn Thị Quyên (2015). Nghiên cứu sử dụng thảo dược thay thế kháng sinh bổ sung trong thức ăn chăn nuôi. *Khoa Học Công Nghệ và Đổi Mới*, 10, 23–24.
9. Nguyễn Khoa (2018). Đối tượng Thủy sản nuôi chủ lực. *Trang thông tin điện tử Tổng cục Thủy sản* tại trang web <https://www.fistenet.gov.vn/nuoi-trong-thuy-san/-nuoi-thuy-san/doc-tin/011938/2018-12-18/doi-tuong-thuy-san-nuoi-chu-luc>

Tiếng Anh

10. Chaweepeak, T., Muenthaisong, B., Chaweepeak, S., & Kamei, K. (2015). The potential of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) extract against the pathogens that cause white feces syndrome and acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *International Journal of Biology*, 7(3), 8–17.
11. Clinical Laboratory Standar Institute. (2017). *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*
12. Clinical Laboratory Standar Institute. (2016). *M 45 Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria - 3rd edition*
13. Han, J. E., Tang, K. F. J., & Lightner, D. V. (2015). Genotyping of virulence plasmid from *Vibrio parahaemolyticus* isolates causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*.
14. Nguyen, Q. V., & Eun, J.-B. (2013). Antimicrobial activity of some Vietnamese medicinal plants extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(35), 2597–2605.
15. Oonmetta-aree, J., Suzuki, T., Gasaluck, P., & Eumkeb, G. (2006). Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT - Food Science and Technology*, 39(10), 1214–1220.
16. Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., & Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*, 44(January 2013), 566–571.
17. Zaidan, M. R. S., Rain, N., Badrul, A. R., Adlin, A., & Zakiah, &. (2005). In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. *Tropical Biomedicine* (Vol. 22).