



HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA MỘT SỐ CHẤT CHIẾT THẢO DƯỢC KHÁNG *Vibrio parahaemolyticus* VÀ *Vibrio harveyi* GÂY BỆNH Ở TÔM BIỂN

Trần Thị Tuyết Hoa^{1*}, Trần Thị Mỹ Duyên¹, Hồng Mộng Huyền¹, Bùi Thị Bích Hằng¹ và Nguyễn Trọng Tuấn²

¹Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

²Bộ môn Hóa học, Khoa Khoa học tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Thị Tuyết Hoa (email: ttthoa@ctu.edu.vn)

ABSTRACT

The experiment was carried out to determine the antimicrobial activity of herbal extracts on the shrimp bacterial pathogens- *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi*. Antimicrobial activity test, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) on pathogenic bacteria of herbal extracts were determined by disk diffusion methods and broth dilution methods. Results showed that: (i) the extract of *Phyllanthus urinaria* L., *Punica granatum* and *Camellia sinensis* showed the antimicrobial activity for both of *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi*; (ii) the extracts of *Cleome spinosa* and *Agerantun conyzoides* were only inhibition of *V. harveyi*. Besides, the extracts of *Thespesia populnea*, *Perilla frutescens*, *Chromlacna odorata*, *Carica papaya* and *Moringa oleifera* did not show antibacterial activity to *V. parahaemolyticus*; (iii) The extract of *Phyllanthus urinaria* is determined to contain alkaloids, flavonoids, steroid and triterpenoids, reducing sugars, tanins and sesquiterpene lactones. In which, polyphenols content is 28.6 ± 0.9 mg GAE/g and flavonoids content is 341 ± 2.4 mg QE/g.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết thảo dược trên vi khuẩn gây bệnh tôm - *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio harveyi*. Hoạt tính kháng khuẩn, nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của các chất chiết xuất với vi khuẩn gây bệnh được xác định bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch và phương pháp pha loãng đa nồng độ. Kết quả ghi nhận: (i) chất chiết điệp hạ châu (*Phyllanthus urinaria*), lựu (*Punica granatum*) và trà xanh (*Camellia sinensis*) có khả năng ức chế đồng thời *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi*; (ii) chất chiết hồng ri (*Cleome spinosa*) và hoa ngũ sắc (*Agerantun conyzoides*) chỉ có hoạt tính kháng khuẩn *V. harveyi*. Bên cạnh đó, chất chiết tra (*Thespesia populnea*), tia tô (*Perilla frutescens*), cô lào (*Chromlacna odorata*), đu đủ (*Carica papaya*) và chùm ngây (*Moringa oleifera*) không có hoạt tính kháng *V. parahaemolyticus*. (iii) Chất chiết điệp hạ châu thân đỏ được xác định có chứa alkaloids, flavonoids, steroid và triterpenoids, đường khử, tanins và sesquiterpene lactones. Trong đó, hàm lượng polyphenols tổng là $28,6 \pm 0,9$ mg GAE/g và flavonoids tổng là $341 \pm 2,4$ mg QE/g.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 21/10/2019

Ngày nhận bài sửa: 29/11/2019

Ngày duyệt đăng: 23/04/2020

Title:

Antimicrobial activity of herbal extracts against *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* causing disease in penaeid shrimp

Từ khóa:

Chất chiết thảo dược, hoạt tính kháng khuẩn, nồng độ diệt khuẩn tối thiểu, nồng độ ức chế tối thiểu, *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio harveyi*

Keywords:

Antimicrobial activity, herbal extracts, minimum bactericidal concentration, minimum inhibitory concentration, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi*

Trích dẫn: Trần Thị Tuyết Hoa, Trần Thị Mỹ Duyên, Hồng Mộng Huyền, Bùi Thị Bích Hằng và Nguyễn Trọng Tuấn, 2020. Hoạt tính kháng khuẩn của một số chất chiết thảo dược kháng *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio harveyi* gây bệnh ở tôm biển. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(Số chuyên đề: Thủy sản)(1): 170-178.

1 GIỚI THIỆU

Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) được đánh giá là khu vực có sản lượng tôm nuôi nhiều nhất cả nước (VASEP, 2017). Theo Tổng cục thủy sản Việt Nam (2019), tổng sản lượng thủy sản sáu tháng đầu năm 2019 ước đạt 3,77 triệu, tăng 6% so với cùng kỳ năm 2018. Trong đó, sản lượng tôm sú đạt khoảng 112,3 nghìn tấn, bằng 106,7% cùng kỳ; tôm thẻ chân trắng đạt 177,4 nghìn tấn, bằng 110,2% cùng kỳ năm 2018. Cùng với mức độ thâm canh hóa để gia tăng sản lượng, dịch bệnh là vấn đề thường xuyên xảy ra gây thất thoát kinh tế cho người nuôi tôm. Cụ thể, 08 tháng đầu năm tổng diện tích nuôi tôm nước lợ bị thiệt hại hơn 17.543 ha, do bệnh hoại tử gan tụy cấp, bệnh đốm trắng, bệnh vi bào tử trùng (EHP).

Để hạn chế dịch bệnh, người dân thường sử dụng kháng sinh, các loại hóa chất đặc trị để phòng trị bệnh cho tôm nuôi. Tuy nhiên, việc sử dụng thuốc kháng sinh và các loại hóa chất để phòng trị bệnh cho động vật thủy sản hiện nay đang được khuyến cáo cần phải hạn chế. Nguyên nhân là do khả năng gia tăng tình trạng đa kháng thuốc của các loài vi khuẩn gây bệnh, ô nhiễm môi trường, hệ sinh thái và sự tồn lưu kháng sinh trong sản phẩm thủy sản (Aoki, 1988; Sarter *et al.*, 2007; Nguyen Hoang Nam Kha, 2012).

Hiệu quả sử dụng thảo dược trong phòng trị bệnh thủy sản đã và đang dần được khẳng định trong nhiều kết quả nghiên cứu (Citarasu, 2010; Chakraborty and Hancz, 2011; Harikrishnan *et al.*, 2011). Trong thảo dược có nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học, phổ kháng khuẩn rộng đối với nhiều tác nhân gây bệnh và không gây ra hiện tượng kháng khuẩn. Các hợp chất được tìm thấy trong thực vật có khả năng kháng khuẩn bao gồm alkaloids, glycosides, polyphenols, và terpenes (Ahn, 2017). Bên cạnh đó, nguyên liệu thảo dược thô là ít tốn kém, có sẵn tại địa phương, có thể dễ dàng chuẩn bị, khả năng phân hủy sinh học và không gây tác động bất lợi cho môi trường (Syahidah *et al.*, 2015).

Trên cơ sở đó, nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định khả năng kháng một số loài vi khuẩn gây bệnh phổ biến ở tôm nuôi của một số chất chiết xuất thảo dược thu hái ở vùng ĐBSCL. Kết quả nghiên cứu đóng góp thông tin khoa học, định hướng phù hợp về khả năng ứng dụng thảo dược trong nghề nuôi thủy sản nói chung và nghề nuôi tôm nói riêng nhằm hạn chế việc sử dụng thuốc và hóa chất trong nuôi thủy sản.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Chất chiết thảo dược

Nghiên cứu được thực hiện trên một số loài thảo dược thu hái ở một số tỉnh ĐBSCL bao gồm: diệp hạ châu thân đỏ (*Phyllanthus urinaria*), lựu (*Punica granatum*), trà xanh (*Camellia sinensis*), tra (*Thespesia populnea*), tía tô (*Perilla frutescens*), cỏ lào (*Chromolaena odorata*), đu đủ (*Carica papaya*), chùm ngây (*Moringa oleifera*), hoa ngũ sắc (*Ageratum conyzoides*), hồng ri (*Cleome spinosa*).

Cây thảo dược được rửa sạch, sấy khô ở 40-45°C và nghiền thành bột nguyên liệu. Bột nguyên liệu được ngâm trong methanol với tỉ lệ 1:10. Sau đó, dịch chiết được lọc qua giấy lọc Whatman No.1 và cô quay chân không loại bỏ dung môi thu được cao tổng thực vật (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007). Chất chiết thảo dược được pha loãng trong dung môi DMSO (400 mg/mL), tẩm vào đĩa giấy có đường kính 8 mm, để khô và sử dụng cho bước phân tích hoạt tính kháng khuẩn.

2.2 Nguồn vi khuẩn

Vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio harveyi* được sử dụng để xác định hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất thảo dược từ bộ sưu tập của bộ môn Bệnh học Thủy sản, khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

Nguồn vi khuẩn *V. harveyi* sử dụng trong thí nghiệm khảo sát được phân lập từ mẫu nước và tôm thu ở Bạc Liêu và Cà Mau năm 2018.

2.3 Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn

Phương pháp khuếch tán đĩa thạch được sử dụng để xác định khả năng kháng khuẩn của thảo dược. Dùng tấm bông tiệt trùng trải đều vi khuẩn trên đĩa thạch môi trường Nutrient Agar bổ sung 1,5% NaCl. Đặt các đĩa giấy đã được tẩm chất chiết thảo dược lên đĩa môi trường có vi khuẩn, sau đó ủ ở 28°C trong vòng 24 giờ. Mỗi loại thảo dược được lặp lại ba lần. Đĩa tẩm DMSO được sử dụng làm đối chứng âm và đĩa kháng sinh Doxycyclin 30 µg (DOX) làm đối chứng dương. Khả năng kháng khuẩn của các loại thảo dược được xác định bằng cách đo đường kính của vòng kháng khuẩn của vi khuẩn (Oonmetta-aree *et al.*, 2006).

2.4 Nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibitory Concentration- MIC)

Hai chất chiết thảo dược có hoạt tính kháng khuẩn cao nhất được chọn để xác định nồng độ ức

chế tối thiểu (MIC). Vi khuẩn *V. harveyi* và *V. parahaemolyticus* được nuôi trong môi trường NB-1,5% NaCl. Mỗi chất chiết xuất thảo dược được pha loãng với tỉ lệ 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16,... và cho vào môi trường lỏng NB-1,5% NaCl có chứa vi khuẩn và ủ ở 28°C trong 24 giờ. Mỗi nồng độ cho mỗi loại thảo dược được lặp lại ba lần (Oometta-aree *et al.*, 2006). MIC của chất chiết thảo dược được xác định là nồng độ thấp nhất của chiết xuất trong môi trường lỏng không có vi khuẩn phát triển (Oometta-aree *et al.*, 2006).

2.5 Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (Minimum Bactericidal Concentration-MBC)

Trong thử nghiệm MIC, các độ pha loãng thảo dược ức chế sự phát triển của vi khuẩn được sử dụng để kiểm tra nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) bằng phương pháp đếm trên đĩa thạch TCBS. Mỗi loại thảo dược kết hợp với vi khuẩn được lặp lại ba lần. MBC của chiết xuất thảo dược được xác định là nồng độ thấp nhất của chiết xuất trong môi trường lỏng không có vi khuẩn phát triển (Oometta-aree *et al.*, 2006).

2.6 Định tính và định lượng một số thành phần hóa học trong chất chiết diệt hạ châu thân đò

Các nhóm hợp chất hóa học (alkaloids, flavonoids, steroid và triterpenoids, đường khử, tanins và sesquiterpene lactones) trong cao chiết diệt hạ châu thân đò được định tính bằng các phương pháp định tính các nhóm hợp chất tự nhiên (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007).

Hàm lượng polyphenols tổng trong chất chiết diệt hạ châu thân đò được xác định bằng thuốc thử

Bảng 1: Hoạt tính kháng khuẩn của các loại chất chiết thảo dược đối với vi khuẩn *V. harveyi* và *V. parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm

| Tên chất chiết | Bộ phận cây | Tên khoa học | Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) | |
|----------------------|-------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| | | | <i>V. harveyi</i> | <i>V. parahaemolyticus</i> |
| Diệt hạ châu thân đò | Lá | <i>Phyllanthus urinaria</i> L. | 19,7 ± 0,58 | 21,7 ± 1,53 |
| Lựu | Lá | <i>Punica granatum</i> | 18,3 ± 0,58 | 20,7 ± 0,58 |
| Trà xanh | Lá | <i>Camellia sinensis</i> | 14 ± 2,56 | 11,8 ± 1,92 |
| Hồng ri | | <i>Cleome spinosa</i> | 12,7 ± 0,58 | 9 ± 0,61 |
| Hoa ngũ sắc | Cả cây | <i>Ageratum conyzoides</i> | 11,3 ± 1,52 | 8,2 ± 1,3 |
| Cỏ lào | Cả cây | <i>Chromolaena odorata</i> | 9,7 ± 1,52 | 8,9 ± 0,22 |
| Tra | Lá | <i>Thespesia populnea</i> | 0 | 9,5 ± 0,35 |
| Tía tô | Lá | <i>Perilla frutescens</i> | 0 | 9,2 ± 0,84 |
| Chùm ngây | Thân | <i>Moringa oleifera</i> | 0 | 0 |
| Đu đủ | Lá | <i>Carica papaya</i> | 0 | 0 |
| Đối chứng | | Doxycyclin | 25,6 ± 1,51 | 26,4 ± 2,6 |
| Đối chứng | | Dimethyl Sulfoxide | * | * |

Kháng: ≤ 9mm; Trung bình: ≥ 10 – 13mm; Nhạy: ≥ 14mm (Lorian, 1995); Đối chứng (Doxycyclin 30 µg (DOX) và Dimethyl Sulfoxide)

Folin-Ciocalteu theo mô tả của Rebaya có hiệu chỉnh (Rebaya *et al.*, 2015). Cụ thể, thể tích 0,25 mL chất chiết diệt hạ châu (50 µg/mL) được cho vào ống eppendorf với 0,25 mL nước cất và 0,25 mL dung dịch thuốc thử Folin-Ciocalteu, lắc mạnh rồi để yên năm phút cho ổn định. Sau đó, bổ sung 0,25 mL dung dịch Na₂CO₃ 10% và ủ hỗn hợp trong 30 phút ở nhiệt độ 40°C. Sau đó, hỗn hợp được đo mật độ quang ở bước sóng 765 nm, chất đối chứng sử dụng là acid gallic.

Hàm lượng flavonoids tổng trong chất chiết diệt hạ châu thân đò được xác định theo mô tả của Zhishen có hiệu chỉnh (Zhishen *et al.*, 1999). Cụ thể, mẫu chất chiết được pha với ethanol đạt nồng độ 200 µg/mL. Tiếp theo, 1 mL dung dịch mẫu thử được cho vào ống nghiệm cùng với 1 mL nước cất và 0,2 mL dung dịch NaNO₂ 5%; sau năm phút thêm 0,2 mL dung dịch AlCl₃ 10%; sau sáu phút thêm tiếp 2 mL dung dịch NaOH 1 M và 0,6 mL nước cất. Hỗn hợp được đo mật độ quang ở bước sóng 510 nm với chất đối chứng là quercetin.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Hoạt tính kháng khuẩn của thảo dược đối với vi khuẩn *V. harveyi* và *V. parahaemolyticus*

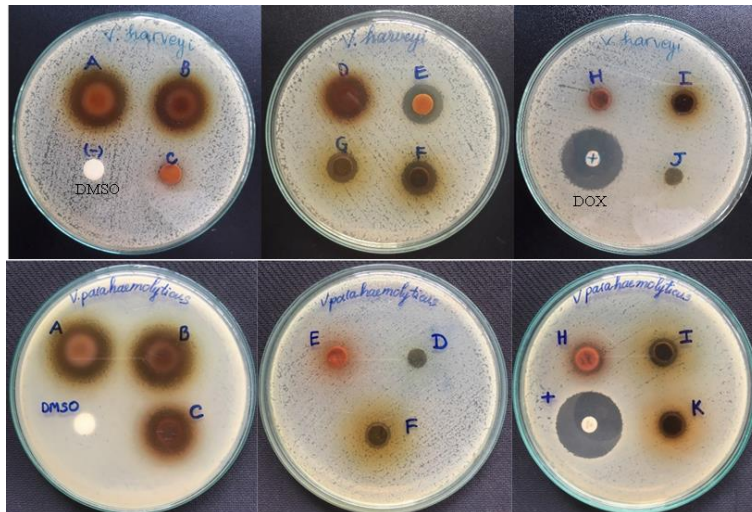
Hoạt tính kháng khuẩn *V. harveyi* và *V. parahaemolyticus* của các chất chiết thảo dược được đánh giá thông qua phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của các loại chất chiết thảo dược được trình bày ở Bảng 1.

Kết quả kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn (Bảng 1, Hình 1) ghi nhận có 3/10 loại chất chiết thảo dược có khả năng ức chế cả hai loài vi khuẩn (*V. parahaemolyticus* và *V. harveyi*) gây bệnh trên tôm, bao gồm chất chiết điệp hạ châu thân đỏ, lựu và trà xanh. Trong đó, chất chiết điệp hạ châu thân đỏ có hoạt tính kháng khuẩn cao nhất với đường kính vòng kháng khuẩn tương ứng đạt 19,7 mm cho *V. harveyi* (so với doxycycline $25,6 \pm 1,51$ mm) và 21,7 mm cho *V. parahaemolyticus* (so với doxycycline $26,4 \pm 2,6$ mm), kế đến là chất chiết lựu có đường kính kháng *V. harveyi* là 18,3 mm và *V. parahaemolyticus* là 20,7 mm, và chất chiết trà xanh có đường kính kháng *V. harveyi* là 14 mm và *V. parahaemolyticus* là 11,8 mm (Bảng 1)

Chất chiết điệp hạ châu (*P. urinaria*) từ lá, thân và rễ đã được công bố có khả năng kháng khuẩn được cả vi khuẩn gram âm (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *V. parahaemolyticus*) và gram dương (*Staphylococcus aureus*) (Cruz *et al.*, 1994). Điệp hạ châu thân đỏ chứa nhiều chất hóa học lignans, tannin, flavonoid, phenolics, terpenoids và một số chất chuyển hóa thứ cấp khác. Về tác dụng dược học, điệp hạ châu thân đỏ được xác định có khả năng chống ung thư, bảo vệ gan, chống đái tháo đường, kháng khuẩn và tác dụng bảo vệ tim mạch (Geethangili and Ding, 2018). Cụ thể, *Phyllanthus urinaria* được xác định có chứa một số hợp chất giúp điều hòa miễn dịch (Phyllanthin, Geraniin,

Corilagin), kháng viêm (Phyllanthin, Corilagin, Quercetin, Rhamnocitrin, Methylgallate), bảo vệ gan (Phyllanthin, Corilagin). Vậy nên, từ rất lâu điệp hạ châu đã được sử dụng rộng rãi trong hệ thống thảo dược làm thuốc điều trị bệnh cho người và động vật (Unander *et al.*, 1990).

Tương tự, chất chiết lựu cũng thể hiện được khả năng kháng vi khuẩn cao và được ghi nhận hiệu quả trong y học cổ truyền ở các khu vực thuộc Mỹ, châu Âu, châu Phi và châu Á (Olapour and Najafzadeh, 2010). Các bộ phận khác nhau của cây lựu (vỏ và rễ) có chứa tanin, alkaloid và polyphenol, các hợp chất này có hoạt động kháng khuẩn mạnh (Ahmad and Beg, 2001; Naz *et al.*, 2007); hạt lựu có chứa steroid; bột quả chứa vitamin, khoáng chất và đại phân tử như chất béo, protein và carbohydrate (Lama *et al.*, 2001). Theo Prashanth *et al.* (2001) chất chiết vỏ lựu từ dung môi methanol có khả năng kháng khuẩn đối với *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* tốt hơn trong các dung môi khác (nước, diethyl ether), với đường kính vòng kháng khuẩn 13 - 20 mm. Tương tự, chất chiết methanol từ vỏ lựu ở nồng độ 25 µg và 50 µg được xác định có khả năng kháng với vi khuẩn gram dương (*S. aureus*) và vi khuẩn gram âm (*P. aeruginosa*, *E. coli*) (Sajjad *et al.*, 2015). Một nghiên cứu khác của Dahham *et al.* (2010) chiết xuất methanol từ quả lựu có khả năng kháng nấm *Aspergillus niger*, *Melilotus indicus*, *Penicillium citrinum* và *Trichoderma reesei*.



Hình 1: Khả năng kháng vi khuẩn *V. harveyi* và *V. parahaemolyticus* của một số chất chiết thảo dược

(A) Điệp hạ châu, (B) Lựu, (C) Chùm ngây, (D) Trà xanh, (E) Hồng ri, (G) Cỏ lào, (F) Cỏ hôi, (H) Tra, (I) Tia tô, (J) Đu đủ

Chất chiết trà xanh cũng được ghi nhận có hiệu quả kháng nhiều loài vi khuẩn gây bệnh ở động vật thủy sản (Toda *et al.*, 1989; Xi *et al.*, 2012;

Yiannakopoulou, 2012). Cụ thể, dịch chiết trà xanh có khả năng ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* với đường kính vòng kháng khuẩn từ 14,4 đến 16,4

mm; và được đánh giá có tiềm năng kiểm soát *V. parahaemolyticus* trong quá trình ương tôm thẻ chân trắng ở giai đoạn giống (Kongchum *et al.*, 2016). Ngoài ra, việc bổ sung trà xanh vào thức ăn sẽ giúp tăng cường khả năng miễn dịch không đặc hiệu và kháng lại vi khuẩn *V. carchariae* gây bệnh trên cá mú (Harikrishnan *et al.*, 2011).

Mặc dù, hồng ri, hoa ngũ sắc được ghi nhận có khả năng kháng với các chủng vi khuẩn gây bệnh gram âm, gram dương và một số loài nấm (Megil *et al.*, 2010; Juliana *et al.*, 2010). Tuy nhiên, kết quả ghi nhận ở Bảng 1 cho thấy nhóm chất chiết từ cây hồng ri, hoa ngũ sắc chỉ có khả năng kháng với một trong hai loài vi khuẩn khảo sát với hoạt tính kháng khuẩn trung bình (11-12 mm).

Kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn cũng ghi nhận chất chiết cỏ lào thể hiện hoạt tính kháng khuẩn yếu. Riêng chất chiết từ tra, tía tô, đu đủ và chùm ngây không thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với *V. harveyi* (0 mm). Chất chiết từ đu đủ và chùm ngây không thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với *V. parahaemolyticus* (0 mm).

Nhóm thực vật tra, tía tô, đu đủ, chùm ngây được sử dụng làm gia vị, thực phẩm, cũng như vị thuốc cho con người (Đỗ Tất Lợi, 2004), nhóm thực vật này cũng phổ biến ở ĐBSCL. Trong nghiên cứu này

chất chiết tra, tía tô, đu đủ, chùm ngây không thể hiện hiệu quả về hoạt tính kháng vi khuẩn *Vibrio* spp. gây bệnh trên tôm. Mặc dù, Jahn *et al.* (1986) đã xác định được một số hoạt chất có khả năng diệt khuẩn từ chùm ngây như pterygospermin, moringine và glycosides 4-(α -L- rhamnosyloxy)-benzylisothiocyanate và 4-(α -L- rhamnosyloxy)-phenylacetonitril, có khả năng ức chế *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium phlei*, *Serratia marcescens*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Shigella*.

Hiệu quả kháng khuẩn của chất chiết thảo dược có thể tùy thuộc vào loài thực vật, bộ phận cây sử dụng chiết xuất và dung môi chiết xuất. Cụ thể, (i) dịch trà mầm trích bằng nước kháng khuẩn tốt hơn dịch trà mầm trích bằng cồn và dịch trích hạt trà mầm kháng khuẩn tốt hơn dịch trích lá (Triệu Thị Thanh Hằng *et al.*, 2018); (ii) hoạt tính kháng khuẩn của chất chiết rễ đu đủ (*Carica papaya*) từ nước, acetone và methanol thay đổi tùy vào dung môi chiết xuất, với chất chiết trong dung môi methanol có hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất với vi khuẩn *Salmonella typhi* (vòng kháng khuẩn 14 mm). Chất chiết từ rễ đu đủ bằng methanol có chứa nhiều hợp chất (saponins, alkaloids, tannin và phenol) trong khi chất chiết với dung môi acetone chứa saponin, glycoside và chất chiết trong nước chỉ chứa glycoside (Doughari *et al.*, 2007).

Bảng 2: Hoạt tính kháng khuẩn của các loại chất chiết thảo dược đối với vi khuẩn *V. harveyi* phân lập từ nhiều nguồn khác nhau

| Chủng <i>V. harveyi</i> | Tỉnh | TCBS | Môi trường phát quang | PCR <i>V. harveyi</i> | Mẫu | Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) | |
|-------------------------|----------|------|-----------------------|-----------------------|------|----------------------------------|-------------|
| | | | | | | Diệp hạ châu thân đỏ | Lựu |
| 2.1 | Bạc Liêu | Xanh | + | + | Tôm | 24,3 ± 0,58 | 19,0 ± 1,00 |
| 2.2 | Bạc Liêu | Xanh | + | + | Nước | 24,0 ± 0,00 | 19,0 ± 0,00 |
| T2018-1 | Cà Mau | Xanh | + | + | Tôm | 19,7 ± 2,31 | 22,7 ± 0,58 |
| T2018-2 | Cà Mau | Xanh | + | + | Nước | 28,3 ± 0,58 | 22,3 ± 0,58 |
| T2018-3 | Cà Mau | Xanh | + | + | Nước | 20,7 ± 2,31 | 20,0 ± 2,00 |

Tiếp tục thử nghiệm khảo sát khả năng kháng khuẩn của chất chiết diệp hạ châu và lựu trên năm chủng vi khuẩn *V. harveyi* phân lập từ mẫu tôm, nước. Kết quả Bảng 2 cho thấy chất chiết diệp hạ châu thân đỏ có khả năng ức chế năm chủng vi khuẩn *V. harveyi* với đường kính vòng vô khuẩn cao hơn so với chất chiết lựu. Kết quả này tương tự với kết quả xác định hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch.

Tóm lại, từ kết quả sàng lọc khả năng kháng khuẩn từ 10 loại thảo dược cho thấy chất chiết diệp hạ châu, lựu, trà xanh cho kết quả tốt nhất, có khả năng kháng đồng thời cả hai loài *Vibrio* spp. thường

gây bệnh trên tôm với đường kính vòng kháng khuẩn rộng.

3.2 Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của chất chiết diệp hạ châu và lựu đối với vi khuẩn *V. harveyi* và *V. parahaemolyticus*

Chất chiết diệp hạ châu và lựu có hoạt tính kháng khuẩn cao được chọn để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) đối với *V. harveyi* và *V. parahaemolyticus*. Kết quả ghi nhận: chất chiết diệp hạ châu và lựu có khả năng ức chế vi khuẩn *V. harveyi* tương ứng với nồng độ 0,095 mg/ml và 0,19 mg/ml, và ức chế vi khuẩn *V.*

parahaemolyticus ở cùng nồng độ 0,39 mg/ml (Bảng 3).

Kết quả MBC cho thấy chất chiết diệp hạ châu và lựu có hiệu lực kìm khuẩn, *V. harveyi* và *V. parahaemolyticus* (Bảng 3). Theo Canillac and Mourey (2001), tỷ lệ MBC/MIC nhỏ hơn hoặc bằng 4, chất chiết có khả năng diệt khuẩn. Ngược lại, tỷ

lệ này lớn hơn 4 có tác dụng kiểm khuẩn. Kết quả nghiên cứu cho thấy chất chiết diệp hạ châu và lựu có khả năng kìm khuẩn *V. harveyi* và *V. parahaemolyticus*. Kamel (2001) cho rằng nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu đối với các chủng vi khuẩn gây bệnh có liên quan đến nồng độ hoạt chất và độ tinh khiết của chất chiết.

Bảng 3 Kết quả xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của diệp hạ châu và lựu

| Thảo dược | MIC (mg/ml) | MBC (mg/ml) | MBC/MIC |
|----------------------------|-------------|-------------|---------|
| <i>V. harveyi</i> | | | |
| Diệp hạ châu thân đỏ | 0,09 | 6,25 | >4 |
| Lựu | 0,19 | 6,25 | >4 |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | | | |
| Diệp hạ châu thân đỏ | 0,39 | 6,25 | >4 |
| Lựu | 0,39 | 12,5 | >4 |

Kết quả tương tự cũng được ghi nhận qua khảo sát so sánh hiệu quả diệt khuẩn giữa chất chiết xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*) và diệp hạ châu (*Phyllanthus urinaria* L.) (Direkbusarakom *et al.*, 1998). Trong đó, giá trị MIC trên vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* của chất chiết xuyên tâm liên và diệp hạ châu giống nhau với cùng nồng độ từ 2,5 mg/mL đến 10 mg/mL. Tuy nhiên, khả năng ức chế vi khuẩn *V. harveyi* của chất chiết diệp hạ châu cao hơn so với chất chiết xuyên tâm liên về số lượng chủng được ức chế. Cụ thể, diệp hạ châu với MIC = 5 mg/ml và 10 mg/ml có khả năng ức chế lần lượt là hai và chín chủng vi khuẩn. Chất chiết xuyên tâm liên ở nồng độ MIC = 5 mg/ml ức chế 1 chủng và MIC = 10 mg/ml ức chế bảy chủng. Ngoài ra, diệp hạ châu còn được xác định có tác dụng chống lại virus gây bệnh đầu vàng (Yellow head virus) với nồng độ ức chế tối thiểu MIC= 1 mg/ml (Direkbusarakom *et al.*, 1997). Lý Thị Thanh Loan

(2011) cho rằng diệp hạ châu có khả năng ức chế tác nhân gây bệnh đục thân trên tôm càng xanh là MrNV (*Macrobrachium rosenbergii nodavirus*) và XSV (*Extra small virus*) thông qua tác dụng phá vỡ vỏ protein bên ngoài của MrNV và XSV, gây ly giải vật liệu di truyền là RNA, vì thế virus không còn cấu trúc nguyên vẹn để xâm nhập vào cơ thể tôm, giảm khả năng gây bệnh đục thân trên ấu trùng tôm càng xanh.

Đối với chiết xuất lựu, Al-Zoreky (2009) xác định chiết xuất vỏ lựu bằng methanol (80%) có khả năng ức chế mạnh đối với *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* và *Yersinia enterocolitica*. Trong đó, nồng độ ức chế tối thiểu đối với *Salmonella enteritidis* là cao nhất MIC = 4 mg/ml, với *S. aureus* MIC = 2 mg/ml, nồng độ ức chế tối thiểu với *L. monocytogenes* và *Yersinia enterocolitica* lần lượt là 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml.

Bảng 4: Kết quả định tính thành phần hóa học trong chất chiết diệp hạ châu thân đỏ

| Nhóm chất | Thuốc thử | Phản ứng | Kết luận |
|-------------------------|----------------------|-----------------------------|----------|
| Alkaloids | Dragendorff | Kết tủa nâu cam | + |
| | Wagner | Kết tủa nâu | + |
| Flavonoids | FeCl ₃ 5% | Kết tủa nâu đỏ hay xanh đen | + |
| | NaOH 1% | Dung dịch vàng, cam đến đỏ | + |
| Steroid và Triterpenoid | Liebermann-Burchard | Dung dịch đỏ cam | + |
| | Rosenthaler | Dung dịch xanh lục hoặc tím | + |
| Đường khử | Tollens | Có kết tủa đen Ag | + |
| | Fehling | Kết tủa đỏ gạch | + |
| | Keller-Killiani | Dung dịch có màu xanh lục | + |
| Tanins | Gelatin mặn | Kết tủa bông trắng | + |
| | Chì acetate bão hòa | Kết tủa bông trắng | + |
| Sesquiterpene lactones | Legal | Dung dịch hồng đến đỏ đậm | + |

+ : Dương tính

Chất chiết diệt hạ châu thân đỏ có kết quả hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất nên được chọn để định tính và định lượng một số thành phần hóa học. Kết quả ghi nhận chất chiết diệt hạ châu thân đỏ có chứa các thành phần như alkaloids, flavonoids, steroid và triterpenoids, đường khử, tanins và sesquiterpene lactones (Bảng 4). Kết quả định lượng được xác định với hàm lượng polyphenols tổng là $28,6 \pm 0,9$ mg GAE/g và flavonoids tổng là $341 \pm 2,4$ mg QE/g. Kết quả cho thấy hàm lượng polyphenol và flavonoid trong chất chiết diệt hạ châu thân đỏ có hàm lượng cao. Các hợp chất alkaloids, glycosides, polyphenols, và terpenes chiết xuất từ thực vật đã được xác định có khả năng kháng khuẩn (Ahn, 2017). Do vậy, kết quả định tính và định lượng một số thành phần hóa học giúp giải thích thêm về kết quả hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất của chất chiết diệt hạ châu thân đỏ.

Trong thực tế, kết quả khảo sát ghi nhận người nuôi tôm tỉnh Quảng Ninh và Nghệ An đã sử dụng diệt hạ châu bằng cách đun sôi và trộn vào thức ăn hàng ngày cho tôm để phòng bệnh gan tụy cấp và tăng cường miễn dịch cho tôm nuôi (Tran Thi Kim Chi *et al.*, 2017). Thông qua các kết quả đạt được, chất chiết diệt hạ châu và lựu có thể sử dụng như chất có khả năng kim khuẩn và có tiềm năng là nguồn dược chất giúp tôm nuôi tăng khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio* spp. gây bệnh.

4 KẾT LUẬN

4.1 Kết luận

Chất chiết diệt hạ châu thân đỏ (*P. urinaria*), lựu (*P. granatum*) và trà xanh (*C. sinensis*) chiết xuất bằng dung môi methanol có khả năng kháng đồng thời hai loài vi khuẩn thường gây bệnh cho tôm nuôi (*V. harveyi* và *V. parahaemolyticus*).

Chất chiết diệt hạ châu thân đỏ có hoạt tính kháng *V. harveyi* (nồng độ MIC = 0,09 mg/ml và MBC = 6,25 mg/ml), và *V. parahaemolyticus* (nồng độ MIC = 0,39 mg/ml và MBC = 6,25 mg/ml). Chất chiết lựu có hoạt tính kháng *V. harveyi* (nồng độ MIC = 0,19 mg/ml và MBC = 6,25 mg/ml), và *V. parahaemolyticus* (nồng độ MIC = 0,39 mg/ml và MBC = 12,5 mg/ml)

Các chất chiết hồng ri (*Cleome spinosa*), hoa ngũ sắc (*Agerantun conyzoides*), cỏ lào (*Chromlacna odorata*), trà (*Thespesia populnea*), tía tô (*Perilla frutescens*), đu đủ (*Carica papaya*), chùm ngây (*Moringa oleifera*) không có hoạt tính kháng khuẩn *V. harveyi* và *V. parahaemolyticus*.

Chất chiết diệt hạ châu thân đỏ được xác định có chứa các thành phần hóa học alkaloids, flavonoids, steroid và triterpenoids, đường khử, tanins và sesquiterpene lactones. Trong đó, hàm lượng polyphenol tổng là $28,6 \pm 0,9$ mg GAE/g và flavonoids tổng là $341 \pm 2,4$ mg QE/g.

4.2 Đề xuất

Khảo sát khả năng tăng cường miễn dịch và sức đề kháng với mầm bệnh *V. harveyi* và *V. parahaemolyticus* của tôm biển khi cho ăn thức ăn bổ sung chất chiết từ diệt hạ châu và lựu.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài này được tài trợ bởi Dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 bằng nguồn vốn vay ODA từ chính phủ Nhật Bản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmad, I., Beg, A. Z., 2001. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J. Ethnopharmacol.* 74: 113-133.
- Ahn, S., 2017. Biosynthesis, characterization, and bioactivities evaluation of silver and gold nanoparticles mediated by the roots of Chinese herbal *Angelica pubescens* Maxim. *Nanoscale Research Letter.* 12: 46
- Al-Zoreky, N. S., 2009. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology.* 134(3): 244–248.
- Aoki, T., 1988. Drug resistance plasmids from fish pathogens. *Microbiol Sciences.* 5: 219–223.
- Chakraborty, S.B., Hancz, C., 2011. Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. *Reviews in Aquaculture.* 3: 103-119.
- Canillac, N., and Mourey, A., 2001. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology.* 18(3): 261-268.
- Citarasu, T., 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International.* 18: 403-414.
- Cruz, A.B., Moretto, E., Cechinel, F. V., Niero, R., Montanari, J.L. and Yunes R.A., 1994. Antibacterial activity of *Phyllanthus urinaria*. *Fitoterapia.* 65(5): 461-462.
- Dahham, S. S., Ali, M. N., Tabassum, H., Khan, M., 2010. Studies on antibacterial and antifungal activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.). *American-Eurasian J. Agric. & Environ.* 9(3): 273-281.

- Direkbusarakom, S., Herunsalee, A., Boonyaratpalin, S., Danayadol, Y., Aekpanithanpong, U., 1997. Effect of *Phyllanthus* spp against yellow-head baculovirus infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Health Section. Asian Fisheries Society*. 81-88.
- Direkbusarakom S., Y. Ezura Y., Yoshimizu M. and Herunsalee A., 1998. Efficacy of Thai traditional herb extracts against fish and shrimp pathogenic bacteria. *Fish Pathology*. 33 (4): 437-441.
- Đỗ Tất Lợi, 2004. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản y học.
- Doughari, J. H., Elmahmood, A. M., and Manzara, S., 2007. Studies on the antibacterial activity of root extracts of *Carica papaya* L.. *African Journal of Microbiology Research*. 37- 41.
- Geethangili, M., and Ding, S.T., 2018. A Review of the Phytochemistry and Pharmacology of *Phyllanthus urinaria* L. *Frontiers in Pharmacology*. 9: 1109. doi:10.3389/fphar.2018.01109
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C. and Heo, M.S., 2011. Influence of diet enriched with green tea on innate humoral and cellular immune response of kelp grouper (*Epinephelus bruneus*) to *Vibrio carchariae* infection. *Fish and Shellfish Immunology*. 30: 972-979.
- Jahn, S.A., Musnad, H.A. and Burgstaller, H., 1986. The tree that purifies water: cultivating multipurpose *Moringaceae* in the Sudan. *Unasylva*. 38(152): 23-28.
- Juliana, H.C.N., Edlayne, G., Silvia, R.G., Roseane, F., Márcia, O.M.M, Joana, D.F., 2010. *Ageratum conyzoides* essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus*. *International Journal of Food Microbiology*. 137(1): 55-60.
- Kamel, C., 2001. Tracing modes of action and the roles of plant extracts in nonruminants. *Recent advances in Animal nutrition*. 135-150.
- Kha, N.H.N., 2012. Molecular characterization of antibiotic resistant bacteria isolated from farmed catfish and humans in Vietnam, PhD thesis. RMIT University, Australia.
- Kongchum, P., Chintong S., Chareansak N. and Subprasert P., 2016. Effect of green tea extract on *Vibrio parahaemolyticus* inhibition in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 11: 117-124.
- Lama, Y. C., Ghimire S. K., Thomas Y. A., 2001. Medicinal plants of dolpo: Amchis' knowledge and conservation. People and Plants, and WWF Nepal Program, Kathmandu.
- Lý Thị Thanh Loan, 2011. Xác định tác nhân chính gây bệnh và đề xuất qui trình phòng và trị bệnh đực thân trên tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii*). *Cục thông tin khoa học và công nghệ quốc gia*.
- Megil, J. M. N., Roy, B. R., Lawrence, A. D., and Lois, R., 2010. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from *Cleome spinose*. *Natural Product Communications*. 5(8): 1301-1306.
- Naz, S., Siddiqi, R., Ahmad, S., Rasool, S.A. and Sayeed, S.A., 2007. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. *Journal of food science*. 72(9): M341-M345.
- Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007. Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh
- Olapour, S., Najafzadeh, H., 2010. Evaluation analgesic, anti-inflammatory and antiepileptic effect of hydro alcoholic peel extract of *Punica granatum* (Pomegranate). *Asian. J. Med. Sci*. 2: 266- 270.
- Onmetta-Aree, J., Suzuki, T., Gasaluck, P. and Eumkeb, G., 2006. Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* L.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT-Food Science and Technolog*. 39(10): 1214-1220.
- Prashanth, D., Asha, M. K., and Amit, A., 2001. Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Microbiology Laboratory, Research & Development Centre, Natural Remedies Pt. Ltd. Fitoterapia*. 72: 171 – 173.
- Rebaya, A., Belghith, S.I., Baghdikian, B., Leddet, V.M., Mabrouki, F., Olivier, E., Cherif, J.K., and Ayadi, M.T., 2015. Total phenolic, Total flavonoid, tannin content, and antioxidant capacity of *Halimium halimifolium* (Cistaceae). *Journal of Applied pharmaceutical science*. 5(1): 52-57.
- Sajjad, W., Sohail M., Ali B., Haq A., Din G., Hayat M., Khan I., Ahmad M. and Khan S., 2015. Antibacterial activity of *Punica granatum* peel extract. *Mycopath*. 13(2): 105-111.
- Sarter, S., Kha, N.H.N., Hung L.T., Lazard, J. and Didier Montet., 2007. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. *Food Control*. 18(11): 1391-1396.
- Syahidah, A., Saad, C.R., Daud, H.M. and Abdelhadi, Y.M., 2015. Status and potential of herbal applications in aquaculture: A review. *Iran J Fish Sci*. 14: 27-44.
- Toda, M., Okubo, S., Ohnishi, R. and Shimamura, T., 1989. Antibacterial and bactericidal activities of Japanese green tea. *Japanese journal of bacteriology*. 44: 669-72.
- Tổng cục thủy sản Việt Nam, 2019. Tổng cục Thủy sản sơ kết 6 tháng đầu năm 2019.

- Trần Thị Kim Chi, Jesper H. Clausena, Phan Thị Van, Britt Tersbøl, Anders Dalsgaard, 2017. Use practices of antimicrobials and other compounds by shrimp and fish farmers in Northern Vietnam. *Aquaculture Reports*. 7:40–47.
- Triệu Thị Thanh Hằng, Nguyễn Công Tráng, Cao Tuấn Đức và Lê Thị Thủy Vy, 2018. Khả năng kháng một số loài vi khuẩn gây bệnh trên động vật thủy sản của dịch trích từ lá và hạt cây trâm bầu (*Combretum quadrangulare*) trong điều kiện *in vitro*. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 54(2): 151-157.
- Unander, D.W., Werster, G.L. and Blumberg, B.S., 1990. Records of usage or assays in *Phyllanthus* (*Euphorbiaceae*) I. Subgenera *Isocladus*, *Kirganelia*, *Cicca* and *Emblica*. *Journal of Ethnopharmacology*. 30: 233-260.
- VASEP, 2017. Báo cáo ngành tôm Việt Nam năm 2017, xu hướng năm 2018.
- Xi, D., Liu, C. and Su, Y.C., 2012. Effects of green tea extract on reducing *Vibrio parahaemolyticus* and increasing shelf life of oyster meats. *Food Control*. 25: 368–373.
- Yiannakopoulou, E.C., 2012. Recent patents on antibacterial, antifungal and antiviral properties of tea. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*. 7: 60–65.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*. 64(4): 555-559.