

THÔNG BÁO KHOA HỌC

**KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG VI KHUẨN *Streptococcus agalactiae*
PHÂN LẬP TRÊN CÁ RÔ PHI (*Oreochromis* spp.) BỞI
MỘT SỐ CAO CHIẾT THẢO DƯỢC**

**ANTIBACTERIAL EFFECT TOWARDS *Streptococcus agalactiae* ISOLATED FROM
TILAPIA (*Oreochromis* spp.) BY HERBAL EXTRACTS**

Nguyễn Thị Trúc Quyên^{1,2}, Lê Linh Chi³, Đoàn Văn Cường⁴,
Nguyễn Diễm Thu⁴, Mã Tú Lan⁴, Trần Hoàng Bích Ngọc⁴,
Nguyễn Thành Nhân⁴, Nguyễn Thị Ngọc Tĩnh^{4*}

Ngày nhận bài: 30/6/2019; Ngày phản biện thông qua: 10/9/2019; Ngày duyệt đăng: 24/9/2019

TÓM TẮT

Nghiên cứu đánh giá khả năng ức chế tăng trưởng của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* phân lập được trên cá rô phi của một số cao chiết có nguồn gốc thảo dược. Dịch chiết của năm loại thảo dược (quế, gừng, xuyên tâm liên, diếp cá, tía tô) được pha trong dung môi ethanol 96% và methanol 99,8%, sau khi xử lý nhiệt, lọc và cô quay chân không tạo được các cao chiết có nồng độ 2000 mg/ml. Kết quả cho thấy, cao chiết vỏ quế (trong ethanol 96% hoặc methanol 99,8%) cho hiệu quả kháng khuẩn cao nhất với cả *Streptococcus agalactiae* SA3 và SA4, ở mức đối kháng mạnh với đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là 17,67 mm và 16,25 mm (SA3), 33,42 mm và 32,75 mm (SA4). Cao chiết gừng và xuyên tâm liên đối kháng ở mức trung bình (đường kính vòng kháng khuẩn từ 9,50 – 13,08 mm), cao chiết diếp cá và tía tô đối kháng ở mức yếu (đường kính vòng kháng khuẩn từ 2,92 – 7,42 mm). Các giá trị MBC và MIC của cao chiết vỏ quế chiết xuất trong hai loại dung môi tương ứng là 16.000 µg/ml và 8.000 µg/ml (đối với chủng SA3), 8.000 µg/ml và 4.000 µg/ml (đối với chủng SA4). Kết quả cho thấy, cao chiết vỏ quế chiết xuất trong ethanol 96% hoặc methanol 99,8% là loại cao chiết thảo dược tiềm năng có thể sử dụng trong phòng bệnh do *Streptococcus agalactiae* gây ra trên cá rô phi.

Từ khóa: cá rô phi, cao chiết thảo dược, *Streptococcus agalactiae*, tính đối kháng

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the growth-inhibiting effect towards *Streptococcus agalactiae* isolated from infected tilapia (*Oreochromis* spp.) by herbal extracts, namely cinnamon (*Cinnamomum verum*), ginger (*Zingiber cassumunar*), king of bitters (*Andrographis paniculata*), fish mint (*Houttuynia cordata*), and perilla leaf (*Perilla frutescens*). The extracts of these herbs were prepared in ethanol 96% or methanol 99.8%, which were subsequently subjected to heat treatment and vacuum evaporation to remove the solvents. The final concentration of the herbal extracts was 2000 mg/ml. The results showed that, cinnamon extract in either ethanol 96% or methanol 99.8% exhibited the strongest growth-inhibiting effect towards *Streptococcus agalactiae* SA3 and SA4 isolates, with the diameters of inhibition zones 17.67 mm and 16.25 mm, 33.42 mm and 32.75 mm, respectively. Whereas ginger and king of bitters extracts showed a medium inhibition (diameters of inhibition zones were in the range of 9.50 – 13.08 mm), fish mint and perilla leaf showed a weak inhibition (diameters of inhibition zones were in the range of 2.92 – 7.42 mm).

The MBC (minimal bactericidal concentration) and MIC (minimal inhibitory concentration) values of cinnamon extracts were 16,000 µg/ml and 8,000 µg/ml for SA3 isolate, respectively; and 8,000 µg/ml and 4,000

¹ Bộ môn Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh

² Sở Nông nghiệp và phát triển nông thôn tỉnh Đồng Nai

³ Trường Đại học Quốc tế Tp. Hồ Chí Minh

⁴ Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản II

$\mu\text{g/ml}$ for SA4 isolate, respectively. Cinnamon extract in ethanol 96% or methanol 99.8% can be considered as a potential herbal extract for prevention of disease caused by *Streptococcus agalactiae* in tilapia.

Keywords: antagonism, herbal extracts, *Oreochromis spp.*, *Streptococcus agalactiae*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, cá rô phi (*Oreochromis spp.*) là đối tượng nuôi phổ biến ở miền Nam. Trên cá rô phi, bệnh lở loét, xuất huyết là một bệnh gây chết với tỷ lệ cao và thời gian chết nhanh ở tất cả các giai đoạn phát triển của cá (từ cá giống đến cá thịt), do đó gây thiệt hại kinh tế rất nghiêm trọng cho người nuôi nếu xảy ra (Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012). Bệnh này được xác định là do vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* gây ra. Giải pháp đang phổ biến hiện nay để phòng trị bệnh trên cá rô phi là sử dụng kháng sinh hay hóa chất. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh, hóa chất vẫn còn bộc lộ nhiều bất cập, gây nên hiện tượng kháng kháng sinh ở các loài vi khuẩn gây bệnh trên động vật thủy sản, dẫn đến hiệu quả chữa trị không có hoặc rất thấp. Ngoài ra, việc tích lũy kháng sinh trong động vật thủy sản có thể gây hại cho môi trường và cho người tiêu thụ. Do đó, việc tìm ra giải pháp thay thế là nhu cầu tất yếu.

Trong thời gian gần đây, việc sử dụng thảo dược trong phòng trị bệnh nhiễm khuẩn đang ngày càng trở nên phổ biến, do có nhiều ưu điểm như: dễ tìm kiếm, giá thành thấp, hoạt tính kháng khuẩn cao, có khả năng kích thích hệ miễn dịch tự nhiên của vật chủ, thân thiện với môi trường và không gây nên hiện tượng đề kháng thuốc (Rattanachaikunsopon và Phumkhachorn, 2009). Vỏ quế (*Cinnamomum verum*) có chứa hoạt chất cinnamaldehyde, là một hoạt chất tự nhiên với hoạt tính diệt khuẩn và điều hòa hệ miễn dịch tự nhiên. Hợp chất andrographolide được tách chiết dưới dạng tinh khiết từ lá cây xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*) có các đặc tính kháng khuẩn, kháng viêm, chống oxy hóa, kích thích miễn dịch, và điều hòa quá trình tiết enzyme của gan tụy. Củ gừng (*Zingiber cassumunar*) chứa 2-3% tinh dầu, nhựa dầu chứa 20-25% tinh dầu và 20-30% các chất

cay. Thành phần chủ yếu của nhóm chất cay là zingeron, shogaol và zingerol, trong đó gingerol chiếm tỷ lệ cao nhất. Tía tô (*Perilla ocymoides*) có chứa 0,5% tinh dầu, được sử dụng nhiều trong nhân y từ lâu đời. Nước ngâm kiệt lá tía tô có tác dụng ức chế các loại vi khuẩn như: tụ cầu khuẩn, trực khuẩn lỵ, trực khuẩn đại tràng. Dịch chiết từ lá tía tô có tiềm năng được áp dụng vào ngành công nghiệp thực phẩm như là một chất bảo quản tự nhiên (Bajpai và cộng sự, 2009). Hoạt chất decanoyl acetaldehyde (houttuynin) trong diếp cá (*Houttuynia cordata*) được xác định là có hoạt tính kháng khuẩn với *Staphylococcus aureus* và *Sarcina ureae* (Zhang và cộng sự, 2008). Ngoài ra diếp cá còn có khả năng kháng nhiều loại virus đã được nghiên cứu (do sự hiện diện của tinh dầu và flavonoid), kháng viêm, thông tiểu, làm bền thành mạch (do có chứa hợp chất quercitrin). Cao chiết diếp cá được sử dụng để phòng bệnh xơ vữa động mạch, điều trị suy yếu tĩnh mạch, xuất huyết như chảy máu cam, ho ra máu. Thành phần có tác dụng là quercetin và tinh dầu (không có decanoyl acetaldehyde).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng đối kháng vi khuẩn gây bệnh xuất huyết, lở loét trên cá rô phi trong nuôi trồng thủy sản của 05 loại cao chiết từ 05 loại thảo dược nêu trên nhằm chọn ra loại thảo dược có hiệu quả cao để làm tiền đề cho việc tạo chế phẩm thảo dược phòng trị bệnh trên cá rô phi.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Năm loại thảo dược có nguồn gốc từ các địa phương (Bảng 1).

Hai chủng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* được phân lập từ cá rô phi bệnh xuất huyết, lở loét tại bè cá ở huyện Định Quán, tỉnh Đồng Nai vào tháng 11/2017.

Bảng 1. Các loại thảo dược sử dụng trong nghiên cứu và nguồn gốc

TT	Loại thảo dược	Tên khoa học	Bộ phận sử dụng	Trạng thái	Nguồn gốc
1	Diếp cá	<i>Houttuynia cordata</i>	Toàn cây	Tươi	Huyện Hóc Môn, TP.HCM
2	Tía tô	<i>Perilla frutescens</i>	Toàn cây	Tươi	Huyện Hóc Môn, TP.HCM
3	Xuyên tâm liên	<i>Andrographis paniculata</i>	Lá	Khô	Tỉnh Bạc Liêu
4	Quế	<i>Cinnamomum verum</i>	Vỏ thân	Khô	Huyện Chợ Đồn, tỉnh Bắc Cạn
5	Gừng	<i>Zingiber cassumunar</i>	Toàn củ	Tươi	Tỉnh Lâm Đồng

Bảng 2. Các chủng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* sử dụng trong nghiên cứu

TT	Chủng vi khuẩn	Nguồn gốc phân lập	Ngày thu mẫu
1	<i>Streptococcus agalactiae</i> SA3	Bè cá rô phi ở xã Thanh Sơn,	13/11/2017
2	<i>Streptococcus agalactiae</i> SA4	huyện Định Quán, tỉnh Đồng Nai	

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1 Phương pháp thu cao chiết thảo dược thô

Nghiên cứu sử dụng phương pháp tách chiết bằng dung môi ethanol 96% và methanol 99,8% ở nhiệt độ cao để chiết cao thảo dược khô (Nayak và ctv., 2017). Các loại thảo dược tươi (diếp cá, tía tô và gừng) được sơ chế, sau đó được xắt nhỏ, sấy bằng thiết bị sấy lạnh (nhiệt độ sấy 40°C) cho đến khi độ ẩm đạt < 10%, sau đó nghiền bằng máy xay gia dụng cho đến khi thành dạng bột mịn. Vỏ quế được rửa sạch, làm khô và nghiền thành dạng bột mịn; xuyên tâm liên (đã ở dạng sấy khô) cũng được nghiền thành bột mịn. Sau đó, cho 10 g bột của mỗi loại thảo dược (tính trên khối lượng khô) vào các erlen 250 ml có chứa 100 ml của một trong hai loại dung môi (ethanol 96%, methanol 99,8%). Quá trình chiết xuất xảy ra trong bể điều nhiệt lắc ở nhiệt độ 60 °C, tốc độ lắc 120 vòng/phút, thời gian chiết xuất 120 phút. Sau đó, các dịch chiết xuất được lọc thô rồi sau đó lọc qua giấy lọc với kích thước lỗ lọc 0,45 µm rồi cô quay phần dịch lọc ở 60 °C, áp suất chân không để loại bỏ hết dung môi, thu cao chiết. Cao chiết thảo dược có nồng độ 2 g/ml, được bảo quản trong tủ lạnh ở -20°C để sử dụng trong các thí nghiệm.

2.2 Khảo sát tính đối kháng của các cao chiết thảo dược đối với các chủng *Streptococcus*

agalactiae

Nghiên cứu sử dụng phương pháp đĩa giấy khuếch tán (Kirby-Bauer, 1996) để khảo sát tính đối kháng của các cao chiết thảo dược đối với các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* phân lập được. Chủng vi khuẩn *S. agalactiae* SA3 và SA4 phân lập từ cá bệnh được nuôi cấy lắc trong môi trường Brain Heart Infusion Broth (BHI) trong 24 giờ để đạt mật độ 10⁸ CFU/ml (tương ứng Mc Farland 0,5), sau đó pha loãng 100 lần với nước muối sinh lý để đạt mật độ 10⁶ CFU/ml.

10 µl cao chiết thảo dược được tẩm vào mỗi đĩa giấy vô trùng có đường kính 6 mm. Đặt các đĩa giấy đã được tẩm cao chiết lên trên các đĩa thạch BHI agar trước đó đã được cấy trải với 1000 µl dịch khuẩn *S. agalactiae*. Mỗi nghiệm thức thảo dược được lặp lại 6 lần. Đặt các đĩa thạch vào tủ mát ở 4°C trong 15 phút và sau đó ủ trong tủ ấm ở 30°C trong 48 giờ. Tiến hành đo đường kính vòng vô khuẩn (nếu có) tạo ra xung quanh các đĩa giấy. Mức độ kháng khuẩn của cao chiết được đánh giá theo 4 mức (Faikoh và ctv., 2014):

D ≥ 15 mm: đối kháng mạnh

15 mm > D ≥ 7,5 mm: đối kháng trung bình

D < 7,5 mm: đối kháng yếu

D = 0 mm: không đối kháng

Trong đó D: đường kính vòng vô khuẩn tạo

thành xung quanh các đĩa giấy (không bao gồm đường kính đĩa giấy).

Song song đó ở các nghiệm thức đối chứng dương, các đĩa giấy có kích thước tương tự được tẩm với một trong ba loại kháng sinh thường được sử dụng trong nuôi trồng thủy sản: Kanamycin (30 µg), Doxycycline (30 µg) và Amoxiline (10 µg). Mỗi nghiệm thức với kháng sinh được lặp lại 6 lần (6 đĩa giấy/loại kháng sinh).

Tất cả các số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS 20.0, trắc nghiệm One-way ANOVA.

2.3 Xác định giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC, Minimum Inhibitory Concentration) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC, Minimum Bactericidal Concentration) của các cao chiết thảo dược

Sau khi xác định được loại cao chiết thảo dược có khả năng kháng khuẩn mạnh ở điều kiện *in vitro* thì chọn cao chiết thảo dược đó để xác định các giá trị MIC và MBC.

Thí nghiệm xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC): được thực hiện trên đĩa 96 giếng, thể tích mỗi giếng 200 µl. Mỗi loại cao chiết thảo dược được thử nghiệm với 4 lần lặp lại. Các cao chiết thảo dược được cho vào các giếng với thể tích là 100 µl/giếng và được điều chỉnh sao cho nồng độ vật chất khô trong giếng đầu tiên đạt 32.000 µg/ml. Sau đó tiến hành pha loãng bậc hai trong môi trường nước muối sinh lý, cho đến khi đạt nồng độ thấp nhất là 62,5 µg/ml (tổng cộng có 10 nồng độ). Các giếng đối chứng âm chỉ chứa 200 µl môi trường BHI. Các giếng đối chứng dương chứa 100 µl môi trường MHB. Vi khuẩn khảo sát được bổ sung vào tất cả các giếng (trừ giếng đối chứng âm) với thể tích 100 µl/giếng và mật độ vi khuẩn trong mỗi giếng đạt 104 CFU/ml. Sau đó, các đĩa 96 giếng được ủ trong tủ ẩm ở 30 °C trong 24 giờ. Sau 24 giờ, 20 µl thuốc thử resazurin 0,01% được cho vào mỗi giếng. Quan sát sự đổi màu của thuốc thử và ghi nhận giá trị MIC. Thuốc thử resazurin có màu xanh dương trong dung dịch, các giếng có sự tăng trưởng của vi khuẩn sẽ làm đổi màu của dung dịch resazurin từ màu xanh sang màu hồng. Giá trị MIC đối

với mỗi loại cao chiết thảo dược là nồng độ thảo dược thấp nhất tại đó vi khuẩn không phát triển (không làm đổi màu resazurin).

Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) được xác định bằng phương pháp trải đĩa (Oonmetta-Aree và ctv., 2006). 50 µL hỗn dịch được hút ra từ mỗi giếng thuộc 3 dãy nồng độ, bao gồm nồng độ MIC và hai nồng độ liên kế cao hơn nồng độ MIC, sau đó được cấy trải trên các đĩa thạch BHIA và được ủ ở 30°C, sau 24 giờ quan sát sự hiện diện của các khuẩn lạc trên môi trường thạch. Giá trị MBC là nồng độ thấp nhất trong 3 nồng độ của cao chiết đã được cấy trải, tại đó không có khuẩn lạc nào xuất hiện trên đĩa thạch BHIA.

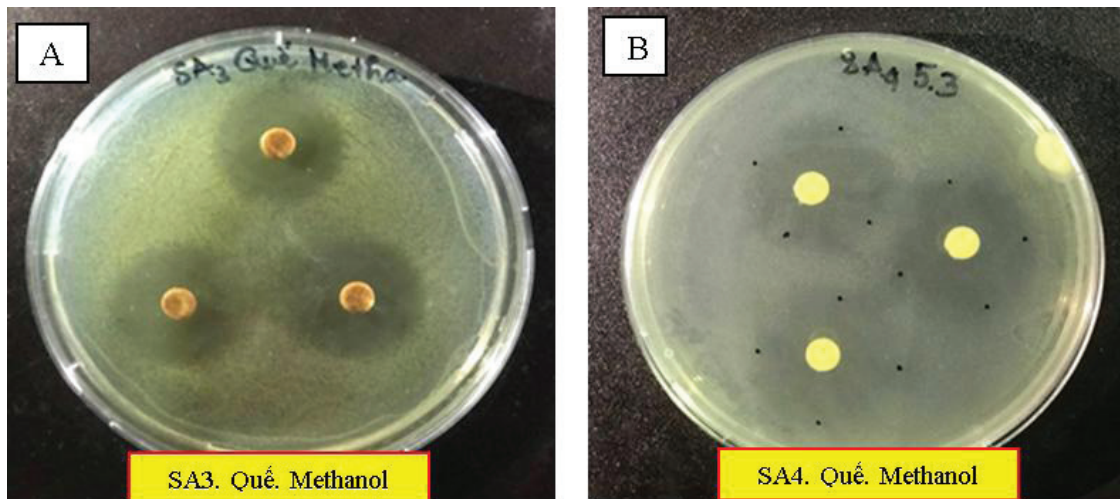
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn của các loại cao chiết thảo dược đối với hai chủng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*

Kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn của năm loại cao chiết thảo dược trong hai dung môi ethanol 96% và methanol 99,8% đối với hai chủng SA3 và SA4, được trình bày ở Hình 1 và Bảng 3.

Kết quả cho thấy, đa số các loại cao chiết thảo dược trong hai loại dung môi (ethanol 96%, methanol 99,8%) đều ức chế sự phát triển của cả hai chủng *Streptococcus agalactiae* SA3 và SA4 ở mật độ 10⁶ CFU/ml, ngoại trừ cao chiết diếp cá và tía tô trong dung môi ethanol 96%. Nhìn chung, các cao chiết trong dung môi methanol 99,8% cho kết quả đối kháng tốt hơn so với các cao chiết trong dung môi ethanol 96%, ngoại trừ đối với cao chiết vỏ quế.

Đối với chủng SA3, cao chiết vỏ quế trong cả hai dung môi ethanol 96% và methanol 99,8% đều cho kết quả đối kháng mạnh, tạo đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là 17,67 mm và 16,25 mm, và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với 4 loại cao chiết còn lại. Cao chiết diếp cá và tía tô trong dung môi ethanol 96% không tạo vòng vô khuẩn nhưng lại cho kết quả đối kháng ở mức yếu trong dung môi methanol 99,8% với đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là 7,42 mm và 6,58 mm. Cao chiết xuyên tâm liên cho kết quả đối kháng ở



Hình 1. Khả năng kháng khuẩn của cao chiết vỏ quế đối với chủng SA3 (A) và SA4 (B)

Bảng 3. Đường kính vòng vô khuẩn (mm) tạo thành xung quanh các đĩa giấy tẩm cao chiết thảo dược sau 48h tiếp xúc với vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* SA3 và SA4

Loại cao chiết/ dung môi	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)			
	<i>S. agalactiae</i> SA3		<i>S. agalactiae</i> SA4	
	Ethanol 96%	Methanol 99,8%	Ethanol 96%	Methanol 99,8%
Điếp cá	0,00 ± 0,00 ^a	7,42 ± 0,66 ^a	9,83 ± 2,02 ^b	13,08 ± 0,58 ^a
Tía tô	0,00 ± 0,00 ^a	6,58 ± 0,49 ^a	5,83 ± 1,04 ^a	11,42 ± 1,20 ^a
Xuyên tâm liên	2,92 ± 1,56 ^b	2,17 ± 1,83 ^b	10,92 ± 1,02 ^b	11,50 ± 0,45 ^a
Vỏ quế	17,67 ± 2,23 ^d	16,25 ± 1,41 ^d	33,42 ± 0,97 ^d	32,75 ± 5,38 ^c
Gừng	6,42 ± 0,86 ^c	9,50 ± 0,71 ^c	14,83 ± 0,68 ^c	19,67 ± 0,68 ^b

Ghi chú: Số liệu trình bày là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn; trên cùng một cột, các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

mức yếu trong cả hai dung môi với đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là 2,92 mm và 2,17 mm. Cao chiết gừng đối kháng ở mức trung bình khi tách chiết trong dung môi methanol 99,8% (đường kính vòng vô khuẩn là 9,50 mm) và ở mức yếu khi tách chiết trong dung môi ethanol 96% (đường kính vòng vô khuẩn là 6,42 mm).

Đối với chủng SA4, cao chiết vỏ quế trong cả hai dung môi ethanol 96% và methanol 99,8% cũng cho kết quả đối kháng mạnh, tạo đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là 33,42 mm và 32,75 mm, và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với 4 loại cao chiết còn lại. Cao chiết điếp cá và xuyên tâm liên trong cả hai dung môi đều cho kết quả đối kháng ở mức trung bình với đường kính vòng

vô khuẩn lần lượt là: 9,83 mm và 10,92 mm (dung môi ethanol 96%), 13,08 mm và 11,50 mm (dung môi methanol 99,8%). Cao chiết tía tô cho kết quả đối kháng yếu (đường kính vòng vô khuẩn là 5,83 mm) trong dung môi ethanol 96% nhưng lại đối kháng trung bình trong dung môi methanol 99,8% (đường kính vòng vô khuẩn là 11,42 mm). Cao chiết gừng cho kết quả đối kháng ở mức mạnh trong dung môi methanol 99,8% (đường kính vòng vô khuẩn là 19,67 mm) và mức trung bình trong dung môi ethanol 96% (đường kính vòng vô khuẩn là 14,83 mm).

Kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn của ba loại kháng sinh được trình bày ở Hình 2 và Bảng 4.



Hình 2. Kết quả đối kháng của Doxycycline đối với chủng SA4

Bảng 4. Đường kính vòng vô khuẩn (mm) tạo thành xung quanh các đĩa giấy thấm kháng sinh sau 48h tiếp xúc với vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* SA3 và SA4

Chủng	Loại kháng sinh	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)	Mức đối kháng (theo CLSI, 2014)
SA3	Kanamycin 30 µg	5,42 ± 0,74	Yếu
SA3	Doxycycline 30 µg	26,58 ± 1,16	Mạnh
SA3	Amoxiline 10 µg	30,33 ± 2,18	Mạnh
SA4	Kanamycin 30 µg	11,67 ± 1,17	Yếu
SA4	Doxycycline 30 µg	33,04 ± 1,91	Mạnh

Khi so sánh một cách tương đối kết quả ở bảng 3 và bảng 4, có thể thấy rằng đối với chủng SA3 thì giá trị đường kính vòng vô khuẩn tạo ra bởi cao chiết vỏ quế trong cả hai loại dung môi lớn hơn so với đường kính vòng vô khuẩn tạo ra bởi Kanamycine nhưng nhỏ hơn so với đường kính vòng vô khuẩn tạo ra bởi Doxycycline hoặc Amoxiline. Tuy nhiên nếu so sánh kết quả đối kháng đối với chủng SA4, thì cao chiết vỏ quế có khả năng tạo vòng kháng khuẩn tương đương với Doxycycline.

Với những đặc điểm ưu việt của thảo dược như an toàn sinh học, có tính kháng khuẩn cao, không có hoặc ít có tác dụng phụ (Seyyednejad và Motamedi, 2010), hiệu quả của các chất chiết xuất từ thảo dược đã được nhiều nhóm tác giả trong và ngoài nước nghiên cứu. Theo Milud và ctv (2010), dịch chiết từ vỏ quế (*Cinnamomum verum*) có tác dụng kháng *S.agalactiae* mạnh nhất so với 03 loại thảo dược còn lại trong nghiên cứu là tỏi (*Allium sativum*), đinh hương

(*Eugenia caryophyllus*) và cỏ xạ hương (*Thymus vulgaris*). Các thí nghiệm của Faikoh và ctv. (2014) thực hiện ở điều kiện in vitro cho thấy, hoạt chất cinnamaldehyde trong vỏ quế thể hiện khả năng kháng khuẩn mạnh đối với *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio vulnificus*, và *S. agalactiae*, cũng như các chủng đề kháng kháng sinh *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus*. Kết quả thí nghiệm gây cảm nhiễm cho thấy việc bổ sung cinnamaldehyde vào thức ăn giúp làm tăng tỉ lệ sống của cá ngựa vằn (*Danio rerio*) gây nhiễm với *A. hydrophila*, *V. vulnificus*, và *S. agalactiae*. Khảo sát biểu hiện gen thông qua Real-time PCR cho thấy cá ngựa vằn cho ăn thức ăn bổ sung cinnamaldehyde có sự biểu hiện gia tăng của các yếu tố miễn dịch như interleukin (IL)-1 beta, IL-6, IL-15, IL-21, tumor necrosis factor (TNF)-alpha, và interferon (INF)-gamma (Faikoh và ctv., 2014). Những kết quả này cho thấy hoạt chất cinnamaldehyde chứa trong vỏ quế có thể được sử dụng đồng thời như hoạt chất kháng khuẩn và

chất kích thích miễn dịch để bảo vệ động vật thủy sản chống lại sự nhiễm khuẩn. Trong thí nghiệm của chúng tôi, cao chiết vỏ quế từ hai dung môi khác nhau cho hiệu quả kháng khuẩn cao. Như vậy, đối với vỏ quế thì có thể nói kết quả nghiên cứu của chúng tôi là tương đồng với kết quả nghiên cứu của các nhóm tác giả khác.

Việc ứng dụng lá cây xuyên tâm liên đã được thực hiện trên động vật thủy sản. Dịch chiết bởi dung môi nước của xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*) có tác dụng kháng *S. agalactiae* mạnh (Rattanachaikunsopon và Phumkhachorn, 2009) gây bệnh trên cá rô phi. Ngoài ra, lá cây xuyên tâm liên cũng có hiệu quả như là chất kích thích miễn dịch trên cá chép Ấn Độ (*Catla catla*) (Xavier và ctv., 2012). Trong nghiên cứu của chúng tôi thì cao chiết lá xuyên tâm liên trong cả hai dung môi ethanol 96% và methanol 99,8% đều không có hiệu quả kháng khuẩn đối với chủng *S. agalactiae* SA3 nhưng lại có hiệu quả khá cao đối với chủng *S. agalactiae* SA4. Như vậy, ngoài dung môi nước thì 02 dung môi hữu cơ ethanol 96% và methanol 99,8% cũng có tiềm năng trong việc chiết xuất lá xuyên tâm liên.

Ba loại thảo dược còn lại (gừng, diếp cá, tía tô) đều được nghiên cứu lần đầu tiên về hiệu quả kháng khuẩn đối với vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*. Bước đầu nghiên cứu cũng cho thấy kết quả khá khả quan (ngoại trừ cao chiết diếp cá và tía tô trong dung môi ethanol). Dịch chiết từ củ gừng đã được báo cáo là có khả năng đối kháng với một số loài vi khuẩn gây bệnh trên động vật thủy sản trong đó có *Staphylococcus aureus*... (Ekwenye và ctv, 2005). Trên cá bống bóp (*Boshtichthys sinensis*), gừng (*Zingiber officinale*) cho thấy tiềm năng trị bệnh lở loét do vi khuẩn *Pseudomonas* spp. gây ra (Đinh Thị Vân Chung, 2012) và do vi khuẩn *Vibrio vulnificus* gây ra (Nguyễn Thị Thanh và ctv.,

2013). Ngoài ra, theo Nguyễn Đình Vinh và ctv. (2016), dịch ép từ gừng (*Zingiber officinale*) có khả năng kháng *A. hydrophila* gây bệnh trên cá lóc đen (*Channa striata* Bloch, 1793). Dịch chiết từ tía tô còn có khả năng đối kháng mạnh với các chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Streptococcus* (Del Campo và cộng sự, 2000). Nghiên cứu của Phan Thanh Tâm và cộng sự (2013) cho thấy dịch chiết tía tô trong dung môi ethanol-nước có khả năng chống oxy hóa và khả năng kháng khuẩn cao, bổ sung dịch chiết này trong sản phẩm thịt viên đã giúp kéo dài thời gian bảo quản hơn 10 ngày ở điều kiện nhiệt độ 0-4°C. Diếp cá (*Houttuynia cordata* Thunb) có khả năng đối kháng mạnh với các loài vi khuẩn thuộc nhóm *Streptococcus* (Yasuko Sekita và cộng sự, 2016). Hoạt chất Decanoyl acetaldehyde (houttuynin) trong diếp cá được xác định là có hoạt tính kháng khuẩn với *Staphylococcus aureus* và *Sarcina ureae* (Zhang và ctv., 2008). Các nghiên cứu cho thấy quercitrin trong diếp cá có tác dụng chống oxy hóa mạnh hơn cả vitamin E.

Nhìn chung, diếp cá và tía tô được cho rằng có khả năng đối kháng mạnh với vi khuẩn thuộc nhóm *Streptococcus*, củ gừng đã được nghiên cứu ứng dụng trên một số loài thủy sản. Đây là những loài thảo dược tiềm năng, có triển vọng ứng dụng cao trong tương lai đối với việc phòng trị bệnh do vi khuẩn trên thủy sản.

2. Kết quả xác định giá trị MIC và MBC của các cao chiết thảo dược

Kết quả khảo sát khả năng kháng khuẩn của các cao chiết thảo dược ở điều kiện *in vitro*, chúng tôi xác định được cao chiết vỏ quế trong cả hai dung môi ethanol 96% và methanol 99,8% có khả năng kháng khuẩn mạnh đối với hai chủng SA3 và SA4. Do đó, chúng tôi chọn hai loại cao chiết này để xác định giá trị MIC và MBC. Kết quả được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả xác định giá trị MIC và MBC của các cao chiết vỏ quế

Loại cao chiết/dung môi	Chủng	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
Vỏ quế, ethanol 96%	SA3	8.000	16.000
Vỏ quế, methanol 99,8%	SA3	8.000	16.000
Vỏ quế, ethanol 96%	SA4	4.000	8.000
Vỏ quế, methanol 99,8%	SA4	4.000	8.000

Kết quả ở bảng 5 cho thấy, đối với chủng SA3 thì cao chiết vỏ quế trong cả hai loại dung môi cho giá trị MIC và MBC tương tự nhau (tương ứng là 8.000 µg/ml và 16.000 µg/ml). Đối với chủng SA4 thì hai loại cao chiết này cho giá trị MIC và MBC thấp hơn (tương ứng 4.000 µg/ml và 8.000 µg/ml).

Theo Canillac và Mourey (2001) thì nếu tỉ lệ MBC/MIC nhỏ hơn hoặc bằng 4 thì chiết xuất được xem là có khả năng diệt khuẩn; nếu tỉ lệ MBC/MIC lớn hơn 4 thì chiết xuất có tác dụng kìm khuẩn. Như vậy, cao chiết vỏ quế trong cả hai loại dung môi đều có khả năng diệt khuẩn (MBC/MIC = 2).

Nghiên cứu trên chất chiết từ dầu đối với vi khuẩn *V. harveyi* và *V. parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm nuôi cho thấy, mức MIC tương ứng là 1.250 µg/ml và 2.500 µg/ml, mức MBC tương ứng là 2.500 µg/ml và 5.000 µg/ml. Nghiên cứu của Lương Thị Mỹ Ngân và ctv. (2018) đối với hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết lá và hoa đậm bột lên các loài vi khuẩn *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Klebsiella pneumoniae* cho thấy giá trị MIC của các cao chiết này dao động trong khoảng 2.500 – 7.500 µg/ml, trong khi giá trị MBC dao động trong khoảng 7.500 – 10.000 µg/ml. Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi trên cao chiết vỏ quế trong hai loại dung môi ethanol 96% và methanol 99,8% trên chủng SA3 và SA4 cho thấy các nồng

độ có hiệu quả ức chế và tiêu diệt vi khuẩn tương đương với hai nghiên cứu nêu trên.

IV. KẾT LUẬN

Kết quả của nghiên cứu đã chỉ ra rằng đối với cả hai chủng vi khuẩn gây bệnh trên cá rô phi, *Streptococcus agalactiae* SA3 và SA4, cao chiết vỏ quế trong cả hai dung môi ethanol 96% và methanol 99,8% cho kết quả kháng khuẩn cao nhất và ở mức đối kháng mạnh. Cao chiết này có tiềm năng ứng dụng trong tương lai trong việc phòng và trị bệnh do *Streptococcus agalactiae* gây ra trên cá rô phi.

Trong các nghiên cứu tương lai, cần tiếp tục xác định thành phần hoạt chất quyết định tính kháng khuẩn chứa trong cao chiết vỏ quế. Bên cạnh đó, cần thực hiện các nghiên cứu đánh giá tính an toàn và hiệu quả của cao chiết vỏ quế trộn vào thức ăn trong việc phòng và trị bệnh trên cá rô phi.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ thành phố Hồ Chí Minh (thuộc Sở KH&CN thành phố Hồ Chí Minh), Hợp đồng số 26/2018/HĐ-QKHCN. Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn Bộ môn Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh đã tạo mọi điều kiện thuận lợi và hỗ trợ nhóm trong quá trình thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Đặng Thị Hoàng Oanh, Nguyễn Thanh Phương, 2012. Phân lập và xác định đặc điểm của vi khuẩn *S. agalactiae* từ cá điêu hồng (*Oreochromis sp.*) bệnh phù mắt và xuất huyết. Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ 22c: 203-212.
2. Đinh Thị Vân Chung, 2012. Đánh giá khả năng kháng khuẩn của dịch ép một số loại thảo dược đối với vi khuẩn *Pseudomonas spp* gây bệnh lở loét trên cá bống bóp (*Boshtichthys sinensis*). Luận văn Thạc sĩ chuyên ngành Sinh học thực nghiệm, Đại học Vinh, Nghệ An, Việt Nam.
3. Lương Thị Mỹ Ngân, Lê Thị Kim Lan, Nguyễn Thị Thùy Linh, Nguyễn Ngọc Quý, Lê Thị Thanh Loan, Trương Thị Huỳnh Hoa, Trần Trung Hiếu, 2018. Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết lá và hoa đậm bột *Hibiscus rosasinensis* L. lên *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Klebsiella pneumoniae*. Tạp chí Phát triển Khoa học & Công nghệ, Chuyên san Khoa học Tự nhiên, Tập 2, số 1: 19-26.
4. Nguyễn Đình Vinh, Trương Thị Thành Vinh, Hồ Văn Hòa, 2016. Khả năng kháng khuẩn của dịch ép một số loại thảo dược trị bệnh lở loét do vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* gây ra trên cá lóc đen (*Channa striata*). Tạp chí Khoa học Công nghệ 9 (10), 60-64.

5. Nguyễn Thị Thanh, Trương Thị Thành Vinh, Đoàn Thị Thu Hà, Nguyễn Thị Kim Chung, Nguyễn Thị Vui, 2013. Nghiên cứu tác dụng của dịch ép từ củ tỏi và củ gừng đối với vi khuẩn trên cá bống bóp (*Boshttrichthys sinensis*) bị bệnh lở loét trong điều kiện phòng thí nghiệm. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, kỳ 1, 97-101.
6. Phan Thanh Tâm, Vũ Thị Liên, Lê Sỹ Hồng Lam, 2013. Nghiên cứu khả năng kháng khuẩn và chống oxy hóa của dịch chiết gừng, riềng, tía tô và ứng dụng trong sản xuất thịt viên. Hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc năm 2013.

Tiếng Anh

7. Bajpai, V.K., Sharif, M.A., Choi, U.K., Lee, J.H., Kang, S.C., 2009. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. Food Chemical Toxicology, 47, 1876–1883.
8. Canillac, N., Mourey, A., 2001. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excels* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. Food Microbiology, 18(3): 261-268.
9. Del Campo, J., Amiot, H. J., Nauyen-Thea, C., 2000. Antimicrobial effect of rosemary extracts. Journal of Food Protection, 63, 1359–1368.
10. Ekwenye, U.N., Elegalam, N.N., 2005. Antibacterial activity of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts on *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. International Journal of Molecular Sciences, 1, 411-416.
11. 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.
12. Kirby-Bauer, A., 1996. Antimicrobial sensitivity testing by agar diffusion method. Journal of Clinical Pathology, 44, 493.
13. Milud A., Hassan, D., Siti K. B., Ali A., 2010. Antimicrobial activities of some culinary spice extracts against *Streptococcus agalactiae* and its prophylactic uses to prevent *Streptococcal* infection in red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.). World Journal of Fish and Marine Sciences, 2(6), 532-538.
14. Nayak, D., Ashe, S., Rauta, P.R., Nayak, B., 2017. Assessment of antioxidant, antimicrobial and anti-osteosarcoma potential of four traditionally used Indian medicinal plants. Journal of Applied Biomedicine, 15(2), 119-132.
15. Oonmetta-Aree, J., Suzuki, T., Gasaluck, P., Eumkeb, G., 2006. Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. LWT-Food Science and Technology, 39(10), 1214-1220.
16. Rattanachaiakunsopon, P., Phumkhachorn, P., 2009a. Prophylactic effect of *Andrographis paniculata* extracts against *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Bioscience and Bioengineering, 107(5), 579-582.
17. Rattanachaiakunsopon, P., Phumkhachorn, P., 2009b. Shallot (*Allium ascalonicum* L.) oil: Diallyl sulfide content and antimicrobial activity against food-borne pathogenic bacteria. African Journal of Microbiology Research, 3(11), 747-750.
18. Seyyednejad, S. M., Motamedi, H., 2010. A review on native medicinal plants in Khuzestan, Iran with antibacterial properties. International Journal of Pharmacology, 6 (5), 551-560.
19. Xavier, B., Fathima Syed Ali, M., Sheeba, S., 2012. Effect of oral immunostimulant *Andrographis paniculata* and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Catla catla*. International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy (IJRAP), 3(2), 239-243.
20. Yasuko, S., Murakami, K., Yumoto, H., 2016. Preventive effects of *Houttuynia cordata* extract for oral infectious diseases. Department of Pharmacognosy, Tokushima 770-8505, Japan.
21. Zhang, W., Lu, F., Pan, S., Li, S., 2008. Extraction of volatile oil from *Houttuynia cordata* and its antibiotic and anti-virus activities. Practical Preventive Medicine, 15, 312-316.