



KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN CỦA CAO CHIẾT TỪ CÂY DIỆP HẠ CHÂU (*Phyllanthus amarus*) ĐỐI VỚI VI KHUẨN *Vibrio alginolyticus* GÂY BỆNH XUẤT HUYẾT TRÊN CÁ HỒNG MỸ (*Sciaenops ocellatus*)

Phạm Thị Hải Yến¹, Nguyễn Duy Quỳnh Trâm¹, Nguyễn Anh Hiếu², Nguyễn Quang Linh^{3*}

¹ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

² Vụ Khoa học và Công nghệ các ngành Kinh tế – Kỹ thuật, Bộ Khoa học và Công nghệ, 113 Trần Duy Hưng, Hà Nội, Việt Nam

³ Đại học Huế, 3 Lê Lợi, Huế, Việt Nam

Tóm tắt. Cá Hồng mỹ (*Sciaenops ocellatus*) là loài cá biển có giá trị kinh tế cao và là đối tượng nuôi phổ biến ở Việt Nam. Bệnh xuất huyết, lở loét do vi khuẩn *Vibrio alginolyticus* đang là thách thức chính cho nghề nuôi cá Hồng mỹ tại Thừa Thiên Huế. Nghiên cứu này xác định hoạt tính kháng vi khuẩn của cao chiết từ cây Diệp hạ châu (*Phyllanthus amarus*) đối với 5 chủng *V. alginolyticus* được xác định là tác nhân gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ. Cao chiết Diệp hạ châu trong dung môi Ethanol ở các nồng độ 100 – 500 mg/mL đều có khả năng kháng vi khuẩn *V. alginolyticus*, cao nhất ở nồng độ 500 mg/mL với đường kính vòng kháng lớn nhất ($p < 0,05$). Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) dao động từ 6,25 đến 25 mg/mL; nồng độ tiêu diệt tối thiểu (MBC) dao động từ 25 đến 50 mg/mL; tỷ lệ MBC/MIC từ 2 đến 4. Nồng độ cao chiết từ 50 đến 2.000 mg/mL cũng an toàn đối với cá Hồng mỹ ở giai đoạn giống. Từ đó có thể thấy cao chiết từ cây Diệp hạ châu có tiềm năng ứng dụng trong việc phòng và trị bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ nói riêng và cá biển nói chung nhằm hướng đến việc hạn chế sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản.

Từ khoá: cá Hồng mỹ, kháng khuẩn, *Phyllanthus amarus*, *Vibrio alginolyticus*

1 Đặt vấn đề

Nghề nuôi cá biển của Việt Nam đang phát triển nhanh chóng về cả diện tích và quy mô, đã góp phần quan trọng trong kim ngạch xuất thủy sản nước ta, trong đó cá Hồng mỹ (*Sciaenops ocellatus*) là loài cá biển có giá trị kinh tế cao và đang được nuôi phổ biến ở Việt Nam, trong đó tập trung nuôi nhiều ở một số tỉnh từ Bà Rịa – Vũng Tàu đến Quảng Ninh. Việc phát triển nghề nuôi cá biển dẫn đến tình trạng phát sinh dịch bệnh ngày càng khó kiểm soát. Kết quả điều tra hiện trạng cá biển nuôi lồng ở Thừa Thiên Huế năm 2019 của Phạm Thị Hải Yến và cs. [1] cho thấy cá nước mặn – lợ nuôi lồng thường mắc bệnh xuất huyết, lở loét (chiếm 76,70%). Tác nhân gây bệnh trên cá Hồng mỹ nuôi lồng ban đầu được xác định là vi khuẩn *Vibrio* [2–4]. *Vibrio* được

* Liên hệ: nguyenquanglinh@hueuni.edu.vn

xem là một trong những tác nhân nguy hiểm gây ra những tổn thất nghiêm trọng đối với cá [5]. Các chủng vi khuẩn *Vibrio* cũng là tác nhân gây bệnh phổ biến trên các loài cá biển nuôi lồng như cá Bóp (*Rachycentron canadum*) và cá Mú (*Epinephelus coioides*) [6, 7]. *V. alginolyticus* còn được xác định là tác nhân gây bệnh xuất huyết trên một số loài cá biển: cá Mú (*E. fuscoguttatus*) [8], cá Hồng (*Lutjanus erythropterus*) [9] và cả loài ốc biển (*Halotis diversicolor*) [10]. Gần đây, Phạm Thị Hải Yến và cs. [4] đã xác định tác nhân gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ nuôi tại Thừa Thiên Huế là *V. alginolyticus* mang các gen độc lực thermostable direct hemolysin (*tdh*); TDH-related hemolysin (*trh*); thermolabile hemolysin (*tlh*) và toxin operon (*toxR*). Phạm Thị Hải Yến và cs. [1] cũng cho thấy khi cá nuôi lồng mắc bệnh, hầu hết hộ dân đều không sử dụng các biện pháp trị bệnh hoặc sử dụng kháng sinh, nhưng tỷ lệ khỏi bệnh khá thấp (<40%). Hiện nay, nhiều nghiên cứu trên thế giới và cả Việt Nam đều có xu hướng sử dụng thảo dược giúp cho động vật thủy sản tăng trưởng tốt, tăng khả năng miễn dịch và ức chế được vi khuẩn gây bệnh [11]. Đồng thời, xu hướng này còn hướng đến việc thay thế kháng sinh trong phòng trị bệnh động vật thủy sản bởi vì sử dụng kháng sinh thường sẽ tạo ra những chủng vi khuẩn kháng thuốc, gây tồn dư, giảm chất lượng sản phẩm và ảnh hưởng đến sức khỏe cho người sử dụng [12]. Thảo dược được xem là giải pháp an toàn trong phòng và trị các bệnh vi khuẩn trên động vật thủy sản, không gây ô nhiễm môi trường và đảm bảo an toàn thực phẩm. Các nghiên cứu cho thấy cao chiết của cây Diệp hạ châu (*P. amarus*) không những có khả năng kháng các chủng vi khuẩn *Vibrio* spp. gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND/EMS) trên tôm mà còn có tác dụng làm tăng hoạt tính bổ thể của tế bào bạch cầu cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) [13–15]. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá hoạt tính kháng vi khuẩn *V. alginolyticus* gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ, làm cơ sở khoa học cho việc ứng dụng thảo dược trong phòng, trị bệnh xuất huyết trên cá biển nói chung và cá Hồng mỹ nói riêng.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Chủng vi khuẩn: các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus*-YVL22, *V. alginolyticus* - YVL24 và *V. alginolyticus*-YH44 được xác định mang các gen độc (*toxR*, *tdh*, *trh* và *tlh*) và 2 chủng *V. alginolyticus*-YHD1 và *V. alginolyticus*-YHD3 được phân lập từ cá Hồng mỹ bị bệnh xuất huyết [4], được bảo quản trong glycerol 10% ở -20 °C.

Bột cây Diệp hạ châu khô được chiết xuất tại Phòng thí nghiệm Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, cung cấp. Nguyên liệu khô được xay mịn bằng máy xay chuyên dụng, sau đó bột nguyên liệu được cho qua rây có kích thước $d = 1$ mm, được bảo quản trong túi polyethylene đặt trong hộp nhựa kín, lưu trữ ở nhiệt độ phòng phục vụ quá trình nghiên cứu.

2.2 Phương pháp

Xác định một số chỉ tiêu sinh lý, sinh hoá cơ bản

Các đặc điểm sinh lý, sinh hoá cơ bản gồm: nhuộm Gram, oxidase, catalase, oxidase/fermentation (O/F), khả năng di động bằng giọt treo và khả năng dung huyết bằng nuôi cấy trên môi trường thạch có bổ sung 5% máu ngựa được thực hiện theo phương pháp của Buller [16]. Các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* được Phòng thí nghiệm miễn dịch và Vắc xin, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, cung cấp. Trước khi sử dụng trong các thử nghiệm kháng khuẩn, các chủng vi khuẩn được tái định danh bằng kit API 20E (Bio-Mérieux, Pháp) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các phản ứng được tiến hành ở 28°C; đọc kết quả sau 24 giờ và xác định một số đặc điểm sinh hoá cơ bản.

Ngoài ra, một số phản ứng sinh hoá cũng được tiến hành nhằm tìm hiểu đầy đủ các đặc điểm của các chủng *Vibrio* phân lập được, bao gồm: Voges-Proskauer, lên men các loại carbohydrat với môi trường lỏng màu tím (Difco, UK) và bổ sung 5% lần lượt các loại đường glucose, fructose, galactose, glucose, glycerol, maltose, mannose hoặc ribose. Khả năng phát triển của các chủng *Vibrio* ở các nồng độ muối khác nhau được tiến hành trên môi trường TSB bổ sung lần lượt 0, 1, 6, 8 và 10% NaCl. Các chủng vi khuẩn do Buller phân lập được sử dụng để so sánh kết quả sinh hoá với các chủng vi khuẩn *Vibrio* phân lập được trong nghiên cứu này.

Xác định hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết cây Diệp hạ châu

Chuẩn bị cao chiết: bột nguyên liệu được ngâm trong dung môi ethanol 70% với tỷ lệ 1:5 trong 96 giờ, sau đó dịch chiết được lọc qua giấy Whatman số 4 (code: 1004042, kích thước lỗ giấy 20–25 µm) bằng hệ thống lọc chân không (Rocker 300-LF31), sau đó được cô quay chân không để loại bỏ dung môi bằng hệ thống cô quay chân không Heidolph của Đức và thu được cao chiết tổng [17].

Chuẩn bị vi khuẩn: các chủng vi khuẩn sau khi được tái định danh bằng bộ kit API 20E (Bio-Mérieux, Pháp) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, được cấy trên môi trường Tryptic Soy Agar (TSA, Himedia, Ấn Độ) ở 28 °C trong 24 giờ. Sau đó, lấy một khuẩn lạc rời trên đĩa thạch và tiến hành nuôi cấy tăng sinh trong 5 mL môi trường Tryptic Soy Broth (TSB, Himedia, Ấn Độ) có bổ sung 2% NaCl, ở 28 °C trong 24 giờ trong tủ nuôi lắc với tốc độ 150 vòng/phút. Sau đó, tiến hành xác định mật độ tế bào vi khuẩn bằng phương pháp đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 600 nm trên máy quang phổ UV-VIS (U2900, Hitachi, Nhật Bản). Mật độ tế bào trong môi trường nuôi cấy được điều chỉnh đến giá trị OD = 1 bằng nước muối sinh lý. Mật độ vi khuẩn được xác định theo phương pháp đếm khuẩn lạc của Miles và cs. [18].

Xác định khả năng kháng khuẩn của cao chiết

Khả năng kháng khuẩn của cao chiết cây Diệp hạ châu được thực hiện theo phương pháp khuếch tán giếng thạch trên môi trường Mueller-Hinton Agar (MHA, Himedia, Ấn Độ) [19, 20]. Lấy 100 μ L dung dịch vi khuẩn ở mật số 10^6 CFU/mL, dàn đều trên đĩa thạch MHA và để ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Dùng ống thủy tinh đục các lỗ trên đĩa thạch với đường kính 6 mm. Nhỏ 100 μ L cao chiết cây Diệp hạ châu với các nồng độ 500, 400, 300, 200 và 100 mg/mL vào các lỗ thạch trên đĩa môi trường đã cấy vi khuẩn. Ở mẫu đối chứng âm chỉ cho nước cất mà không bổ sung cao chiết vào giếng. Mẫu đối chứng dương được chuẩn bị bằng cách dùng kẹp khử trùng gấp đĩa giấy có tấm kháng sinh Tetracycline 30 μ g (Te) cho vào lỗ đục trên đĩa môi trường. Mỗi nồng độ cao chiết và kháng sinh được bố trí trên ba đĩa thạch. Sau đó, các đĩa thạch chứa vi khuẩn, cao chiết và kháng sinh được nuôi cấy ở 28 °C và kiểm tra đường kính vòng kháng khuẩn sau 24 giờ.

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ tiêu diệt tối thiểu

Từ thí nghiệm thử hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết, nồng độ cao chiết với vòng kháng khuẩn nhỏ nhất sẽ được sử dụng cho thí nghiệm xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC – Minimum Inhibitory Concentration) và nồng độ tiêu diệt tối thiểu (MBC – Minimum Bactericidal Concentration) trên đĩa nhựa 96 giếng với các nồng độ cao chiết khác nhau với 0,01% thuốc nhuộm resazurin [21, 17]. Nồng độ ức chế tối thiểu là nồng độ thảo dược thấp nhất tại giếng không có sự đổi màu của resazurin. Nồng độ tiêu diệt tối thiểu được xác định như sau: toàn dịch thử nghiệm trên các giếng không có sự đổi màu của resazurin 0,01% được trải lên các đĩa môi trường MHA và ủ ở 28 °C; quan sát sự phát triển khuẩn lạc sau 24 giờ. Giá trị MBC là nồng độ thấp nhất trong dãy nồng độ của cao chiết có thể tiêu diệt toàn bộ vi khuẩn trong giếng (không có khuẩn lạc nào xuất hiện trên đĩa môi trường thạch) [21].

Xác định ngưỡng an toàn của cao chiết cây Diệp hạ châu lên cá thí nghiệm

Chuẩn bị cá thí nghiệm: cá thí nghiệm có khối lượng trung bình 5 g/con được cung cấp từ Trại sản xuất cá giống Cúc Vy, Nha Trang, Khánh Hòa. Cá đã được kiểm dịch tại Trạm xá Thú y tỉnh Thừa Thiên Huế, đặc biệt không mang vi khuẩn *Vibrio*. Cá được nuôi thuần trong bể composite 2 m³, độ mặn 20‰ trong 14 ngày để quen với môi trường thí nghiệm. Thức ăn được sử dụng là NRD 2/3 (INVE, Thái Lan), được cung cấp từ Công ty TM-DV-SX Ngọc Trai với thành phần dinh dưỡng gồm: protein ($\geq 55\%$), lipid ($\geq 9\%$), chất xơ ($\geq 1,9\%$) và ẩm ($\leq 8\%$). Ngày cho ăn một lần (sáng 8 giờ). Lượng thức ăn bằng 2,5% khối lượng thân.

Trước khi tiến hành thí nghiệm, cá Hồng mỹ được kiểm tra không nhiễm *Vibrio* theo phương pháp của Phuoc và cs. [22] bằng cách lấy ngẫu nhiên năm con cá, tiến hành giải phẫu lấy

thận và cấy trực tiếp trên môi trường TCBS (Himedia, Ấn độ); ủ ở 28°C; sau 24 giờ, kiểm tra sự phát triển của vi khuẩn.

Chuẩn bị hệ thống thí nghiệm và cao chiết

Thí nghiệm được bố trí trong bể nhựa (80 L), được khử trùng bằng chlorine 100 ppm và phơi khô. Sau đó cấp nước mặn 20‰ vào khoảng 2/3 thể tích và sục khí liên tục. Thí nghiệm được bố trí trên năm nghiệm thức với bốn nồng độ cao chiết khác nhau được trộn vào thức ăn cho cá Hồng mỹ ăn liên tục trong 14 ngày.

Từ giá trị nồng độ tiêu diệt tối thiểu (được xác định ở trên), thí nghiệm xác định ngưỡng an toàn của dịch chiết cây Diệp hạ châu trên cá Hồng mỹ được bố trí bằng cách trộn cao chiết vào thức ăn INVE với các nồng độ tương ứng:

Nghiệm thức (NT) 1: bổ sung cao chiết ở nồng độ MBC vào thức ăn; Nghiệm thức (NT) 2: bổ sung cao chiết bằng 10x nồng độ MBC vào thức ăn; Nghiệm thức (NT) 3: bổ sung cao chiết bằng 20x nồng độ MBC vào thức ăn; Nghiệm thức (NT) 4: bổ sung cao chiết bằng 40x nồng độ MBC vào thức ăn; Nghiệm thức (NT) 5: không bổ sung cao chiết vào thức ăn.

Mỗi nghiệm thức được nuôi với mật độ 10 con cá Hồng mỹ/bể với ba lần lặp lại. Cá thí nghiệm được nuôi ở độ mặn 20‰, cho ăn (có hoặc không có cao chiết cây Diệp hạ châu bằng cách hòa 1 mL dung dịch cao chiết ở các nồng độ thử nghiệm kết hợp với 1% đầu mực, sau đó xit đều vào 50g thức ăn công nghiệp, để trong vòng 30 phút cho cao chiết thấm vào viên thức ăn rồi mới cho cá thí nghiệm ăn) 1 lần/ngày vào lúc 8 giờ sáng với lượng thức ăn bằng 2 % khối lượng thân. Sục khí liên tục 24 giờ/ngày. Theo dõi và đánh giá tỷ lệ sống trong 14 ngày. Dựa vào tỷ lệ chết cộng dồn ở các nghiệm thức thí nghiệm để tính giá trị LC_{50} (Lethal concentration) của cao chiết cây Diệp hạ châu theo công thức của Reed và Muench [23].

Dựa vào số lượng cá chết ở các nghiệm thức để tính LC_{50} theo công thức: $LC_{50} = 10^{a-x}$

trong đó a là số lũy thừa mà tại đó nồng độ cao chiết gây cá chết thấp nhất (trên 50%); x được tính dựa vào công thức: $x = (Pa - 50)/(Pa - Pu)$ với Pa là tỷ lệ chết cận trên và Pu là tỷ lệ chết cận dưới của liều gây chết 50%.

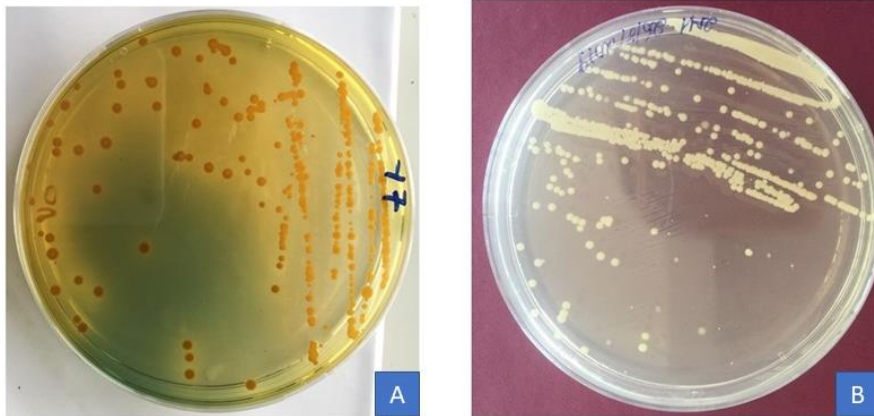
Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng Excel 2016 và phần mềm SPSS 16.0; phân tích phương sai ANOVA một yếu tố để so sánh sự khác nhau về đường kính vòng kháng khuẩn. Kiểm định thống kê được thực hiện ở mức ý nghĩa $p \leq 0,05$ theo phương pháp LSD.

3 Kết quả và thảo luận

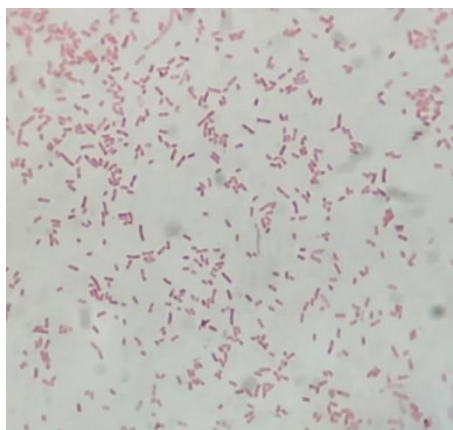
3.1 Kết quả định danh và xác định đặc điểm sinh hoá

Năm chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* khi nuôi cấy trên môi trường TCBS Agar và TSA+ Agar ở 28 °C sau 24 giờ đều phát triển thành những khuẩn lạc có màu vàng và màu trắng sữa, là màu sắc đặc trưng của chủng *Vibrio* trên môi trường chọn lọc (Hình 1).



Hình 1. Hình dạng khuẩn lạc của *V. alginolyticus* YHD1 trên môi trường nuôi cấy (A: TCBS; B: TSA)

Cả năm chủng đều có tế bào dạng hình dấu phẩy, bắt màu hồng của thuốc nhuộm Gram (Hình 2). Kết quả kiểm tra đặc điểm sinh hóa của năm chủng vi khuẩn bằng kit API 20E của hãng Bio Mérieux (France) đều cho kết quả với mã số 414725, là giá trị của vi khuẩn *V. alginolyticus* theo khoá phân loại của Buller.



Hình 2. Hình thái vi khuẩn *V. alginolyticus* YHD1 khi nhuộm Gram

Môi trường TCBS là môi trường chọn lọc để nuôi cấy các chủng thuộc nhóm vi khuẩn *Vibrio*. Sự acid hóa của môi trường do quá trình lên men sucrose ở các chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Vibrio* khiến cho bryothymol blue (thành phần có trong TCBS) chuyển thành màu vàng. Do đó, dựa vào môi trường TCBS có thể chia *Vibrio* thành hai nhóm: nhóm *Vibrio* có khả năng sử dụng đường sucrose và nhóm *Vibrio* không có khả năng sử dụng đường sucrose. Như vậy, cả năm chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* trong nghiên cứu này đều thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm và có khả năng lên men sucrose. Một số đặc điểm sinh hoá của các chủng vi khuẩn nghiên cứu được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* phân lập được từ cá Hồng mỹ bị bệnh

TT	Chỉ tiêu	<i>V. alginolyticus</i> (Buller, 2014)	Tỷ lệ% chủng vi khuẩn phân lập (n = 5)	
			Dương tính	Âm tính
1	Nhuộm Gram	-	0	100
2	Hình thái	Dấu phẩy	Dấu phẩy	
3	Khuẩn lạc trên TCBS	Vàng	Vàng	
4	Khuẩn lạc trên TSA	ND	Trắng sữa	
	Phát triển ở NaCl 0%	-	0	100
	1%	ND	100	0
5	6%	+	100	0
	8%	+	100	0
	10%	-/+	50	50
6	API 20E	414725	414725	
7	Oxidase	+	100	0
8	Catalase	+	100	0
9	Sinh H ₂ S	-	0	100
10	Phân giải NO ₃	+	100	0
11	Indol	-	0	100
12	VP	+	100	0
13	Sử dụng Citrate	+	100	0
14	Glucose	+	100	0
15	Mannitol	+	100	0
16	Sorbitol	+	100	0
17	Sucrose	+	100	0
18	Arabinose	-	0	100

Ghi chú: “+”: phản ứng dương tính; “-”: phản ứng âm tính; ND: không thực hiện.



Hình 3. Đặc điểm sinh hóa của chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* YHD1 bằng bộ kit 20API-20E

Các chủng vi khuẩn có thể phát triển tốt ở 28 °C và ở nồng độ muối 1 và 6%, nhưng không phát triển được trong môi trường muối 0,8 và 10% (Bảng 1). Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa của các chủng *V. alginolyticus* phân lập được trên cá Hồng mỹ bị bệnh xuất huyết nuôi tại Thừa Thiên Huế khá đồng nhất khi so sánh với các chủng *V. alginolyticus* do Buller phân lập có các đặc điểm đặc trưng: vi khuẩn Gram âm, có dạng hình dấu phẩy, không sinh indol, có khả năng phân giải nitrate, sinh catalase, oxidase, phản ứng Voges-Proskauer dương tính, đều có khả năng lên men glucose, sucrose, mannitol, sorbitol và arabinose (Bảng 1).

3.2 Khả năng kháng các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* của cao chiết

Tất cả các nồng độ cao chiết của cây Diệp hạ châu đều cho vòng kháng khuẩn khi thử nghiệm trên vi khuẩn *V. alginolyticus*. Ở nồng độ cao chiết càng cao thì đường kính vòng kháng khuẩn càng lớn và ngược lại; sự sai khác này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) (Bảng 2).

Bảng 2. Đường kính vòng kháng vi khuẩn *V. alginolyticus* của cao chiết

Nồng độ (mg/mL)	Đường kính vòng kháng các chủng vi khuẩn <i>V. alginolyticus</i> của cao chiết (mm)				
	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
	VL24	YVL22	YHTH44	YHD1	YHD3
100	0,4 ^a ± 0,12	11,3 ^a ± 0,25	11,3 ^a ± 0,15	11,7 ^a ± 0,25	11,9 ^a ± 0,12
200	2,3 ^b ± 0,17	14,6 ^b ± 0,17	14,4 ^b ± 0,12	15,2 ^b ± 0,25	15,7 ^b ± 0,25
300	5,8 ^c ± 0,25	17,2 ^c ± 0,15	17,1 ^c ± 0,17	17,4 ^c ± 0,12	18,1 ^c ± 0,17
400	7,4 ^d ± 0,12	18,3 ^c ± 0,17	18,2 ^c ± 0,25	18,4 ^d ± 0,12	19,1 ^d ± 0,10
500	8,3 ^e ± 0,25	19,1 ^f ± 0,21	19,1 ^f ± 0,12	19,2 ^e ± 0,20	21,3 ^f ± 0,25
Te (30 ug)	7,2 ^d ± 0,15	17,8 ^d ± 0,25	17,8 ^d ± 0,12	18,5 ^d ± 0,06	20,1 ^e ± 0,15
ĐC (-)	0	0	0	0	0

Ghi chú: các ký tự a, b, c, d, e và f khác nhau trên cùng một cột có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Cao chiết ở nồng độ 500 mg/mL có đường kính vòng kháng các chủng khuẩn *V. alginolyticus* cao hơn ở các nồng độ còn lại (100–400 mg/mL) và cũng cao hơn so với kháng sinh TE ($p < 0,05$). Tetracycline là loại kháng sinh được phép sử dụng trong nuôi trồng thủy sản nên thường được người dân sử dụng để phòng và trị bệnh do vi khuẩn gây ra trên cá, tôm. Tuy nhiên, hiện nay việc sử dụng kháng sinh không được khuyến khích trong nuôi trồng thủy sản nhằm đảm bảo chất lượng cho đối tượng nuôi và hạn chế ô nhiễm môi trường theo quy định của pháp luật. Đối với *V. alginolyticus* - YVL24 và *V. alginolyticus* - YHD1: đường kính vòng kháng khuẩn của kháng sinh TE là 17,2 và 18,5 mm, cao hơn so với ở các nồng độ 100, 200 và 300 mg/mL, lần lượt là 10,4, 12,3 và 15,8 mm và 11,7, 15,2 và 17,4 mm ($p < 0,05$), nhưng tương đương với đường kính vòng kháng khuẩn của cao chiết ở nồng độ 400 mg/mL (17,4 và 18,4 mm) ($p > 0,05$). Tương tự, đường kính vòng kháng khuẩn của kháng sinh TE trên 3 chủng *V. alginolyticus* - YVL22, *V. alginolyticus* - YHTH44 và *V. alginolyticus* - YHD3 là cao hơn ở các nồng độ từ 100 đến 400 mg/mL ($p < 0,05$) và chỉ thấp hơn so với đường kính vòng kháng khuẩn ở nồng độ 500 mg/mL ($p < 0,05$). Điều này cho thấy cao chiết cây Diệp hạ châu có khả năng kháng các chủng *V. alginolyticus* gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ. Một nghiên cứu khác cho thấy cao chiết cây Diệp hạ châu thân xanh (*P. niruri*) có khả năng kháng mạnh trên chủng vi khuẩn *Edwardsiella tarda*, trong khi đó cây cỏ mực (*Eclipta prostrata*) kháng mạnh trên chủng *E. ictaluri* gây bệnh trên cá tra (*P. hypophthalmus*) [24]. Không những có khả năng kháng các chủng vi khuẩn gây bệnh trên cá, cao chiết Diệp hạ châu còn có khả năng kháng các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND/EMS) trên tôm chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) [15, 25]. Ngoài Diệp hạ châu, một số loại thảo dược như: lá trà (Piper betle), nghệ (*Curcuma zedoaria*), đinh hương (*Syzygium aromaticum*), lá ổi (*Psidium guajava*), cây neem Ấn Độ (*Azadirachta indica*), lựu (*Punica granatum*) và bắp chuối (*Musa sapientum*) cũng đều có khả năng kháng *V. alginolyticus* gây bệnh trên cá chẽm (*L. calcarifer*) ở các nồng độ 100, 200, 300, 400 và 500 $\mu\text{g}/\text{đĩa}$ [26].

3.3 Xác định nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết cây Diệp hạ châu lên các chủng vi khuẩn thử nghiệm

Nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết cây Diệp hạ châu lên năm chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết cây Diệp hạ châu lên các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus*

Chủng vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn (CFU/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MBC/MIC
YVL24	10 ⁶	25	50	2
YVL22		25	50	2

Chủng vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn (CFU/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MBC/MIC
YHTH44		12,5	25	2
YHD1		12,5	25	2
YHD3		6,25	25	4

Giá trị MIC của chủng *V. alginolyticus* - YVL24 và *V. alginolyticus* - YVL22 đều bằng 25 mg/mL, trong khi đó giá trị MIC của chủng *V. alginolyticus* - YVL44 và *V. alginolyticus* - YHD1 đều bằng 12,5 mg/mL; giá trị MIC thấp nhất là chủng *V. alginolyticus* - YHD3 chỉ bằng 6,25 mg/mL (Bảng 3). Nồng độ tiêu diệt tối thiểu của các chủng *V. alginolyticus* - YVL24 và *V. alginolyticus* - YVL22 đều bằng 50 mg/mL và của chủng *V. alginolyticus* - YHTH44 và *V. alginolyticus* - YHD1 đều đạt giá trị 25 mg/mL, tương ứng với tỷ lệ MBC/MIC = 2. Trong khi đó, tỷ lệ MBC/MIC đối với chủng *V. alginolyticus* - YHD3 bằng 4. Tỷ lệ MBC/MIC ≤ 4 cho thấy cao chiết có khả năng tiêu diệt vi khuẩn; mặt khác, nếu tỉ lệ này ≥ 4 thì cao chiết chỉ có khả năng ức chế vi khuẩn [27]. Điều này cho thấy cao chiết cây Diệp hạ châu có khả năng tiêu diệt cả năm chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ. Các nghiên cứu khác cho thấy cao chiết từ cây Diệp hạ châu đối với chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND trên tôm chân trắng có tỷ lệ MBC/MIC = 4 [25]. Tuy nhiên, theo Direkbusarakom và cs. [28], ở nồng độ ≤ 10 mg/mL, cao chiết của cây *P. amarus* chưa xác định được giá trị MIC trên chủng vi khuẩn *A. hydrophila* và cả chín chủng *V. harveyi* gây bệnh trên cá.

3.4 Tỷ lệ sống thử nghiệm ngưỡng an toàn của cao chiết cây Diệp hạ châu lên cá Hồng mỹ

Trên cơ sở xác định giá trị MBC cao nhất trên năm chủng vi khuẩn được thử nghiệm, chúng tôi tiếp tục thử ngưỡng an toàn trên cá Hồng mỹ ở giai đoạn giống. Liều lượng sử dụng được tính theo cấp số nhân để xác định độc tính của cao chiết cây Diệp hạ châu đến tỷ lệ sống của cá nhằm hướng đến tạo chế phẩm trong phòng trị bệnh xuất huyết trên cá. Qua 14 ngày thí nghiệm, không có hiện tượng chết hay các dấu hiệu bất thường trên cá Hồng mỹ khi bổ sung cao chiết cây Diệp hạ châu vào thức ăn ở trong tất cả các nghiệm thức thí nghiệm. Tỷ lệ sống của cá ở các nghiệm thức thí nghiệm đều đạt 100%; do đó, không xác định được giá trị LC₅₀ của cao chiết cây Diệp hạ châu. Kết quả này cho thấy cao chiết cây Diệp hạ châu là an toàn cho cá Hồng mỹ. Các giá trị MIC và MBC trong nghiên cứu này có khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio* nhưng không ảnh hưởng đến sức khỏe và tỷ lệ sống của cá Hồng mỹ.

Nhiều nghiên cứu cho thấy cao chiết từ cây Diệp hạ châu, ngoài ứng dụng trong phòng trị bệnh trên động vật thủy sản, còn được sử dụng trong việc tăng khả năng đáp ứng miễn dịch tế bào bạch cầu của cá tra [13] và kích thích hệ miễn dịch đặc hiệu và không đặc hiệu của cá rô phi (*Oreochromis mossambicus*) đối với loài *P. niruri* [29]. Cao chiết từ cây Diệp hạ châu còn giúp tăng đáng kể tỷ lệ sống, tăng trưởng và nồng độ thành phần sinh hóa của tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii*) khi cho ăn ấu trùng artemia được làm giàu bằng cao chiết này [30].

4 Kết luận

Các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* phân lập trên cá Hồng mỹ tại Thừa Thiên Huế là đồng nhất về đặc điểm sinh hoá. Cao chiết từ cây Diệp hạ châu có khả năng kháng với cả năm chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* phân lập từ cá Hồng mỹ mắc bệnh xuất huyết lờ loét với giá trị MIC từ 6,25 đến 25 mg/mL và MBC từ 25 đến 50 mg/mL. Các nồng độ cao chiết của cây Diệp hạ châu sử dụng trong nghiên cứu này là an toàn và không gây chết cho cá Hồng mỹ giai đoạn giống.

Thông tin tài trợ

Nghiên cứu này được tài trợ thông qua đề tài khoa học và công nghệ cấp Đại học Huế, mã số: DHH2021-02-153.

Tài liệu tham khảo

1. Phạm Thị Hải Yến, Trần Quang Khánh Vân, Nguyễn Khoa Huy Sơn, Nguyễn Duy Quỳnh Trâm, (2019), Hiện trạng nuôi cá lồng và tình hình xuất hiện bệnh trên một số đối tượng cá nước lợ – mặn có giá trị kinh tế nuôi tại Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 23, 50–57.
2. Hoang Tan Quang, Tran Thuy Lan, Truong Thị Hồng Hai, Phạm Thị Hai Yen, Tran Quang Khanh Van, Ho Thi Tung *et al.*, (2020), Genetic diversity and toxic genes analysis of *Vibrio* spp. isolated from white leg shrimp and marine fishes cultured in Tam Giang lagoon in Thua Thien Hue province, Vietnam. *Indian journal of Science and Technology*, 13(13), 1412–1422.
3. Đặng Thanh Long, Nguyễn Thái Hoàng, Hoàng Thị Kim Hồng, Lê Lý Thùy Trâm, Phạm Thị Hải Yến, Huỳnh Văn Chương và cs, (2019), Phân lập và tạo dòng gen Thermolabile hemolysin của vi khuẩn *Vibrio* từ cá hồng Mỹ *Sciaenops ocellatus* ở Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học tự nhiên*, 128(1E), 5–14.
4. Yen, P. T. H., N. Q. Linh, and N. D. Q. Tram (2021), The indentification and determination of toxin genes of *Vibrio* strains caused hemorrhagic disease on red drum (*Sciaenops ocellatus*) using PCR. *AMB Expr*, 11(4): 1–8.
5. Austin, B., (2010), Vibriosis as cause agents of zoonoses. *Veterinary microbiology*, 140(0378–1135): 310–317.
6. Rajan, P.R, Lopez, C, Lin, J. H. L, Yang, H. L, (2001), *Vibrio alginolyticus* infection in cobia (*Rachycentron canadum*) cultured in Taiwan. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 21(6): 228–234.
7. Nguyễn Thị Thanh Thùy (2014), Nghiên cứu đáp ứng miễn dịch ở cá mú chấm cam (*Epinephelus coioides* Hamilton, 1822) nuôi tại Khánh Hòa với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*, *Trường Đại học Nha Trang*, 139 trang.
8. Low, C. F, Shamsudin, M.N, Chee, H. Y, Paiko, M. A, Idus, E. S, (2014), Putative apolipoprotein A-I, natural killer cell enhancement factor and lysozyme are involved in the early immune response of brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*, Forskal, to *Vibrio alginolyticus*. *Journal of fish diseases*, 37(8): 693–701.

9. Cai, S. H, Wu, Z. H, Jian, J. C, Lu, Y. S, (2007), Cloning and expression of gene encoding the thermostable direct hemolysin from *Vibrio alginolyticus* strain HY9901, the causative agent of vibriosis of crimson snapper (*Lutjanus erythropterus*). *Journal of Applied Microbiology*, **103**(2): 289–296.
10. Liu, P.-C., Y. Chen, and K. Lee, (2001), Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone *Haliotis diversicolor* supertexta. *Microbios*, **104**(408): 71–77.
11. Citarasu, T., (2010), Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, **18**(3): 403–414.
12. Brown, J., (1989), Antibiotics: their use and abuse in aquaculture. *World aquaculture*.
13. Trương Quỳnh Như, Nguyễn Thanh Phương, Bùi Thị Bích Hằng, (2018), Ảnh hưởng của chiết xuất ôi (*Psidium guajava*) và Diệp hạ châu (*Phyllanthus amarus*) lên đáp ứng miễn dịch của tế bào bạch cầu cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **54**(CĐ Thủy sản): 135–142.
14. Guo, J.-J., et al., (2001), Screening of modern herbal medicines in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio harveyi* infection. *The Israeli journal of aquaculture Bamidgah*, **63**.
15. Phuong, T. V, Hai Yen, P. T, and Linh, N.Q, (2019), Antibacterial Activity of Extracts from Dried and Fresh Herbal Plant (*Phyllanthus amarus*) Against Pathogens Causing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (Ahpdn) in White Leg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at Thua Thien Hue Province, Vietnam. *Asploro Journal of Biomedical and Clinical Case Reports*, **2**(3): 120-128.
16. Buller, N.B.,(2004), Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. *Cabi*.
17. Trần Vinh Phương, Hoàng Thị Ngọc Hân, Đặng Thanh Long, Phạm Thị Hải Yến, Nguyễn Quang Linh, (2019), Hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết từ cây chó đẻ thân xanh (*Phyllanthus amarus*) đối với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio* sp. gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học tự nhiên*, **128**(1E): 99–106.
18. Miles, A.A., S. Misra, and J. Irwin, (1938), The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology & Infection*, **38**(6): 732–749.
19. Sarker, S.D., L. Nahar, and Y. Kumarasamy, (2007), Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals, *Methods*, **42**(4): 321–324.
20. Schillinger, U., Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat, (1989), *Applied and environmental microbiology*, **55**(8): 1901–1906.
21. Satyajit D. S, Lutfun N, and Y. K., (2007), Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Elsevier*, **42**(2): 321–324.
22. Phuoc, N.N, Linh, N.T.H, Chiara, C, Ruth, N. Z (2021), Effect of strain and enviromental conditions on the virulence of *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococcus; GBS) in red tilapia (*Oreochromis* sp.), *Aquaculture*, **534**: 736256.
23. Reed, L.J. and H. Muench, (1938), A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American journal of epidemiology*, **27**(3): 493–497.
24. Huỳnh Kim Diệu, Lê Thị Loan Em, (2011), Đánh giá đặc tính thuần chủng và hoạt tính kháng khuẩn cuat cây cỏ mực (*Eclipta prostrate*) và cây Diệp hạ châu thanh xanh (*Phyllanthus niruri*) ở Đồng bằng Sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học – trường Đại học Cần Thơ*, **19a**: p. 149–155.
25. Nguyen, H.T., Lua, D.T, Hanh, N. T, Hai, H. H,(2018), Screening antibacterial effects of Vietnamese plant extracts against pathogens caused acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimps. *SCREENING*, 2018. **11**(5).

26. Maharajan, A. and C. Sajin, (2011), Antibacterial Activity of Herbal Plant Extracts against the Fish Pathogen, *Vibrio alginolyticus*. *Inventi Impact: Planta Activa*.
27. 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*, **54**(CD Thủy sản): 143–150.
28. Direkbusarakom, S., Ezura, Y, Yoshimizu, Y, Herunsalee, M (1998), Efficacy of Thai traditional herb extracts against fish and shrimp pathogenic bacteria. *Fish pathology*, **33**(4): 437–441.
29. Muthulakshmi, M., P. Subramani, and R. Michael, (2016), Immunostimulatory effect of the aqueous leaf extract of *Phyllanthus niruri* on the specific and nonspecific immune responses of *Oreochromis mossambicus* Peters. *Iranian journal of veterinary research*, **17**(3): 200-202.
30. Kalaiselvi, V. C, Savana B. P, Kalpana, R, Rajkumar, G, Satgurunathan, T, (2018), *Phyllanthus amarus* enriched Artemia nauplii enhanced survival, growth and nutritional quality of early post-larvae of the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Clin. Nutr. Metab.*, **1**: p. 1–15.

Antibacterial activity of *Phyllanthus amarus* extracts against hemorrhagic disease in Red drum (*Sciaenops ocellatus*) caused by *Vibrio alginolyticus*

Abstract. Red drum (*Sciaenops ocellatus*) is a valuable and widespread culture fish species in Vietnam. However, the hemorrhagic disease caused by *V. alginolyticus* has been a major challenge for Red drum culture in Thua Thien Hue province. This study determined the antibacterial activity of the *Phyllanthus amarus* extracts against five *V. alginolyticus* strains causing the hemorrhagic disease in Red drum. The results showed that the *Phyllanthus amarus* extracts at different concentration (from 100 to 500 mg/mL) inhibited all *V. alginolyticus* strains, with the concentration of 500 mg/mL being the most effective ($p < 0,05$). The minimum inhibitory concentration (MIC) ranged from 6.25 to 25 mg/mL, and the minimum bactericidal concentration (MBC) ranged from 25 to 50 mg/mL; the ratio of MBC/MIC of five tested strains were from 2 to 4. The toxicity test indicated that the *Phyllanthus amarus* extracts at different extract concentrations (from 50 to 2,000 mg/mL) were also safe for fish at the fingerling stage. From that, it can be seen that the extract from *P. amarus* has potential applications in the prevention and treatment of haemorrhagic diseases in *S. ocellatus* fish in and marine fish even, aiming to limit the use of antibiotics in aquaculture.

Keywords: Red drum, antibacterial, *Phyllanthus amarus* extraction, *Vibrio alginolyticus*