

## TÁC DỤNG DIỆT KHUẨN CỦA DỊCH CHIẾT LÁ SIM VÀ HẠT SIM (*Rhodomyrtus tomentosa*) ĐỐI VỚI VI KHUẨN GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP TRÊN TÔM NUÔI NƯỚC LỢ

Đặng Thị Lua<sup>1\*</sup>, Lại Thị Ngọc Hà<sup>2</sup>, Nguyễn Thanh Hải<sup>3</sup>

<sup>1</sup>TT Quan trắc môi trường và Bệnh thủy sản miền Bắc, Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản 1

<sup>2</sup>Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>3</sup>Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email\*: danglua@ria1.org

Ngày gửi bài: 14.07.2015

Ngày chấp nhận: 12.10.2015

### TÓM TẮT

Bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) do tác nhân vi khuẩn *Vibrio* spp. chứa plasmid mang gen Toxin gây ra đã và đang là một trong những nguyên nhân ảnh hưởng trực tiếp tới sự phát triển bền vững của ngành nuôi tôm công nghiệp. Nghiên cứu được tiến hành nhằm sàng lọc, đánh giá khả năng diệt khuẩn của dịch chiết lá sim và dịch chiết hạt sim (*Rhodomyrtus tomentosa*) đối với các chủng vi khuẩn gây AHPND, *Vibrio parahaemolyticus* KC12.02.0, *V. parahaemolyticus* KC13.14.2 và *Vibrio* sp. KC13.17.5 trong điều kiện phòng thí nghiệm *in vitro*. Kết quả nghiên cứu thử nghiệm cho thấy cả dịch chiết lá sim và dịch chiết hạt sim đều có tác dụng diệt vi khuẩn gây AHPND trong điều kiện *in vitro*, song dịch chiết hạt sim thể hiện hoạt tính kháng vi khuẩn gây AHPND cao hơn so với dịch chiết lá sim. Đối với dịch chiết hạt sim đường kính vòng vi khuẩn đạt được là 17,67mm đối với chủng *V. parahaemolyticus* KC13.14.2; 18,0mm đối với chủng *V. parahaemolyticus* KC12.02.0 và 19,33mm đối với chủng *Vibrio* sp. KC13.17.5. Kết quả bước đầu cho thấy dịch chiết hạt sim có tiềm năng phát triển thành sản phẩm thảo dược phòng trị AHPND trên tôm theo hướng an toàn sinh học và thân thiện với môi trường.

Từ khóa: AHPND, EMS, hạt sim, lá sim, *Vibrio*, thảo dược, tôm nước lợ.

### Anti-Bacterial Activity of Myrtle Leaf and Myrtle Seed (*Rhodomyrtus tomentosa*) Extracts on Bacterial Strains Causing Acute Hepatopancreas Necrosis Disease (AHPND) in Shrimp

### ABSTRACT

Acute hepatopancreas necrosis disease (AHPND) has been considered as a major constraint for the sustainable development of shrimp culture industry. This study was carried out to examine *in vitro* anti-bacterial effects of herbal extracts derived from leaves and seeds of myrtle (*Rhodomyrtus tomentosa*) on bacterial strains caused AHPND, *Vibrio parahaemolyticus* KC12.02.0, *V. parahaemolyticus* KC13.14.2, and *Vibrio* sp. KC13.17.5. Results showed that although both myrtle leaf and seed extracts had anti-bacterial effects against *in vitro* AHPND-causing *Vibrio* strains, the myrtle seed extract showed higher antibacterial activities. The inhibition zone diameters of myrtle seed extract reached 17,67 mm for *V. parahaemolyticus* KC13.14.2; 18,00 mm for *V. parahaemolyticus* KC12.02.0 and 19,33 mm for *Vibrio* sp. KC13.17.5. These results suggested myrtle seed extract can potentially be used as a material for development of herbal medicine for AHPND control.

Keywords: Herb, myrtle, *Rhodomyrtus tomentosa*, AHPND, EMS, *Vibrio*, shrimp.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nghề nuôi tôm nước lợ đang phải đối mặt với dịch bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND)

trong mấy năm gần đây. Theo báo cáo tại hội nghị “Tổng kết nuôi tôm nước lợ năm 2014 và xây dựng kế hoạch năm 2015”, năm 2012 xuất hiện ở 192 xã thuộc 54 huyện của 16 tỉnh, thành

trên cả nước. Năm 2013, dịch bệnh xuất hiện ở 199 xã thuộc 19 tỉnh, thành và năm 2014 dịch bệnh xuất hiện ở 233 xã thuộc 22 tỉnh, thành (Cục Thú y, 2014). AHPND xuất hiện trên cả tôm sú và tôm thẻ chân trắng, ảnh hưởng đặc biệt đối với tôm nuôi trong giai đoạn 20 - 30 ngày sau khi thả giống và tỷ lệ tử vong lên đến 100% (Leano và Mohan, 2012). Tác nhân gây AHPND được cho là ngoài vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* (Tran et al., 2013) còn có vi khuẩn *V. harveyi* (Kondo et al., 2015).

Do tác nhân gây AHPND là vi khuẩn nên việc lạm dụng kháng sinh trong nuôi tôm đã phổ biến thì nay lại càng trở nên thường xuyên và tràn lan. Sự lạm dụng thuốc kháng sinh và sự thiếu hiểu biết về kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản nói chung đã gây ảnh hưởng xấu tới sức khỏe động vật nuôi, môi trường sinh thái và đặc biệt là tạo ra các chủng vi khuẩn kháng lại thuốc kháng sinh, làm giảm hiệu quả điều trị bệnh và tăng nguy cơ nhiễm khuẩn có khả năng kháng thuốc cho con người, động vật và tồn dư trong thịt động vật thủy sản (Brown, 1989). Do vậy, hiện nay hướng nghiên cứu các chất có hoạt tính kháng khuẩn nguồn gốc thảo dược được tập trung nghiên cứu nhằm tạo ra các sản phẩm sử dụng trong phòng trị bệnh mà thân thiện với môi trường và đảm bảo an toàn thực phẩm (Cos et al., 2006; Mahesh et al., 2008). Kháng sinh có nguồn gốc thảo dược đã và đang được nghiên cứu ứng dụng trong phòng trị bệnh (Citarasu, 2010; Nguyễn Thị Vân Thái và cs., 2003; Nguyễn Văn Thanh và Nguyễn Thanh Hải, 2014). Dịch chiết cây hoàng kỳ (*Astragalus membranaceus*), diệp hạ châu đỏ, diệp hạ châu xanh, bạch hoa xà có tác dụng kháng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan thận mủ trên cá tra; dịch chiết tỏi và húng đã được thử nghiệm (Nguyễn Hồng Loan, 2010; Nguyễn Thanh Tâm và cs., 2012) trong kháng vi khuẩn *Streptococcus* spp. gây bệnh lở loét.

Cây sim (*Rhodomyrtus tomentosa*) từ lâu đã được xem là cây thảo dược có lợi ích từ gốc đến ngọn. Lá sim chứa chất rhodomyrtone có vai trò như một chất kháng sinh giúp chống lại sự xâm nhập của vi khuẩn, thường được dùng để chữa đau bụng, tiêu chảy, kiết lỵ. Quả sim chứa

các chất như axit amin, đường, axit hữu cơ và đặc biệt có hàm lượng sắt cao (Thi Ngoc Ha Lai et al., 2015) nên thường dùng cho người bị suy nhược cơ thể, thiếu máu (Đỗ Tất Lợi, 1999). Ngoài ra, quả sim giàu các hợp chất phenol bao gồm tannin, stilbene, anthocyanin, flavonol có khả năng kháng khuẩn, kháng oxi hóa, kháng viêm và kháng ung thư. Nhiều nghiên cứu ngoài nước đã khẳng định, hoạt chất chiết xuất từ sim có khả năng tiêu diệt nhiều loại vi khuẩn gây bệnh trong đó đã có những chủng vi khuẩn kháng lại nhiều loại kháng sinh (Dachriyanus et al., 2002; Deok et al., 2013; Jongkon et al., 2011; Surasak et al., 2012). Trong nghiên cứu này, chiết xuất từ lá sim và hạt sim được dùng để thử nghiệm, đánh giá khả năng kháng khuẩn đối với một số chủng vi khuẩn gây bệnh nguy hiểm trên tôm, làm cơ sở khoa học cho việc chế tạo các sản phẩm phòng trị bệnh động vật thủy sản có nguồn gốc thảo dược.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Lá sim và quả sim được thu từ cây sim (*Rhodomyrtus tomentosa*) trồng tại huyện Phú Bình, tỉnh Thái Nguyên. Lá sim được thu bao gồm lá trưởng thành sau búp hai lá. Hạt sim được thu bằng cách thu quả sim chín, chà tách thịt quả và được rửa sạch bằng nước. Lá sim được rửa sạch và sấy ở nhiệt độ 40°C đến khô (khoảng 15 - 16 giờ). Hạt sim được phơi khô tự nhiên. Lá sim khô và hạt sim khô được nghiền nhỏ đến đường kính < 0,1mm, bảo quản trong túi nilon kín ở 4°C làm nguyên liệu để tách chiết.

Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC12.02.0, *V. parahaemolyticus* KC13.14.2 và *Vibrio* sp. KC13.17.5 gây AHPND hiện đang được lưu giữ tại Trung tâm nghiên cứu quan trắc, cảnh báo môi trường và phòng ngừa dịch bệnh thủy sản khu vực miền Bắc (CEDMA), Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1.

Nguyên vật liệu khác bao gồm: Môi trường chọn lọc của vi khuẩn *Vibrio* là Thiosulfate Citrate Bile Salts (TCBS) rắn, được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn. Môi trường Nutrient Broth (NB) dạng lỏng có bổ sung 2% NaCl, được hấp

khử trùng ở 121°C trong 15 phút và dùng để nuôi cấy thu dịch vi khuẩn. Môi trường Mueller Hinton Agar (MA) bổ sung 2% NaCl được hấp tiệt trùng để nguội tới 40 - 50°C, đổ vào đĩa petri có đường kính 10cm với độ dày  $4 \pm 0,2\text{mm}$ , sử dụng để thử kháng sinh đồ. Đĩa giấy thấm đã được vô trùng và đĩa kháng sinh Doxycyclin (30µg), Ampicillin (10µg) do Công ty TNHH Nam Khoa sản xuất.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Tách chiết và thu bột chiết lá sim và hạt sim

Mẫu nghiên cứu của lá sim khô được thêm dung môi ethanol 40% với tỷ lệ 1/10, chiết lắc trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ 90°C. Mẫu nghiên cứu của hạt sim khô được tách chiết theo phương pháp tách chiết tối ưu cho hạt sim của Lại Thị Ngọc Hà (Thị Ngọc Hà et al., 2014). Bột hạt sim được thêm dung môi ethanol 79% với tỷ lệ 1/20, chiết lắc trong thời gian 79 phút ở nhiệt độ 83°C. Hỗn hợp sau khi chiết lắc được ly tâm với tốc độ 6.000 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C trong 10 phút. Dịch trong thu được sau ly tâm tiếp tục được cô quay chân không để loại bỏ hoàn toàn dung môi ở nhiệt độ 40°C. Dịch chiết đã đuổi dung môi sau đó được đông khô thành bột và được bảo quản ở điều kiện tối trong tủ đá để dùng cho thử nghiệm khả năng diệt khuẩn.

### 2.2.2. Pha dịch chiết lá sim và hạt sim

Bột dịch chiết lá sim và hạt sim được pha trong dung dịch DMSO (Dimethyl Sulfoxide) đạt nồng độ dung dịch 10, 15, 20, 25 và 30 µg/µl.

### 2.2.3. Chuẩn bị vi khuẩn gây AHPND

Các chủng vi khuẩn thuần *V. parahaemolyticus* KC12.02.0, *V. parahaemolyticus* KC13.14.2 và *Vibrio* sp. KC13.17.5 lấy từ tủ lưu giữ mẫu -80°C thuộc Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1, được cấy trên đĩa thạch TCBS ủ trong tủ ấm 29°C/24 giờ để chọn khuẩn lạc đơn điển hình. Khuẩn lạc đơn được nuôi cấy lắc trong bình tam giác với môi trường NB có bổ sung 2% NaCl đặt trong tủ ấm lắc ở 29°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút trong khoảng 15 giờ thu dịch vi khuẩn.

Mật độ vi khuẩn sau khi nuôi cấy trong môi trường NB được xác định theo phương pháp đo mật độ quang (OD) ở bước sóng  $\lambda = 600\text{nm}$ . Mật độ vi khuẩn sử dụng để thử kháng sinh đồ là  $10^8$  cfu/ml.

### 2.2.4. Đánh giá tác dụng diệt khuẩn của chiết xuất thảo dược

Tác dụng diệt khuẩn của các dịch chiết được kiểm tra bằng phương pháp kháng sinh đồ khuếch tán trên đĩa thạch của Kirby-Bauer.

Các thao tác được thực hiện trong tủ cấy vi sinh Class II. Khi mật độ vi khuẩn đạt  $10^8$  cfu/ml, dùng pipet man hút 100µl canh khuẩn nhỏ vào giữa đĩa thạch MH, dùng que thủy tinh trang đều cho đến khi mặt vi khuẩn khô. Sau 10 - 15 phút, trên mặt đĩa thạch được đặt các đĩa giấy vô trùng có thấm 100µl dịch chiết lá sim hoặc dịch chiết hạt sim cùng với đĩa giấy tẩm kháng sinh Doxycyclin (30µg), Ampicillin (10µg) và DMSO (100µl). Đĩa thạch được đặt trong tủ ấm 29°C/24 giờ, đọc kết quả bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn, rồi tính số bình quân. Trong thí nghiệm, đĩa kháng sinh Ampicillin (10µg) và Doxycyclin (30µg) được sử dụng như đối chứng dương và đĩa giấy vô trùng thấm 100µl DMSO được sử dụng như đối chứng âm.

### 2.2.5. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên và được lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý thống kê sinh học sử dụng Paired *t*-test với sự sai khác có ý nghĩa  $P < 0,05$ .

## 3. KẾT QUẢ

### 3.1. Tác dụng diệt khuẩn của dịch chiết lá sim trên vi khuẩn gây AHPND

Khả năng diệt vi khuẩn gây AHPND của dịch chiết lá sim được thể hiện trên bảng 1 và hình 1-A1, B1, C1. Kết quả cho thấy dịch chiết lá sim có khả năng tiêu diệt các chủng vi khuẩn *Vibrio* gây AHPND, đường kính vòng vô khuẩn bình quân tăng dần theo liều lượng dịch chiết lá sim sử dụng. Đối với chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC12.02.0 đường kính vòng vô khuẩn thu được thấp nhất là 7,67mm ứng với

Tác dụng diệt khuẩn của dịch chiết lá sim và hạt sim (*Rhodomyrtus tomentosa*) đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm nuôi nước lợ

**Bảng 1. Tác dụng tiêu diệt vi khuẩn gây AHPND của dịch chiết lá sim *in vitro***

| Dịch chiết và kháng sinh | Hàm lượng thử nghiệm ( $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ ) | Đường kính vòng vô khuẩn (mm)/các chủng vi khuẩn |                                      |                             |
|--------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
|                          |                                                       | <i>V. parahaemolyticus</i> KC12.02.0             | <i>V. parahaemolyticus</i> KC13.14.2 | <i>Vibrio</i> sp. KC13.17.5 |
| Lá sim                   | 1.000                                                 | $7,67^a \pm 1,53$                                | $10,00^a \pm 1,00$                   | $7,67^a \pm 0,58$           |
|                          | 1.500                                                 | $8,67^{a,b} \pm 0,58$                            | $10,67^a \pm 0,58$                   | $9,33^b \pm 0,58$           |
|                          | 2.000                                                 | $9,33^b \pm 1,15$                                | $13,00^b \pm 1,00$                   | $9,67^b \pm 0,58$           |
|                          | 2.500                                                 | $12,67^c \pm 0,58$                               | $13,33^b \pm 1,53$                   | $12,33^c \pm 0,58$          |
|                          | 3.000                                                 | $13,33^c \pm 0,58$                               | $14,00^b \pm 1,00$                   | $12,67^c \pm 0,58$          |
| Dx                       | 30                                                    | $23,00^d \pm 1,73$                               | $23,33^c \pm 1,53$                   | $24,33^d \pm 1,15$          |
| Am                       | 10                                                    | 0                                                | 0                                    | 0                           |
| DMSO                     | 100 $\mu\text{l}$                                     | 0                                                | 0                                    | 0                           |

Ghi chú: a,b,c,d trên cùng một cột chỉ ra sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê  $P < 0,05$ ; Dx- Doxycylin; Am - Ampicillin; DMSO - Dimethyl sulfoxide.

nồng độ thảo dược là 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  và đường kính vòng vô khuẩn thu được cao nhất là 13,33mm ứng với nồng độ thảo dược là 30  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Tương tự đối với chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC13.14.2 đường kính vòng vô khuẩn thu được thấp nhất là 10,0mm và cao nhất là 14,0mm; Đối với chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. KC13.17.5, đường kính vòng vô khuẩn thu được thấp nhất là 7,67mm và cao nhất là 12,67mm. Tuy nhiên đường kính vòng vô khuẩn ở nồng độ dịch chiết 25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  không sai khác có ý nghĩa ( $P > 0,05$ ) đối với đường kính vòng vô khuẩn đo được ở nồng độ dịch chiết 30  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  đối với cả 3 chủng vi khuẩn thử nghiệm. Trong khi đó đường kính vòng vô khuẩn đối với 3 chủng vi khuẩn thử nghiệm này của kháng sinh Doxycylin dao động từ 23,00 - 24,33mm, của kháng sinh Ampicillin và DMSO là 0 (Bảng 1).

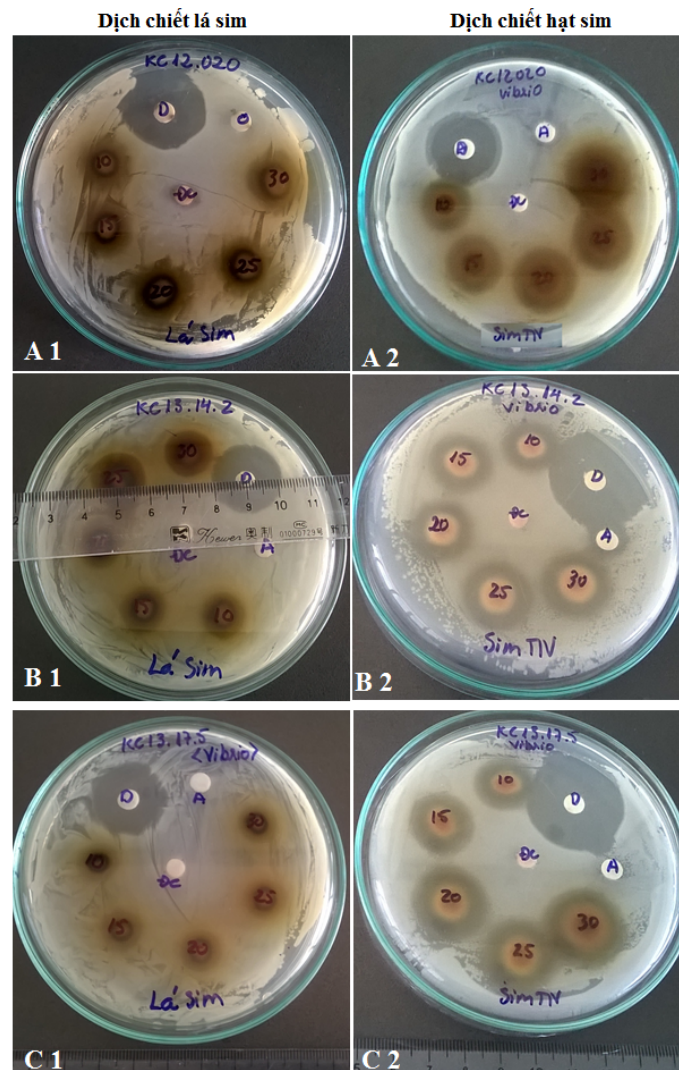
### 3.2. Tác dụng của dịch chiết hạt sim trên vi khuẩn gây AHPND

Kết quả thử nghiệm cho thấy khả năng tiêu diệt các chủng vi khuẩn *Vibrio* gây AHPND của dịch chiết hạt sim tương đối tốt. Đối với chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC12.02.0, đường kính vòng vô khuẩn dao động từ 12,67 - 18,0mm, ứng với nồng độ thảo dược sử dụng tăng dần từ 10 - 30  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Tương tự đối với chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC13.14.2 là từ 12,33 - 17,67mm và đối với chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. KC13.17.5 là từ 12,0 - 19,33mm. Đặc biệt, sự sai khác có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ )

giữa đường kính vòng vô khuẩn ở nồng độ dịch chiết 25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  và nồng độ dịch chiết 30  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  đã quan sát thấy trên 2 chủng vi khuẩn thử nghiệm là *V. parahaemolyticus* KC13.14.2 và *Vibrio* sp. KC13.17.5 (Bảng 2). Trong khi đó đường kính vòng vô khuẩn đối với 3 chủng vi khuẩn thử nghiệm này của kháng sinh Doxycylin dao động từ 23,00 - 24,33mm, của kháng sinh Ampicillin và DMSO là 0 (Bảng 2, Hình 1-A2, B2, C2).

## 4. THẢO LUẬN

Bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) hay còn gọi là hội chứng chết sớm (EMS) được ghi nhận đầu tiên ở Trung Quốc năm 2009, sau đó đến Việt Nam năm 2010, Malaysia năm 2011 và Thái Lan năm 2012 (FAO, 2013). Kết quả nghiên cứu về tác nhân gây AHPND cho thấy Plasmid có chứa gen Toxin độc lực quyết định đến khả năng gây hoại tử cấp của vi khuẩn gây AHPND (Lo et al., 2014; Sasiwipa et al., 2014). Hiện tại có ít nhất 2 loài vi khuẩn được xác định là tác nhân gây AHPND, bao gồm *V. parahaemolyticus* (Tran et al., 2013) và *V. harveyi* (Kondo et al., 2015). Trong nghiên cứu này, ba chủng vi khuẩn gây AHPND (của nhóm nghiên cứu Phan Thị Vân và cs., 2014) là *V. parahaemolyticus* KC12.02.0, *V. parahaemolyticus* KC13.14.2 và *Vibrio* sp. KC13.17.5 đã được sử dụng làm vật liệu thử nghiệm khả năng diệt khuẩn của các dịch chiết lá sim và hạt sim.



**Hình 1. Khả năng kháng vi khuẩn gây AHPND của dịch chiết lá và hạt sim**

Ghi chú: (A1, A2) Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC12.02.0; (B1, B2) Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC13.14.2; (C1, C2) Vi khuẩn *Vibrio* sp. KC13.17.5; (Am) Ampicillin (30 $\mu$ g); (Dx) Doxycycline (30 $\mu$ g) và (ĐC) Đối chứng DMSO.

**Bảng 2. Tác dụng tiêu diệt vi khuẩn gây AHPND của dịch chiết hạt sim *in vitro***

| Dịch chiết và kháng sinh | Hàm lượng thử nghiệm ( $\mu$ g/100 $\mu$ l) | Đường kính vòng vô khuẩn (mm)        |                                      |                               |
|--------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
|                          |                                             | <i>V. parahaemolyticus</i> KC12.02.0 | <i>V. parahaemolyticus</i> KC13.14.2 | <i>Vibrio</i> sp. KC13.17.5   |
| Hạt sim                  | 1.000                                       | 12,67 <sup>a</sup> $\pm$ 1,53        | 12,33 <sup>a</sup> $\pm$ 1,53        | 12,00 <sup>a</sup> $\pm$ 2,00 |
|                          | 1.500                                       | 13,00 <sup>a,b</sup> $\pm$ 2,00      | 13,67 <sup>a,b</sup> $\pm$ 1,53      | 14,33 <sup>a</sup> $\pm$ 1,15 |
|                          | 2.000                                       | 15,67 <sup>b,c</sup> $\pm$ 1,15      | 14,67 <sup>b,c</sup> $\pm$ 0,58      | 15,67 <sup>a</sup> $\pm$ 2,31 |
|                          | 2.500                                       | 17,33 <sup>c,d</sup> $\pm$ 0,58      | 15,37 <sup>c</sup> $\pm$ 1,53        | 17,33 <sup>a</sup> $\pm$ 1,15 |
|                          | 3.000                                       | 18,00 <sup>d</sup> $\pm$ 0,58        | 17,67 <sup>d</sup> $\pm$ 0,58        | 19,33 <sup>b</sup> $\pm$ 0,58 |
| Dx                       | 30                                          | 23,00 <sup>e</sup> $\pm$ 1,73        | 23,33 <sup>e</sup> $\pm$ 1,53        | 24,33 <sup>c</sup> $\pm$ 1,15 |
| Am                       | 10                                          | 0                                    | 0                                    | 0                             |
| DMSO                     | 100 $\mu$ l                                 | 0                                    | 0                                    | 0                             |

Ghi chú: a,b,c,d,e trên cùng một cột chỉ ra sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê  $P < 0,05$ ; Dx- Doxycycline; Am - Ampicillin; DMSO - Dimethyl sulfoxide.

Cả dịch chiết lá sim và dịch chiết hạt sim đều có tác dụng tiêu diệt vi khuẩn gây AHPND tốt hơn kháng sinh Ampicillin nhưng kém hơn so với kháng sinh Doxycylin (Bảng 1 và 2, Hình 1). Ampicillin không có tác dụng đối với cả 3 chủng vi khuẩn thử nghiệm (đường kính vòng vô khuẩn bằng 0) (Bảng 1 và 2), trong khi đó đường kính vòng vô khuẩn của dịch chiết lá sim đối với 3 chủng vi khuẩn này thấp nhất là 7,67mm ở nồng độ thảo dược 10 µg/µl (Bảng 1) và của dịch chiết hạt sim thấp nhất là 12,0mm ở nồng độ thảo dược 10 µg/µl (Bảng 2). Với Doxycylin, đường kính vòng vô khuẩn đối với 3 chủng vi khuẩn thử nghiệm dao động từ 23 - 24,33mm (Bảng 1 và 2), trong khi đó, đường kính vòng vô khuẩn của dịch chiết lá sim cao nhất là 14,00mm ở nồng độ thảo dược 30 µg/µl (Bảng 1) và của dịch chiết hạt sim cao nhất là 19,33mm ở nồng độ thảo dược 30 µg/µl (Bảng 2).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết quả công bố của một số nhóm nghiên cứu trước về khả năng kháng khuẩn của dịch chiết sim. Khả năng kháng khuẩn của dịch chiết lá sim trong ethyl acetate đối với *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus* đã được Dachriyanus et al. (2002) công bố. Theo nghiên cứu của Surasak et al. (2009), *Rhodomyrtone* chiết xuất từ sim có tác dụng kháng khuẩn mạnh đối với 10 chủng vi khuẩn (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), *S. epidermidis*, *Streptococcus gordonii*, *S. mutans*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* và *S. salivarius*) trong đó có vi khuẩn có khả năng kháng lại methicillin. Dịch chiết trong cồn của lá sim thể hiện khả năng kháng nhóm tụ cầu khuẩn (Jongkon et al., 2011) với nồng độ ức chế MIC<sub>50</sub> và MIC<sub>90</sub> lần lượt là 64 và 512 µg/ml. Thí nghiệm của Surasak et al. (2012) cho thấy dịch chiết cồn của sim có tác dụng kháng khuẩn mạnh đối với 47 chủng vi khuẩn gây bệnh nhóm *S. pyogenes*. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết quả của Shaw et al. (2014), khi kiểm tra kháng sinh đồ của 77 chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* đối với 26 kháng sinh thông dụng cho thấy 53% số chủng kháng lại Ampicillin và 100% số chủng mẫn cảm với Doxycylin.

Khi nghiên cứu về khả năng kháng khuẩn của dịch chiết thảo dược đối với vi khuẩn *Vibrio* spp. gây AHPND, Đặng Thị Lua và cs. (2015) cũng đã bước đầu cho thấy tiềm năng kháng vi khuẩn gây AHPND của dịch chiết lá trầu không và lá ổi với đường kính vòng vô khuẩn tương ứng dao động từ 15 - 17,3mm và 14,6 - 20mm. So sánh với kết quả trên, khả năng kháng khuẩn của dịch chiết lá sim thấp hơn nhưng khả năng kháng khuẩn của dịch chiết hạt sim cao hơn dịch chiết lá trầu không và tương đương với dịch chiết lá ổi.

Kết quả thử nghiệm cũng cho thấy, đường kính vòng vô khuẩn đạt được cao nhất của dịch chiết lá sim ở nồng độ 30 µg/µl đối với 3 chủng vi khuẩn gây AHPND là 14mm và không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ( $P > 0,05$ ) đối với nồng độ thảo dược 25 µg/µl (Bảng 1). Điều này thể hiện mặc dù dịch chiết lá sim có hoạt tính kháng khuẩn nhưng khả năng tiêu diệt vi khuẩn gây AHPND thấp (đường kính vòng vô khuẩn < 16mm). Trong khi đó, đường kính vòng vô khuẩn của dịch chiết hạt sim ở nồng độ 30 µg/µl đạt 17,67mm đối với chủng *V. parahaemolyticus* KC13.14.2, 18,00mm đối với chủng *V. parahaemolyticus* KC12.02.0 và 19,33mm đối với chủng *Vibrio* sp. KC13.17.5 (Bảng 2). So sánh với đối chứng Doxycylin, một trong số ít kháng sinh đang được khuyến cáo gần đây để dùng trong việc trị bệnh ở động vật thủy sản, trong đó có AHPND, kết quả nghiên cứu này cho biết dịch chiết hạt sim có tiềm năng phát triển thành chế phẩm thảo dược phòng trị AHPND trên tôm. Như vậy, cây sim là loại cây rất phổ biến ở nước ta, việc thu hái như phương pháp đã miêu tả rất đơn giản, dễ làm và dễ áp dụng là điều kiện thuận lợi để có nguồn vật liệu số lượng lớn.

Khi xem xét ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết hạt sim đến sự kìm hãm vi khuẩn gây bệnh, đường kính vòng vô khuẩn của dịch chiết hạt sim có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa hai nồng độ thử nghiệm 25 µg/µl và 30 µg/µl ( $P < 0,05$ ) (Bảng 2). Đối với chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC13.14.2 đường kính vòng vô khuẩn tăng có ý nghĩa từ 15,37mm lên 17,67mm ( $P = 0,037$ ) và đối với chủng *Vibrio*

sp. *KC13.17.5* đường kính vòng vô khuẩn tăng từ 17,33mm lên 19,33mm ( $P = 0,037$ ). Điều này cho thấy cần thiết phải tiến hành thêm một số thử nghiệm với các ngưỡng nồng độ khác nhau của dịch chiết hơn để xác định chính xác khả năng tiêu diệt vi khuẩn gây AHPND của dịch chiết hạt sim tương ứng với nồng độ tối ưu tiêu diệt được vi khuẩn gây AHPND.

## 5. KẾT LUẬN

Cả dịch chiết lá sim và dịch chiết hạt sim đều cho kết quả kháng vi khuẩn gây AHPND trong điều kiện *in vitro*. Tuy nhiên, dịch chiết hạt sim thể hiện hoạt tính kháng vi khuẩn gây AHPND cao hơn so với lá sim. Đối với dịch chiết hạt sim, đường kính vòng vô khuẩn đạt được là 17,67mm đối với chủng *V. parahaemolyticus* *KC13.14.2*; 18,0mm đối với chủng *V. parahaemolyticus* *KC12.02.0* và 19,33mm đối với chủng *Vibrio* sp. *KC13.17.5*, thể hiện khả năng kháng ba chủng vi khuẩn này của dịch chiết hạt sim gần bằng với kháng sinh Doxycylin. Dịch chiết hạt sim do đó có tiềm năng là nguồn nguyên liệu để phát triển sản phẩm thảo dược phòng trị AHPND trên tôm.

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106-NN.05-2013.48.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Brown J. (1989). Antibiotics: their use and abuse in aquaculture. *World Aquac.*, 20(2): 34 - 43.
- Citarasu T. (2010). Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquacult Int.*, 18: 403 - 414.
- Cos P., Vlietinck A.J., Berghe D.V., and Maes L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof of concept'. *J. Ethnopharmacol.*, 106(3): 290 - 302.
- Cục Thú y (2014). Tổng kết nuôi tôm nước lợ năm 2014 và Xây dựng kế hoạch năm 2015. Bến Tre, ngày 4/11/2014.
- Dachriyanus S., Sargent M. V., Skelton B. W., Soediro I., Sutisna M., White A. H. and Yulinah E. (2002). Rhodomyrton, an antibiotic from *Rhodomyrtus tomentosa*. *Australian Journal of Chemistry*, 55(3): 229 - 232.
- Deok J., Woo S.Y., Yanyan Y., Gyeongsug N., Ji H. K., Deok H. Y., Hyung J. N., Sukchan L., Tae W. K., Gi-Ho S., Jae Y. C. (2013). *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effect of *Rhodomyrtus tomentosa* methanol extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(1): 205 - 213.
- FAO (2013). Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPND) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304) FAO Fisheries and Aquaculture Report No 1053 (p. 54). Ha Noi, Viet Nam.
- Jongkon S., Metta O., and Supayang P. V. (2011). *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. ethanol extract and rhodomyrton: a potential strategy for the treatment of biofilm-forming *Staphylococci*. *J. Med. Microbiol.*, 60: 1793 - 1800.
- Kondo, H., Van, P.T., Dang, T.L and Hirono, I. (2015). Draft genome sequence of Non-Vibrio parahaemolyticus Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Viet Nam. *Genome Announc* 3(5): e00978-15. doi:10.1128/genomeA.00978-15.
- Lai, T. N. H., André, C. M., Chirinos, R., Nguyen, T. B. T., Larondelle, Y., Rogez H. (2014). Optimisation of extraction of piceatannol from *Rhodomyrtus tomentosa* seeds using response surface methodology. *Separation and purification technology*, 134: 139 - 146.
- Lai, T. N. H., André, C. M., Rogez, H., Mignolet, E., Nguyen, T. B. T., Larondelle, Y. (2015). Nutritional composition and antioxidant properties of the sim fruit (*Rhodomyrtus tomentosa*). *Food Chemistry*, 168: 410 - 416.
- Leano, E. M., and Mohan C.V. (2012). Early mortality syndrome threatens Asia's shrimp farms. *Global Aquaculture Advocate*, p. 38 - 39.
- Lo, C.F., Lee, C.T., Chen, I.T., Yang, Y.T., and Wang, H. C. (2014). Recent Advances in the newly emergent acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Paper presented at the 19th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture (DAA9), Ho Chi Minh city, Viet Nam.
- Nguyễn Hồng Loan (2010). Sử dụng chất chiết từ cây hoàng kỳ (*Astragalus membranaceus*) để phòng bệnh mù gan do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* trên cá tra.
- Đỗ Tất Lợi (1999). Những cây và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

Tác dụng diệt khuẩn của dịch chiết lá sim và hạt sim (*Rhodomyrtus tomentosa*) đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm nuôi nước lợ

- Đặng Thị Lua, Nguyễn Thị Hạnh, Hoàng Hải Hà, Trường Thị Mỹ Hạnh, Phan Thị Vân (2015). Tác dụng diệt khuẩn in vitro của dịch chiết lá trầu không (*Piper betle* L.) và dịch chiết lá ôi (*Psidium guajava*) đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm nuôi nước lợ. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, 11/2015: 92 - 97.
- Mahesh, B. and Satish S. (2008). Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. World J Agric Sci., 4: 839 - 843.
- Sasiwipa, T., Jumroensri T., Janejit K., Reko N., Hidehiro K., and Hirono, I. (2014). Characterization of virulence factor of AHPND *Vibrio parahaemolyticus* which is the causative agent of shrimp disease. Paper presented at the The 9th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture (DAA9), Ho Chi Minh city, Viet Nam.
- Shaw K. S., Rosenberg Goldstein R. E., He X., Jacobs J. M., Crump B. C., Sapkota A. R., (2014) Antimicrobial Susceptibility of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* Recovered from Recreational and Commercial Areas of Chesapeake Bay and Maryland Coastal Bays. PLoS ONE 9(2): e89616. doi:10.1371/journal.pone.0089616.
- Surasak L., Erik N.T., Thijs R.H.M. K., Sjouke P., Asadhawut H., Wilawan M., Supayang P. V., Jan M.D., and Oliver K. (2009). Rhodomyrtone: A new candidate as natural antibacterial drug from *Rhodomyrtus tomentosa*. Phytomedicine, 16 (6 - 7): 645 - 651.
- Surasak L., Oliver K., and Supayang P. V. (2012). Antibacterial Activity of *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. Leaf Extract against Clinical Isolates of *Streptococcus pyogenes*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Article ID 697183, 6 pages.
- Nguyễn Thanh Tâm, Nguyễn Gia Hoàng Diễm và Nguyễn Văn Bá (2012). Tác dụng kháng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* của dịch chiết một số thảo dược. Thương mại thủy sản, 152.
- Nguyễn Thị Vân Thái, Nguyễn Minh Phúc, Ngô Thị Kim, Nguyễn Kim Đô và Lưu Thị Dung (2003). Bàn về tiềm năng phòng và chữa trị bệnh nhiễm khuẩn bằng kháng sinh thảo dược trong nuôi trồng thủy sản. Báo cáo các công trình khoa học. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- Nguyễn Văn Thanh và Nguyễn Thanh Hải (2014). Nghiên cứu tác dụng diệt khuẩn in vitro của dịch chiết cây mò hoa trắng (*Clerodendron fragrans* Vent.) trên vi khuẩn *E. coli*, *Salmonella* spp. phân lập từ phân lợn con theo mẹ mắc bệnh viêm ruột tiêu chảy và thử nghiệm điều trị. Tạp chí Khoa học và Phát triển, 12(5): 683 - 689.
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohnney, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., and Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Dis. Aquat. Organ, 105: 45 - 55.
- Phan Thị Vân, Đặng Thị Lua, Nguyễn Viết Khuê, Bùi Ngọc Thanh, Phạm Thế Việt, Phạm Thị Yến, Đào Xuân Trường, Nguyễn Thị Mai Phương, Nguyễn Thị Thu Hương và Nguyễn Thị Hạnh (2014). Nghiên cứu xác định nguyên nhân gây bệnh hoại tử gan tụy trên tôm tại phía Bắc. Báo cáo tổng kết nhiệm vụ cấp Bộ năm 2014.