



KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN CỦA CAO CHIẾT SÀI ĐẤT (*Wedelia chinensis*) LÊN VI KHUẨN *Vibrio parahaemolyticus* PHÂN LẬP TỪ TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Penaeus vannamei*) BỊ BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP

Trần Nguyên Ngọc*, Ngô Lý Lai, Nguyễn Thị Huế Linh
Nguyễn Ngọc Phước, Nguyễn Quang Linh

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

* Tác giả liên hệ: Trần Nguyên Ngọc <trannguyennngoc@huaf.edu.vn>
(Ngày nhận bài: 30-11-2022; Ngày chấp nhận đăng: 18-1-2023)

Tóm tắt. Cao chiết sài đất được pha trong các dung môi: nước cất, ethanol 96% và methanol 99,8%, sau đó xử lý nhiệt, lọc và cô quay chân không để loại bỏ dung môi. Phương pháp khuếch tán trên giếng thạch được sử dụng để đánh giá hoạt tính kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của cao chiết. Đường kính kháng khuẩn của cao chiết sài đất bằng nước cất, ethanol và methanol lần lượt là 12,1, 12,7 và 14,7 mm. Cao chiết bằng methanol 99,8% có hoạt tính kháng khuẩn đối với *V. parahaemolyticus* mạnh nhất với nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) là 15,5 mg·L⁻¹ và 31,25 mg·L⁻¹. Cao chiết sài đất bằng methanol 99,8% không gây độc, không gây chết tôm thí nghiệm khi cho tôm ăn thức ăn phối trộn với dịch chiết sài đất ở nồng độ MBC (31,25 mg·L⁻¹). Nghiên cứu này cho thấy tiềm năng sử dụng cao chiết của cây sài đất trong phòng và điều trị bệnh do *V. parahaemolyticus* gây ra trên tôm thẻ chân trắng.

Từ khoá: cao chiết sài đất, tôm thẻ chân trắng, nồng độ ức chế, hoạt tính, kháng khuẩn

Antibacterial effect of wedelia grass extract (*Wedelia chinensis*) toward *Vibrio parahaemolyticus* isolated from infected white-leg shrimp (*Penaeus vannamei*) suffering from acute hepatopancreatic necrosis

Tran Nguyen Ngoc*, Ngo Ly Lai, Nguyen Thi Hue Linh,
Nguyen Ngoc Phuoc, Nguyen Quang Linh

University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

* Correspondence to Tran Nguyen Ngoc <trannguyennngoc@huaf.edu.vn>
(Submitted: November 30, 2022; Accepted: January 18, 2022)

Abstract. *Wedelia* grass was extracted with distilled water, ethanol 96% or methanol 99.8%, followed by heat treatment and vacuum evaporation to remove solvents. The diffusion method on agar was utilized to study the antimicrobial activity of the extract against *V. parahaemolyticus*. The diameter of the antibacterial zone of the water, ethanol 96%, and methanol 99.8% extracts is 12.1, 12.7, and 14.7 mm, respectively. The methanol extract exhibits the strongest antibacterial activity against *V. parahaemolyticus* with the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 15.5 mg·L⁻¹ and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of 31.25 mg·L⁻¹. This extract is non-toxic and non-lethal for shrimps at an MBC dose of 31.25 mg·L⁻¹. This study demonstrates the potential of using *wedelia* grass extracts to prevent and treat *V. parahaemolyticus* infection in shrimps.

Keywords: white-leg shrimp, *wedelia* grass extract, antimicrobial activity, inhibitory concentration

1 Đặt vấn đề

Hiện nay, nghề nuôi tôm đang đối mặt với nhiều thách thức về dịch bệnh và ô nhiễm môi trường; hiện tượng tôm chết hàng loạt trên quy mô lớn đã gây tổn hại về kinh tế trầm trọng. Một trong những nguyên nhân làm cho tôm chết là bệnh hoại tử gan tụy cấp (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease – AHPND) hay còn được gọi là hội chứng tôm chết sớm (Early Mortality Syndrome – EMS). Bệnh AHPND gây tỷ lệ chết lên đến 80% trên tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) và tôm sú (*Penaeus monodon*) và có thể lên đến 100% [1]. Kết quả phân lập và gây bệnh thực nghiệm cho thấy tác nhân gây bệnh hoại tử gan tụy cấp là chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* với độc lực mạnh [2] và đã được Tổ chức sức khoẻ động vật (World Organisation for Animal Health – OIE) đưa vào danh sách các bệnh nguy hiểm cần giám sát từ năm 2016 [3]. Kháng sinh thường được sử dụng trong điều trị vi khuẩn. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu đã cho thấy các chủng *V. parahaemolyticus* phân lập trên tôm nuôi trên thế giới đều kháng hầu hết các loại kháng sinh phổ biến như oxytetracycline hay tetracycline [4, 5] và gây mất an toàn thực phẩm. Việc nghiên cứu các hoạt chất kháng khuẩn có nguồn gốc thảo dược đã trở thành một trong những cách tiếp cận để thay thế cho việc sử dụng kháng sinh đang được quan tâm. Các hoạt chất có trong thực vật không những có tác dụng diệt vi khuẩn gây bệnh, mà còn giúp tăng cường sức đề kháng và chống oxy hoá cho cơ thể vật chủ [6]. Một số loại thảo dược đã được thử nghiệm trong phòng và trị bệnh cho các đối tượng thuỷ sản như cây xoan (*Melia azedarach* L.), sài đất (*Wedelia chinensis*), tỏi (*Allium sativum* L.), cây xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*), cỏ nhọ nồi (*Eclipta alba* Hassk) và cây trâm bầu (*Combretum quadrangulare*) [7, 8]. Trong đó, cây sài đất (*Wedelia chinensis*) chứa các hoạt chất sinh học thuộc nhóm flavonoid, sterol và saponin. Đây là những hợp chất không những có khả năng kháng khuẩn, kháng viêm mà còn giúp phục hồi và bảo vệ tế bào gan. Theo Nguyễn Thị Hồng Liên và cs., dịch chiết từ thân và lá của cây sài đất có khả năng kháng được các loài vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Sarcina lutea* và *Escherichia coli* trong điều kiện *in vitro* ở nồng độ 2–4 g/mL. Hoạt tính kháng khuẩn cao nhất là

đối với loài *S. lutea*, tiếp theo là *S. aureus*, *S. marcescens* và *E. coli*. Hoạt tính kháng khuẩn từ dịch chiết của lá và thân cây sài đất không chịu tác động của nhiệt và hoạt tính duy trì trên 80% khi xử lý ở 100 °C trong 20 phút [9]. Cao chiết sài đất với nước cất hoặc ethanol chứa các nhóm hợp chất phenol, triterpenoid và saponin; đây là các hợp chất tự nhiên có đặc tính chống vi khuẩn, chống vi rút, chống nấm, chống oxy hoá, chống viêm, chống ung thư và hoá trị [10]. Tuy nhiên, việc nghiên cứu ứng dụng cây sài đất trong thủy sản vẫn còn hạn chế. Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá khả năng kháng khuẩn của cao chiết sài đất lên vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm nhằm cung cấp cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo về sử dụng cao chiết sài đất trong phòng bệnh do vi khuẩn gây ra trên tôm thẻ chân trắng.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Nguồn gốc sài đất và tạo cao chiết

Nguồn gốc sài đất

Cây sài đất (*Wedelia chinensis*) sử dụng trong thí nghiệm được thu gom nguyên cây ở Thừa Thiên Huế, đem về phòng thí nghiệm, sau đó rửa sạch với nước và thu thân và lá cắt nhỏ. Sài đất được sấy ở 60–70 °C trong sáu giờ trước khi tiến hành tạo cao chiết. Nghiền nhỏ thân và lá sài đất khô bằng máy xay sinh tố đa năng Philips HR2221/00 (Hà Lan). Bảo quản bột khô sài đất thu được ở 4 °C.

Tạo cao chiết

Thân và lá sài đất được chiết bằng methanol, ethanol và nước cất theo phương pháp của Trần Hùng và Nguyễn Việt Kinh [11]: Lấy 10 g bột thô thân và lá sài đất trộn với 100 mL dung môi (methanol 99,8%, hoặc ethanol 96% hoặc nước cất) trong một bình nón và lắc ở 60 °C trong 20 phút với methanol 99,8% và 100 °C với ethanol 96% hoặc nước cất. Dịch chiết được lọc thô rồi sau đó lọc qua giấy lọc Whatman 1001-150 (GE Healthcare, Vương quốc Anh) với kích thước lỗ lọc 11 µm và cô quay bằng máy Rotavapor R-300 (Thụy Sĩ) ở 60 °C ở áp suất chân không để loại bỏ dung môi; đến khi còn khoảng 20 mL thì thu cao chiết (bằng 1/5 thể tích ban đầu) và bảo quản ở -20 °C để sử dụng trong các thí nghiệm.

2.2 Nguồn vi khuẩn thí nghiệm

Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* NNP 001 phân lập trên tôm thẻ chân trắng nuôi tại Thừa Thiên Huế bị bệnh hoại tử gan tụy cấp năm 2019 [12] được lưu giữ và cung cấp từ phòng thí nghiệm thuộc Bộ môn Bệnh Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* NNP 001 được phục hồi trên môi trường Tryptone Soya Agar (TSA, Himedia, Ấn Độ), bổ sung 2% NaCl. Sau đó, vi khuẩn được nuôi cấy tăng sinh trở lại trong môi trường Tryptic Soy Broth (TSB, Himedia, Ấn Độ), bổ sung 2% NaCl và được ủ trong tủ ấm GFL 3032, (GFL, Đức) ở 30 °C với tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 24 giờ. Mật độ vi khuẩn sau khi nuôi cấy được xác định theo phương pháp đo mật độ quang (Optical density – OD) ở bước sóng 600 nm trên máy quang phổ UV-VIS (U2900, Hitachi, Nhật Bản) và được pha loãng về giá trị OD = 1 (tương đương mật độ vi khuẩn là 10⁹ CFU/mL, giá trị tính được từ đếm trực tiếp khuẩn lạc khi xây dựng đường chuẩn cho chủng *V. parahaemolyticus*, Phòng thí nghiệm Bệnh thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế), sau đó được pha loãng về 10⁶ CFU/mL để thử khả năng kháng khuẩn của dịch chiết sài đất với từng loại dung môi.

2.3 Xác định khả năng kháng khuẩn của cao chiết sài đất

Khả năng kháng khuẩn của cao chiết sài đất với từng loại dung môi được tiến hành theo Tucker và cs. [13], gồm các bước như sau:

Trái đều vi khuẩn lên môi trường TSA + 2% NaCl đã chuẩn bị trước. Đĩa thạch được để khô 3–5 phút trước khi đục các lỗ giếng với đường kính 6 mm với khoảng cách thích hợp trên đĩa thạch đã trải vi khuẩn.

Hút chính xác 50 µL nước cất cho vào giếng thạch (1) để làm đối chứng âm. Giếng (2): 50 µL cao chiết sài đất trong methanol 99,8% (nồng độ tương đương 2500 µg/giếng). Giếng (3): 50 µL cao chiết sài đất trong ethanol 96% (nồng độ tương đương 2500 µg/giếng). Giếng (4): 50 µL cao chiết sài đất trong nước. Đối chứng dương: sử dụng kháng sinh là amoxicillin (125 µg).

Sau đó để khoảng 15 phút cho các chất thử nghiệm khuếch tán vào lớp thạch. Kiểm tra đường kính vòng kháng khuẩn sau 24 giờ nuôi cấy ở 28–30 °C. Mức độ kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của cao chiết sài đất được đánh giá theo Faikoh và cs. (Bảng 1) [14]. Thí nghiệm được lặp lại bốn lần.

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

Nồng độ ức chế tối thiểu

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC – Minimum Inhibitory Concentration) được xác định theo phương pháp pha loãng nồng độ trên đĩa 96 giếng theo CLSI [15].

Chuẩn bị vi khuẩn: Vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* được chuẩn bị như mục 2.2 và mật độ vi khuẩn sau đó được pha loãng về 10⁶ CFU/mL để thử nghiệm.

Bảng 1. Bảng đánh giá mức độ kháng vi sinh vật của cao chiết sài đất

Đường kính vòng kháng vi sinh vật (mm)	Mức độ kháng vi sinh vật
≥ 15	Mạnh
7,5–15	Vừa
< 7,5	Yếu
0	Không kháng

Chuẩn bị cao chiết: Sau khi xác định được hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết sài đất trong ba dung môi, chúng tôi tiến hành xác định nồng độ ức chế tối thiểu trên đĩa nhựa 96 giếng với thể tích 2 mL/giếng.

Cho 100 µL dung dịch vi khuẩn vào từng giếng của đĩa 96 giếng chứa sẵn 100 µL dung dịch cao chiết đã được pha loãng thành các nồng độ khác nhau theo cơ số 2 với dung dịch gốc ban đầu là nồng độ 5000 mg/L cho đến 15,5 mg/L. Sau đó bổ sung 20 µL thuốc thử resazurin 0,01% vào mỗi giếng và nuôi cấy ở 30 °C trong 24 giờ. Quan sát sự đổi màu, ghi nhận giá trị MIC là nồng độ của giếng không làm đổi màu của thuốc thử resazurin ở nồng độ thấp nhất của dịch chiết ức chế được vi khuẩn.

Nồng độ tiêu diệt tối thiểu

Nồng độ tiêu diệt tối thiểu (MBC – Minimum Bactericidal Concentration) được xác định theo CLSI bằng phương pháp trải đĩa thạch. Hút 20 µL dịch thử nghiệm trên các giếng không có sự đổi màu của resazurin 0,01% từ thí nghiệm xác định MIC và nhỏ lên môi trường thạch TSA + 2% NaCl đã chuẩn bị sẵn và ủ ở 30 °C sau 24 giờ để quan sát sự phát triển của vi khuẩn. 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 (vi khuẩn không phát triển trên đĩa thạch) [16].

2.5 Đánh giá ngưỡng an toàn của cao chiết sài đất trên tôm thẻ chân trắng

Chuẩn bị tôm thí nghiệm

Tôm thí nghiệm có khối lượng trung bình 1,5–2,0 g/con được cung cấp từ một trại sản xuất tôm giống ở xã Phú Thuận, huyện Phú Vang, tỉnh Thừa Thiên Huế. Tôm đã được kiểm dịch và không mang mầm bệnh đốm trắng (White spot Disease – WSD), bệnh Taura (Taura Syndrome Virus – TSV) và vi bào tử trùng và không nhiễm vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* tại Trạm chẩn đoán xét nghiệm và điều trị bệnh động vật của Chi cục Chăn nuôi, tỉnh Thừa Thiên Huế.

Tôm được nuôi thuần trong bể composite 2 m³ ở độ mặn 20–25‰ trong 14 ngày để thích nghi với môi trường thí nghiệm. Trước khi tiến hành các thí nghiệm, tôm được kiểm tra không

mang mầm bệnh *Vibrio* bằng cách lấy mẫu gan tụy từ năm con tôm cấy trực tiếp trên môi trường TCBS agar, quan sát sự phát triển của vi khuẩn ở 28 °C sau 24 giờ.

Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí trong các bể nhựa ($V = 120$ L) được khử trùng bằng chlorine 100 ppm và phơi khô. Sau đó cấp nước biển (độ mặn 30‰) vào khoảng 2/3 thể tích bể nuôi và sục khí liên tục. Tôm thẻ chân trắng được bố trí với mật độ 30 con/bể.

Bố trí thí nghiệm gồm: ba nghiệm thức thí nghiệm với ba nồng độ cao chiết khác nhau và một nghiệm thức đối chứng. Mỗi nghiệm thức được lặp lại ba lần. Trong đó: nghiệm thức 1 sử dụng nồng độ MBC mg/L (ký hiệu TN1); nghiệm thức 2 sử dụng nồng độ $20 \times$ MBC mg/L (ký hiệu TN2); nghiệm thức 3 sử dụng nồng độ $40 \times$ MBC mg/L (ký hiệu TN3); và nghiệm thức đối chứng tôm không cho ăn cao chiết (ký hiệu TN4).

Tôm thí nghiệm được nuôi ở độ mặn 20–25‰ và cho ăn thức ăn INVE (Thái Lan) có hoặc không có cao chiết cây sài đất ba lần/ngày vào lúc 6, 12 và 18 giờ 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 7 ngày.

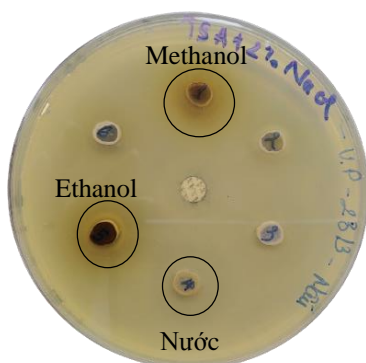
2.6 Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2013 và phần mềm SPSS Statistics 22, phân tích phương sai ANOVA một yếu tố để so sánh sự khác nhau về đường kính vòng kháng khuẩn ở mức ý nghĩa thống kê $p \leq 0,05$ bằng phương pháp kiểm định LSD.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Khả năng kháng khuẩn của cao chiết sài đất đối với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

Kết quả thử nghiệm khả năng kháng khuẩn của cao chiết sài đất cho thấy cao chiết sài đất bằng ba loại dung môi đều có khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm thẻ chân trắng tại Thừa Thiên Huế (Hình 1). Đường kính vòng kháng khuẩn của cao chiết sài đất bằng methanol cao hơn so với bằng ethanol và nước (Bảng 2). Kết quả thử khả năng kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch cho thấy, sau 24 giờ, đường kính vòng kháng khuẩn của cao chiết với methanol, ethanol và nước lần lượt là $14,7 \pm 0,91$, $12,7 \pm 1,92$ và $12,1 \pm 1,59$ mm, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với kháng sinh amoxicillin ($9,2 \pm 5,3$ mm) (Bảng 2). Điều này chứng tỏ khả năng kháng khuẩn của cao chiết từ cây sài đất có thể thay thế cho kháng sinh trong phòng và trị bệnh do *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp AHPND trên tôm thẻ chân trắng.



Hình 1. Hoạt tính kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* của cao chiết sài đất bằng ethanol, methanol và nước

Bảng 2. Đường kính vòng kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* của cao chiết sài đất với các loại dung môi khác nhau

Cao chiết sài đất	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
Cao chiết với methanol 99,8%	14,7 ^a ± 0,91
Cao chiết với ethanol 96%	11,7 ^b ± 1,92
Cao chiết với nước	12,1 ^b ± 1,59
Đối chứng dương (kháng sinh AM)	9,2 ^{ab} ± 5,3
Đối chứng âm (nước cất)	0 ^d

Ghi chú: Các ký tự khác nhau trên cùng một cột cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$); AM là amoxicillin.

Dựa vào bảng đánh giá mức độ kháng vi sinh vật (Bảng 1), có thể thấy cao chiết sài đất trong cả ba dung môi đều có khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* ở mức độ vừa (đường kính vòng kháng khuẩn 10–14 mm). Trong đó, methanol cho kết quả kháng khuẩn cao nhất do methanol là dung môi phân cực cao, có khả năng hoà tan được những hợp chất tự nhiên có trong thảo dược. Như vậy, dung môi ảnh hưởng lớn đến khả năng kháng khuẩn của cao chiết. Bên cạnh đó, việc sử dụng methanol và ethanol để chiết xuất tinh chất từ thảo dược tăng cường hoạt tính kháng khuẩn của thảo dược cao hơn so với chiết xuất bằng nước [13], hay hexane và ethyl axetat [17]. Theo Turker và cs. [13], cao chiết thảo dược chiết xuất bằng ethanol và methanol có hiệu quả kháng khuẩn cao hơn so với chiết xuất bằng nước cất và có thể kháng cả hai loại vi khuẩn Gram âm, Gram dương. Nhóm tác giả cũng cho rằng các cao chiết thảo dược rất có tiềm năng trong việc kiểm soát dịch bệnh trong nuôi trồng thủy sản. Trong tự nhiên, những hợp chất kháng khuẩn có

trong thảo dược có khả năng bảo vệ và giúp bản thân cây thảo dược đó tránh được một số vi sinh vật gây bệnh.

Tương tự như cây sài đất, một số loại thảo dược khác cũng có các hợp chất có hoạt chất sinh học với khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Dịch chiết thô từ thân và lá cây thỏm lồm (*Polygonum chinense* L) với liều sử dụng 10 µg/mL (tương ứng với 200 µg/khoanh/20 mL) có đường kính vòng kháng khuẩn đối vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND trên tôm nước lợ 20,6 mm [7]. Dịch chiết hạt sim (*Rhodomyrtus tomentosa*) ở nồng độ 30 µg/µL có đường kính vòng vô khuẩn đối với các chủng *V. parahaemolyticus* KC13.14.2, *V. parahaemolyticus* KC12.02.0 và *Vibrio sp.* KC13.17.5 lần lượt là 17,67, 18 và 19,33 mm. Ngoài ra, bảy loại cao chiết thảo dược có hoạt tính kháng khuẩn khác nhau, trong đó cao chiết từ cây thầu dầu (*Ricinus communis* L) cho hiệu quả cao nhất với đường kính vòng kháng khuẩn trên hai chủng *V. harveyi* gây bệnh phát sáng và *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND trên tôm tương ứng là $18,0 \pm 1,4$ và $17,5 \pm 0,7$ mm [6, 8]. Như vậy, khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của cao chiết từ cây sài đất bằng methanol nằm ở mức vừa và mạnh [8] ($14,7 \pm 0,91$ mm), thấp hơn so với dịch chiết thô của các loại thảo dược trong nghiên cứu của Hoàng Mộng Huyền và cs. Tuy nhiên, dịch chiết thô thường khó bảo quản hơn so với cao chiết [14].

3.2 Kết quả xác định nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết cây sài đất đối với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp

Nồng độ ức chế tối thiểu là nồng độ thấp nhất trong dãy nồng độ thử nghiệm của các dịch chiết có thể ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn. Do đó, nồng độ ức chế tối thiểu càng thấp thì khả năng kháng khuẩn càng cao. Kết quả thử nghiệm về nồng độ của cao chiết sài đất đối với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được trình bày trong Bảng 3.

Khi sử dụng nước cất làm dung môi để tạo cao chiết thì ở nồng độ 1000 mg/L, có sự phát triển của vi khuẩn ($OD = 0,2$ sau 24 giờ ủ ở 28–30 °C). Cao chiết với methanol và ethanol có khả năng ức chế vi khuẩn ở nồng độ rất thấp (15,5 mg/L). Tuy nhiên, vi khuẩn phát triển trở lại trên đĩa thạch sau 24 giờ nuôi cấy ở nồng độ 15,5 mg/L đối với cao chiết bằng methanol và 31,25 mg/L đối với cao chiết bằng ethanol.

Nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết sài đất lên vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được trình bày ở Bảng 4.

Kết quả xác định nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết sài đất trong ba dung môi lên vi khuẩn *V. parahaemolyticus* cho thấy nước cất có giá trị MBC 5000 mg/L. Trong khi đó, ở cao chiết với ethanol và methanol, vi khuẩn *V. parahaemolyticus* bị tiêu diệt hoàn toàn ở các nồng độ 62,5

Bảng 3. Kết quả sàng lọc và xác định nồng độ ức chế tối thiểu của cao chiết sài đất lên vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

Cao chiết sài đất Nồng độ pha loãng (mg/L)	Nồng độ vi khuẩn (CFU/mL)	Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)		
		Methanol	Nước	Ethanol
5000	10 ⁶	-	-	-
2500		-	-	-
1000		-	+	-
500		-	+	-
250		-	+	-
125		-	+	-
62,5		-	+	-
31,25		-	+	+
15,5		+	+	+

Ghi chú: (+): Vi khuẩn phát triển, (-): Vi khuẩn không phát triển.

Bảng 4. Nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết sài đất lên vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

Loại dung môi	Nồng độ ức chế tối thiểu (mg/L)	Nồng độ tiêu diệt tối thiểu (mg/L)
Nước	2500	5000
Methanol	15,5	31,25
Ethanol	15,5	62,5

và 31,25 mg/L. Theo Canillac và Mourey, nếu tỷ lệ MBC/MIC ≤ 4 thì cao chiết được xem là có khả năng diệt khuẩn; nếu tỉ lệ này lớn hơn 4 thì chúng chỉ có tác dụng kìm hãm sự phát triển của vi khuẩn [18]. Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết từ cây sài đất chiết xuất bằng methanol và ethanol có khả năng tiêu diệt vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp AHPND trên tôm thẻ chân trắng với tỷ lệ MBC/MIC của methanol là 2 và ethanol là 4.

Nước cất, methanol và ethanol là những dung môi có tính phân cực tăng dần. Theo Trịnh Thị Trang và Nguyễn Thanh Hải, các loại dung môi tách chiết khác nhau có khả năng hoà tan các hợp chất trong thực vật khác nhau [19]. Chẳng hạn, ethanol có khả năng tách chiết các hợp chất từ lá trầu không tốt hơn methanol và nước. Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy dung môi có độ phân cực cao (ethanol và methanol) có khả năng tách chiết các hoạt chất trong sài đất tốt hơn nước.

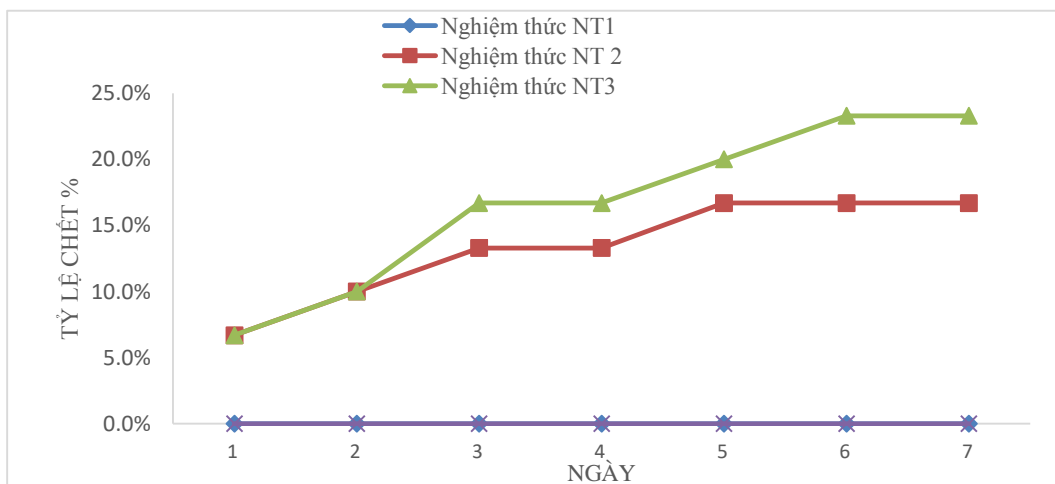
3.3 Kết quả đánh giá ngưỡng an toàn của cao chiết toàn phần trên tôm thẻ chân trắng

Trên cơ sở xác định giá trị MBC cao nhất trên chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* được thử nghiệm, chúng tôi thử ngưỡng an toàn trên tôm thẻ chân trắng nhằm xác định độc tính của cao chiết cây sài đất đến tỷ lệ sống của tôm thẻ chân trắng nhằm hướng đến sử dụng cao chiết trong phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm thẻ chân trắng.

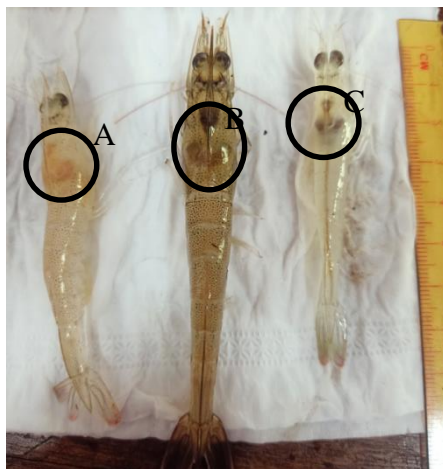
Kết quả theo dõi tôm thí nghiệm cho thấy, tôm bắt đầu chết vào ngày đầu tiên sau khi cho ăn cao chiết và ngừng chết vào ngày thứ 6 ở các nghiệm thức 2 và 3. Sau bảy ngày, tôm ở nghiệm thức 2 cho ăn cao chiết sài đất với nồng độ $20 \times \text{MBC}$ (625 mg/L) có tỷ lệ chết 16,7%, thấp hơn so với nghiệm thức 3 cho ăn cao chiết sài đất với nồng độ $40 \times \text{MBC}$ (1250 mg/L) (tỷ lệ chết 23,3%). Nghiệm thức 3 có tỷ lệ tôm chết cao nhất trong thí nghiệm. Trong khi đó, ở nghiệm thức đối chứng (nghiệm thức 4) và nghiệm thức 1, cho ăn cao chiết sài đất với nồng độ MBC (31,25 mg/L), không xuất hiện tôm chết (Hình 2).

Tỷ lệ chết của tôm thẻ chân trắng ở bốn nghiệm thức cho ăn và không cho ăn cao chiết sài đất ở các nồng độ khác nhau đều dưới 50%; do đó, không xác định được nồng độ gây chết LC_{50} của cao chiết từ cây sài đất. Tôm chết có dấu hiệu gan bị nhạt màu và gan bị nhũn (Hình 3). Không phân lập được vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* trên tôm chết, chứng tỏ tôm chết không nhiễm khuẩn.

Việc sử dụng liều cao chiết sài đất ở mức 625 mg/L hay 1250 mg/L có khả năng gây ngộ độc gan ở một số cá thể tôm.



Hình 2. Tỷ lệ chết của tôm thẻ chân trắng sau bảy ngày cho ăn cao chiết sài đất *Wedelia chinensis*



Hình 3. Tôm thí nghiệm khi ăn cao chiết sài đất, (A) Gan tôm nhạt màu và bị nhũn khi cho ăn cao chiết sài đất ở liều 1250 mg/L (40 MBC); (B, C) tôm khỏe mạnh, gan tôm đậm màu, các thùy gan rõ ràng khi cho ăn cao chiết ở liều 31,25 mg/L

Trong sài đất có các hợp chất phenol, triterpenoid, saponin, v.v., có tác dụng kháng khuẩn và kháng nấm cao. Tuy nhiên, nồng độ sử dụng quá cao có thể dẫn đến ngộ độc [20]. Trong thí nghiệm này cao chiết từ cây sài đất ở nồng độ 31,25 mg/L (liều MBC) không gây chết cho tôm, chứng tỏ nồng độ này an toàn cho tôm thí nghiệm.

4 Kết luận

Kết quả thử khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* của cao chiết từ cây sài đất chiết xuất bằng nước, methanol 99,8% và ethanol 96% cho thấy cả ba loại dung môi này đều có khả năng kháng *V. parahaemolyticus*, trong đó cao chiết methanol cho kết quả tốt nhất với đường kính kháng khuẩn $14,7 \pm 0,91$ mm.

Nồng độ ức chế tối thiểu của cao chiết sài đất bằng nước cất, methanol và ethanol đối với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* lần lượt là 2500, 15,5 và 15,5 mg/L.

Nồng độ tiêu diệt tối thiểu cao chiết sài đất trong methanol 99,8% là 31,25 mg/L, ethanol 96% là 62,5 mg/L và nước cất là 5000 mg/L.

Cao chiết sài đất với methanol 99,8% ở nồng độ MBC 31,25 mg/L là an toàn với tôm thẻ chân trắng.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự tài trợ của quỹ học bổng VINIF.2022.TS082 của tập đoàn Vingroup, đề tài độc lập cấp nhà nước mã số ĐTĐL.CN-56/22 và Nhóm Nghiên cứu mạnh NCM.DHH.2022.005.

Tài liệu tham khảo

1. FAO (2020), Shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease strategy manual, *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*, 1190. <https://www.fao.org/3/cb2119en/CB2119EN.pdf>.
2. Zhang, B. C., Liu, F., Bian, H. H., Liu, J., Pan, L. Q. & Huang, J. (2012), Isolation, identification, and pathogenicity analysis of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from *Litopenaeus vannamei*, *Progr. Fish. Sci.*, 33, 56–62. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/emi.2016.131>.
3. OIE (2019), *Immediate notifications and follow-ups, Acute hepatopancreatic necrosis disease*, http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=29737.
4. Han, J. E., Mohny, L., Tang, K. F. J., Pantoja, C. R. & Lightner, D. V. (2015), Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), *Aquacult. Rep.*, 2, 17–21. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352513415000137>.
5. Dong, X., Bi, D., Wang, H., Zou, P., Xie, G., Wan, X., et al. (2017), PirABvp-bearing *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio campbellii* pathogens isolated from the same AHPND-affected pond possess highly similar pathogenic plasmids, *Front. Microbiol.*, 8, 1859–1867. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01859/full>.
6. 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(2), 143–150. <https://ctujsvn.ctu.edu.vn/index.php/ctujsvn/article/download/3178/641>.
7. Trương Thị Mỹ Hạnh, Phạm Thị Yến, Phạm Thị Huyền, Huỳnh Thị Mỹ Lê, Phạm Thị Hồng Minh, Đỗ Tiến Lâm, Trần Thị Hoài Vân, Phan Thị Vân (2017), Tác dụng diệt khuẩn của cao chiết thân lá thối lôm (*Polygonum chinense* L.) đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp ở tôm nuôi nước lợ, *Tạp chí khoa học công nghệ Việt Nam*, 17(6). https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/article/download/486/477.
8. Hồng Mộng Huyền, Lê Quốc Việt, Trần Ngọc Hải, Trần Thị Tuyết Hoa (2020), Ảnh hưởng của chất chiết thảo dược lên tăng trưởng miễn dịch không đặc hiệu và khả năng kháng bệnh

- của tôm thẻ (*Penaeus vannamei*) với *Vibrio parahaemolyticus*, *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 56(5B), 150–159. <https://ctujsvn.ctu.edu.vn/index.php/ctujsvn/article/download/3605/214>.
9. Nguyễn Thị Hồng Liên, Đinh Thị Thùy, Nguyễn Thị Vân, Thân Thị Phượng, Trần Thị Hồng, Nguyễn Hữu Quân (2018), Xác định hoạt tính kháng khuẩn từ dịch chiết của cây Sài đất *Wedelia chinensis* merr. trồng tại huyện Lục Nam, tỉnh Bắc Giang trong điều kiện *in vitro*, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 177(1), 191–196. <http://jst.tnu.edu.vn/jst/article/view/711/pdf>.
 10. Nguyễn Thị Minh Thuận, Lê Thị Thảo Nguyên (2020), Đánh giá tác động gây độc và chết theo chương trình của cao phân đoạn chiết từ *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr., trên tế bào đơn nhân máu ngoại vi người, *Nghiên cứu Dược & Thông tin thuốc*, 11(4), 18–23. <http://www.hup.edu.vn/cpbdv/>.
 11. Trần Hùng, Nguyễn Việt Kinh (2015), *Phương pháp nghiên cứu dược liệu*, Đại học Y dược Thành phố Hồ Chí Minh, 126p.
 12. Nguyễn Ngọc Phước, Nguyễn Thị Xuân Hồng, and Nguyễn Công Chung (2020), nghiên cứu độc lực của một số chủng vi khuẩn *vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (ahpnd) trên tôm chân trắng (*litopenaeus vannamei*) nuôi tại thừa thiên huế, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 18(3), 202–211. <http://tapchi.vnua.edu.vn/wp-content/uploads/2020/06/tap-chi-so-3.1.5-1.pdf>.
 13. Turker, H., Yildirim, A. B. and Karakaş, F. P. (2009), Sensitivity of Bacteria Isolated from Fish to Some Medicinal Plants, *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 9, 181–186. <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/141830>.
 14. Faikoh, E. N., Hong, Y. H., Hu, & S. Y. (2014), Liposome-encapsulated cinnamaldehyde enhances zebrafish (*Danio rerio*) immunity and survival when challenged with *Vibrio vulnificus* and *Streptococcus agalactiae*, *Fish & Shellfish Immunology*, 38, 15–24. 10.1016/j.fsi.2014.02.024.
 15. CLSI (2012), *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, Approved Standard, 9th ed., CLSI document M07-A9, Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA. https://clsi.org/media/1632/m07a10_sample.pdf.
 16. CLSI (1998), *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents, Approved Guideline*, CLSI document M26-A, Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Roadn Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA. https://clsi.org/media/1462/m26a_sample.pdf.

17. Karl-Gunnar Rosell & Lalit M. Srivastava (1987), Fatty acids as antimicrobial substances in brown algae, *Hydrobiologia*, 151/152, 471–475.
<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00046169>.
18. Canillac, N., & 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.
<https://doi.org/10.1006/fmic.2000.0397>.
19. Trịnh Thu Trang, Nguyễn Thanh Hải (2016), Tác dụng ức chế vi khuẩn in vitro của cao khô dịch chiết lá trâu không (*Piper betle*) đối với vi khuẩn *Aeromonas* spp. và *Streptococcus agalactiae* gây bệnh xuất huyết trên cá rô phi, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 14(6), 869–8761.
20. Đỗ Tất Lợi (2000), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb. Y học, TP. Hồ Chí Minh, 86.