ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN CỦA DỊCH CHIẾT CỎ MỰC ĐỐI VỚI VI KHUẨN NHIỄM TRÊN CÁ LÓC (*Channa striata*) BỆNH GAN THẬN MỦ TẠI AN GIANG

Nguyễn Thị Thúy Hằng[1*], Trịnh Thị Lan[1],
Nguyễn Hữu Yến Nhi[1], Nguyễn Thị Bích Hạnh[1]

TÓM TẮT

Vi khuẩn gây bệnh gan thận mủ trên cá lóc giống (*Channa striata*) tại An Giang có dấu hiệu bệnh lý đặc trưng như có các đốm trắng nhỏ ở gan, thận và tỳ tạng. Trên môi trường TSA, vi khuẩn có khuẩn lạc nhỏ màu vàng nhạt, sau 24 - 36 giờ ủ ở nhiệt độ 28°C, gram âm, hình que ngắn, di động, catalase và oxidase dương tính. Dựa vào đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và kết quả giải trình tự gen xác định được loài *Aeromonas schubertii*. Kết quả kháng sinh đồ của dịch chiết cỏ mực đối với vi khuẩn *Aeromonas schubertii* ở các nồng độ 0,5%; 1,0% và 1,5% đều cho kết quả có đối kháng so với đối chứng. Đường kính trung bình (ĐKTB) vòng vô khuẩn lớn nhất ở nồng độ 1,5%; kế đến là 1,0% và nhỏ nhất là 0,5% lần lượt là 15,0 ± 0,00 mm; 14,0 ± 0,00 mm và 12,7 ± 0,58 mm. Ở nồng độ 1,5% tỉ lệ sống của cá lóc giống đạt 83,3% ± 3,33 và giá trị RPS đạt 54,5% ± 15,75.

Từ khóa: Cá lóc *(Channa striata), Aeromonas schubertii,* cỏ mực *(Eclipta alba),* bệnh gan thận mủ, kháng sinh đồ

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây cỏ mực (*Eclipta alba*) là một trong những cây dược liệu được sử dụng rất lâu đời trong y học dân tộc. Cây cỏ mực chứa các thành phần như wedelolactone, eclalbasaponins, α-amyrin, ursolic axit, axit oleanolic, luteolin và apigenin, có tác dụng điều trị bệnh rối loạn tiêu hóa, rối loạn hô hấp, rối loạn về da, rụng tóc và sốt (Jahan *et al*., 2014). Bên cạnh đó, cây cỏ mực (*Eclipta alba*) là thảo mộc có chứa các hợp chất hóa học như coumestans, alkaloids, thiopenes, flavonoid, polyacetylenes, triterpenes và glycoside, các thành phần hóa học này đều đặc tính chữa bệnh và được sử dụng như một loại thuốc chống độc, giảm đau, kháng khuẩn, chống xuất huyết, hạ đường huyết, chống oxy hóa, đặc tính điều hòa miễn dịch và nó cũng được coi là một chất làm trẻ hóa tốt (Chokotia *et al*., 2013).

Trong những năm gần đây, ngành nuôi trồng thủy sản đã bị ảnh hưởng đáng kể bởi sự bùng phát của dịch bệnh, đặc biệt là bệnh do vi rút và vi khuẩn. Thuốc hóa học và thuốc kháng sinh có độc tính cao và có thể dẫn đến tình trạng kháng thuốc. Do đó, việc sử dụng thuốc kháng sinh hiện đã bị hạn chế hoặc bị cấm ở một số quốc gia. Ngược lại, các hợp chất thảo dược bổ sung vào thức ăn nuôi trồng thủy sản có thể ngăn ngừa và kiểm soát dịch bệnh của động vật thủy sản một cách an toàn, độc tính thấp và tác động môi trường tối thiểu. Nghiên cứu đã chỉ ra rằng thuốc thảo dược có vai trò quan trọng trong việc nâng cao chức năng miễn dịch của động vật thủy sản và thúc đẩy hiệu quả các hoạt động kháng virus, kháng khuẩn, ức chế ký sinh trùng của hệ thống miễn dịch. Hiện nay, nhiều nghiên cứu đang tập trung vào vai trò miễn dịch học của các chiết xuất từ các loại thảo mộc riêng lẻ, cho phép độ chính xác và giảm chi phí nuôi trồng. Kết quả nghiên cứu đã xem xét ứng dụng của thuốc thảo dược trong phòng và trị bệnh trong nuôi trồng thủy sản, đặc biệt thân thiện với môi trường (Zhu, 2020). Đồng thời theo nhận định của Blumenthal *et al*. (2000); Logambal *et al*. (2000) cho rằng việc sử dụng các sản phẩm chiết xuất từ thực vật có thể làm giảm chi phí điều trị và thân thiện với môi trường với xu hướng phân hủy sinh học, sự đa dạng cao của các hợp chất chiết xuất từ thực vật đã làm ký sinh trùng ít có khả năng kháng thuốc.

Ngày nay, một phần lớn dân số thế giới, đặc biệt là ở các nước đang phát triển ứng dụng y học

[1] Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh
*Tác giả liên hệ, email: ntthang@agu.edu.vn

cổ truyền để điều trị nhiều loại bệnh khác nhau. Các cây thuốc (thảo dược) không chỉ có thể được sử dụng để điều trị bệnh mà còn là chất kích thích tăng trưởng, chất thúc đẩy sức đề kháng với căng thẳng và là chất kháng viêm. Các thảo dược chứa tannin, alkaloid và flavonoid có có tác dụng kháng khuẩn, đồng thời, cũng có tác dụng như chất kích thích miễn dịch, tạo ra các cơ chế bảo vệ không đặc hiệu của cá và nâng cao phản ứng miễn dịch (Pandey *et al*., 2012; Olusola *et al*., 2013).

Một số loại thuốc thảo dược có tác dụng kháng khuẩn đối với tác nhân gây bệnh vi khuẩn, chẳng hạn như cây Hoàng kỳ (*Astragalus membranaceus*) (Xu *et al*., 2007), Hoàng cầm (*Scutellaria baicalensis*) (Zhao *et al*., 2016), Xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*) (Banerjee *et al*., 2017), củ Tỏi (*Allium sativum*) (Harris *et al*., 2001), Đỗ trọng (*Eucommia ulmoides*) (Peng *et al*., 2014), củ Gừng (*Zingiber officinale*) (Sukumaran *et al*., 2016) và lá bạc hà (*Mentha piperita*) (Silva *et al*., 2019), cỏ mực và lá ổi (Lê Minh Khôi và *ctv*., 2018) và nghiên cứu của cỏ mực, Rau má và cây Diệp hạ châu (Munireddy *et al*., 2012). Trong đó, cỏ mực cũng là thảo dược đã được rất nhiều nhà nghiên cứu quan tâm. Theo kết quả nghiên cứu của Christybapita *et al*. (2007) cho thấy dịch chiết từ lá cây cỏ mực khi cho cá rô phi (*Oreochromis mossambicus*) ăn có tác dụng kích thích miễn dịch không đặc hiệu chỉ sau 1 tuần cho ăn với liều 1% và làm tăng tỷ lệ sống lên 75% chỉ sau 2 tuần cho ăn. Qua đó, cho thấy rằng dịch chiết xuất từ lá của cây cỏ mực có tác dụng tăng cường các phản ứng miễn dịch không đặc hiệu và khả năng kháng bệnh xuất huyết do vi khuẩn *A. hydrophila* gây ra trên cá rô phi. Đồng thời, kết quả kháng khuẩn của dịch chiết cỏ mực đối với vi khuẩn *Aeromonas schubertii* trên cá Lóc ở các nồng độ 250 mg/mL, 125 mg/mL, 62,5 mg/mL đều được ghi nhận là có khả năng kháng khuẩn với đường kính vòng vô trùng lần lượt là 20,83 ± 0,76 mm, 16,00 ± 0,00 mm, 14,00 ± 1,00 mm (Lê Minh Khôi và *cs*., 2018). Bên cạnh đó, dịch chiết cỏ mực cũng kháng được vi khuẩn *Salmonella typhi*, *Escherchia coli và Bacillus subtilis* (Munireddy *et al*., 2012).

Ngoài ra, cũng có nghiên cứu so sánh về hoạt tính kháng khuẩn của các phần than, lá và rễ của cỏ mực. Theo kết quả xác định hoạt tính kháng khuẩn của các loại cao chiết từ rễ, thân và lá cây cỏ mực với methanol cho thấy rằng cao chiết từ thân và lá ở nồng độ 32 µg/mL cho kết quả vòng kháng khuẩn đạt từ 25,5 - 26,0 mm, lớn hơn so với cao chiết từ rễ chỉ có 14,3 mm (Đái Xuân Trang và Võ Thị Tú Anh, 2016). Từ những kết quả nêu trên cho thấy rằng dịch chiết cỏ mực rất có tiềm năng ứng dụng trong phòng và trị bệnh cho động vật thủy sản.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Cây cỏ mực được thu hái ở một số địa phương trên địa bàn tỉnh An Giang. Sử dụng thân và lá của cây cỏ mực để phơi khô, nghiền mịn và chiết xuất.

- Vi khuẩn gây bệnh gan, thận mủ được phân lập từ gan, thận cá lóc giống có biểu hiện gan thận và tỳ tạng có đốm trắng. Vi khuẩn được giải mã trình tự gen bằng phương pháp tra cứu trên ngân hàng gen NCBI.

- Đĩa giấy kháng sinh thương mại Doxycyline (30 µg) và Flophenicol (30 µg): Công ty TNHH dịch vụ và thương mại Nam Khoa, Quận 9, TP-HCM.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chiết cỏ mực

Cây cỏ mực được rửa sạch, sấy khô ở 60^{o}C và nghiền thành bột. Bột thảo dược ngâm với methanol có tỉ lệ 1 : 10 trong 3 ngày. Sau đó dịch chiết được lọc qua giấy lọc Whatman No. 1 và cô quay chân không ở 48^{o}C để loại bỏ dung môi. Hiệu suất chiết xuất: được xác định là % hiệu suất chiết xuất thảo dược và được xác định bằng công thức (Turker *et al*., 2009):

Hiệu suất (%) = [khối lượng chất chiết xuất (g)/khối lượng mẫu bột khô (g)] × 100.

2.2.2. Phương pháp phân lập và định danh vi khuẩn gây bệnh gan thận mủ trên cá lóc

Mẫu cá lóc giống bệnh được thu ở 5 ao, thu ngẫu nhiên 10 con/ao, lựa chọn những cá lóc giống có biểu hiện như cá bơi lờ đờ, bơi xoay tròn, khi giải phẫu thấy gan, thận có đốm trắng li ti, cá

bệnh nặng có thể kèm theo xuất huyết. Vi khuẩn được phân lập trên môi trường Trypton Soy Agar (TSA) và lựa chọn những khuẩn lạc phân lập được từ những những cá lóc giống có biểu hiện gan, thận mủ để định danh bằng phương pháp giải mã trình tự gen. Mẫu khuẩn lạc được định danh tại Viện công nghệ DNA và phân tích di truyền, tại Thành phố Cần Thơ.

2.2.3. Phương pháp kháng sinh đồ của vi khuẩn của dịch chiết cỏ mực đối với vi khuẩn gây bệnh gan thận mủ trên cá lóc

Lập kháng sinh đồ của vi khuẩn đã được định danh với dịch chiết của cây cỏ mực và sử dụng đĩa giấy kháng sinh thương mại Flophenicol và Docyxyline làm đối chứng. Vi khuẩn gây bệnh gan, thận mủ trên cá lóc sau khi đã được định danh tiến hành nuôi tăng sinh vi khuẩn bằng môi trường Nutrient Broth (NB). Sau đó xác định mật độ vi khuẩn đạt 10^8 CFU/mL bằng máy so màu quang phổ. Dùng pipet tiệt trùng hút 100 µL dung dịch vi khuẩn cho vào đĩa môi trường TSA và dùng que trãi thủy tinh trãi đều trên mặt thạch môi trường cho đến khi vừa khô. Sau đó, dùng dao tiệt trùng cắt lỗ thạch có đường khoảng 6 mm. Dùng pel tiệt trùng đặt các đĩa giấy thuốc kháng sinh thương mại Flophenicol và Docyxyline vào đĩa môi trường vừa được trãi vi khuẩn. Dùng micropipet hút 200 µL dịch chiết cỏ mực với các nồng độ 0,5% (0,5 g/100 mL methanol); 1,0% (1,0 g/100 mL methanol); và 1,5% (1,5 g/100 mL methanol) cho vào các giếng. Mỗi nồng độ được lặp lại 3 lần. Tất cả các đĩa được ủ ở nhiệt độ 28 - 30°C trong 24 - 48 giờ (Munireddy *et al*., 2012)

Đọc kết quả: Đo các đường kính vòng vô trùng (X) (nếu có). Xác định đường kính vô trùng của kháng sinh thương mại và dịch chiết cây cỏ mực. Kết quả Kháng: đường kính vòng vô trùng ≤ 9,0 mm; Trung bình: ≥ 10,0 - 13,0 mm; Nhạy: ≥ 14,0 mm (Lorian, 1995).

2.2.4. Thí nghiệm bổ sung dịch chiết cỏ mực 1,5% trong phòng bệnh gan thận mủ trên cá lóc giống

- Thí nghiệm được bố trí 3 nghiệm thức với 3 lần lặp lại. Cá lóc giống được bố trí mật độ là 10 con/bể 110 L, với mực nước 2/3 thể tích bể. Nghiệm thức thí nghiệm (NT1): cá lóc giống cho ăn thức ăn có trộn dịch chiết cỏ mực và có tiêm cảm nhiễm vi khuẩn gây bệnh. Nghiệm thức đối chứng âm (NT2): Cá lóc khỏe không tiêm vi khuẩn gây bệnh gan, thận mủ và không cho cá ăn thức ăn có trộn dịch chiết cây cỏ mực. Nghiệm thức đối chứng dương (NT3): Cá lóc khỏe được tiêm vi khuẩn gây bệnh gan, thận mủ với liều LD50 1,8 × 10^6 CFU/mL và không cho ăn dịch chiết cỏ mực.

- Cá thí nghiệm (NT1) được cho ăn thức ăn có trộn dịch chiết cây cỏ mực 1,5% liên tục trong 14 ngày. Sau đó, tiêm cảm nhiễm vi khuẩn gây bệnh gan, thận mủ, sau 24 giờ quan sát các hoạt động của cá, dấu hiệu bệnh lý bên trong và bên ngoài của cá, khảo sát tỷ lệ sống và xác định hiệu quả sử dụng dịch chiết cỏ mực qua giá trị RPS (%).

- Chăm sóc: Cá được cho ăn thức ăn dành riêng cho cá lóc giống của Công ty Thức ăn Thủy sản Hoàng Long với độ đạm 44%, cho cá ăn 2 lần/ngày vào buổi sáng (6 - 7 giờ) và buổi chiều (16 - 17 giờ). Cho cá ăn theo nhu cầu và tránh cho ăn quá dư thừa. Các chỉ tiêu môi trường như nhiệt độ, oxy hòa tan và pH được theo dõi ổn định và phù hợp sự phát triển của cá lóc giống trong suốt thời gian thí nghiệm. Trong thời cảm nhiễm vi khuẩn thì không thay nước trong vòng 48 giờ.

- Khảo sát tỷ lệ sống (TLS): TLS (%) = số cá sau thí nghiệm/số cá bố trí ban đầu × 100.

- Đánh giá hiệu quả sử dụng dịch chiết cỏ mực: Hiệu quả điều trị bệnh trong phòng thí nghiệm được đánh giá bằng tỉ lệ sinh tồn tương đối (relative survival rate – RPS). Giá trị RPS (%) theo công thức của Ellis (1998).

RPS (%) = [1 – (% cá chết ở nghiệm thức sử dụng /% cá chết ở nghiệm thức đối chứng dương)] × 100.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 7 năm 2021 đến tháng 6 năm 2022 tại Trường Đại học An Giang.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả chiết xuất cỏ mực

Hiệu suất dịch chiết trung bình thu được là 7,93%. Hiệu suất này thấp hơn một số thảo

dược khác như mật gấu, thầu dầu và chùm ngây nhưng tương đương với lược vàng và cao hơn lưỡi rắn. Cụ thể, theo kết quả ghi nhận hiệu suất chiết xuất của một số thảo dược được chiết suất bằng methanol cho thấy rằng hiệu suất thu được cao nhất là mật gấu (24,8%), kế đến là thầu dầu (23,5%), chùm ngây (15,3%), lược vàng (10,8%) và cuối cùng là lưỡi rắn (8,2%). Như vậy, những loại thảo dược khác nhau cho kết quả khối lượng cao chiết thảo dược và hiệu suất chiết xuất khác nhau (Hồng Mộng Huyền và *cs*., 2018). Ngoài ra, dung môi khác nhau cũng dẫn đến sự khác biệt về hiệu suất và hoạt chất thu được. Tuy nhiên, dung môi methanol và ethanol sẽ giúp ổn định tính kháng khuẩn và cũng cho hiệu suất cao hơn nước (Turker *et al*., 2009), hay hexane, ethyl axetat (Rosell and Srivastava, 1987; Febles *et al*., 1995). Bởi vì, dung môi methanol là dung môi phân cực cao, có khả năng hòa tan được những hợp chất tự nhiên có trong thảo dược (El-Mahmood and Doughari, 2008).

3.2. Kết quả phân lập và định vi khuẩn gây bệnh gan thận mủ trên cá lóc

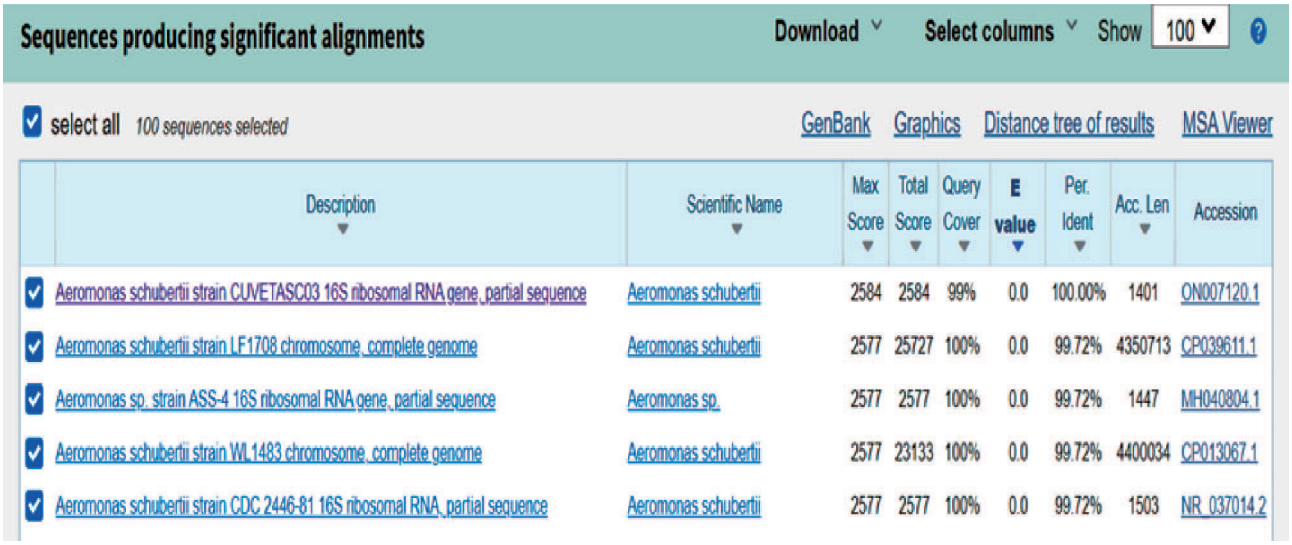
Mẫu cá lóc bệnh được thu có biểu hiện bệnh lý bên ngoài như cá lờ đờ, tấp mé ao, màu sắc nhợt nhạt, mất vảy (Hình 1). Dấu hiệu bệnh lý bên trong nội quan có nhiều đốm trắng li ti trên gan, thận và tỳ tạng (Hình 2). Kết quả phân lập 6 chủng vi khuẩn/6 mẫu cá bệnh có biểu hiện gan, thận mủ, trên môi trường TSA cho thấy rằng vi khuẩn phát triển sau 24 giờ ở 28°C, khuẩn lạc có hình tròn, lồi, rìa đều, màu kem, có đường kính từ 1 - 1,5 mm. Tất cả các chủng vi khuẩn đều là vi khuẩn gram âm, hình que ngắn, di động, phản ứng dương tính với oxidase và catalase. Sau khi kiểm tra các chỉ tiêu về hình dạng, đặc điểm khuẩn lạc và một số chỉ tiêu sinh lý, định danh giải mã trình tự gen. Kết quả giải mã 6 trình tự gen 16S và BLAST đối chiếu trên NCBI, trình tự mẫu gen tương đồng 100% với *Aeromonas schubertii* CUVETAS CO3 (Hình 3).



Hình 1. Dấu hiệu bệnh lý bên ngoài của cá Lóc bị gan thận mủ



Hình 2. Dấu hiệu bệnh lý bên trong nội tạng: gan và thận có đốm trắng (mũi tên màu vàng)



Sequences producing significant alignments — Download — Select columns — Show 100

select all 100 sequences selected — GenBank — Graphics — Distance tree of results — MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Aeromonas schubertii strain CUVETASC03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Aeromonas schubertii	2584	2584	99%	0.0	100.00%	1401	ON007120.1
Aeromonas schubertii strain LF1708 chromosome, complete genome	Aeromonas schubertii	2577	25727	100%	0.0	99.72%	4350713	CP039611.1
Aeromonas sp. strain ASS-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Aeromonas sp.	2577	2577	100%	0.0	99.72%	1447	MH040804.1
Aeromonas schubertii strain WL1483 chromosome, complete genome	Aeromonas schubertii	2577	23133	100%	0.0	99.72%	4400034	CP013067.1
Aeromonas schubertii strain CDC 2446-81 16S ribosomal RNA, partial sequence	Aeromonas schubertii	2577	2577	100%	0.0	99.72%	1503	NR_037014.2

Hình 3. Kết quả giải mã trình tự gen của vi khuẩn gây bệnh gan, thận mủ trên cá Lóc

3.3. Kết quả kháng sinh đồ của dịch chiết cỏ mực đối với vi khuẩn gây bệnh gan thận mủ trên cá lóc

Kết quả cho thấy rằng tất cả các nồng độ sử dụng đều có khả năng đối kháng vi khuẩn *A. schubertii* so với mẫu đối chứng. Trong đó, đường kính trung bình (ĐKTB) vòng vô khuẩn của dịch chiết cỏ mực nồng độ 1,5% là lớn nhất, kế đến là 1,0% và nhỏ nhất là 0,5% lần lượt tương ứng là 15,0 ± 0,00 mm; 14,0 ± 0,00 mm và 12,7 ± 0,58 mm. So với thuốc kháng sinh thương mại thì tương đương với Flophenicol và nhỏ hơn Doxycyline lần lượt là 15,3 ± 0,56 mm và 21,3 ± 1,16 mm. Khi so sánh ĐKTB vòng vô khuẩn của các thuốc kháng sinh thương mại với ĐKTB chuẩn thì cho thấy Flophenicol ở mức trung bình nhạy và có dấu hiệu kháng thuốc; trong khi đó kháng sinh Doxycyline vẫn nhạy rất cao (Bảng 1).

Kết quả kháng sinh đồ trong nghiên cứu này cũng có nhiều khác biệt so với các nghiên cứu trước đó. Chẳng hạn, ĐKTB vòng vô trùng trong nghiên cứu này tương đương với nghiên cứu của Lê Minh Khôi và *cs.* (2018) và trên cùng một tác nhân gây bệnh là vi khuẩn *Aeromonas schubertii.* Kết quả của nhóm tác giả Lê Minh Khôi và *cs.* (2018) ghi nhận rằng ở các nồng độ 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm đều được ghi nhận là có khả năng kháng khuẩn với đường kính vòng vô trùng lần lượt là 20,83 ± 0,76 mm, 16 ± 0,00 mm, 14 ± 1,00 mm. Trong khi đó ĐKTB vòng vô khuẩn lớn nhất trong nghiên cứu này chỉ 15 mm ở nồng độ 1,5% tương ứng 15.000 ppm. Ngược lại, ở một nghiên cứu khác về dịch chiết cỏ mực đối với vi khuẩn *Enterobacter cloacae* lại ghi nhận rằng ở nồng độ chỉ 32 ppm nhưng cho đường kính vòng vô khuẩn rất lớn từ 14,3 - 26 mm (Đái Xuân Trang và Võ Thị Tú Anh, 2016).

Hoạt tính kháng khuẩn của cỏ mực trên các chủng vi khuẩn thử nghiệm cũng không giống nhau. Cỏ mực đều có khả năng tác động đến các vi khuẩn gây bệnh trên cá như *Edwardsiella ictaluri, Edwardsiella tarda* và *Aeromonas hydrophila*, tương ứng với nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là 256 - 512 µg/mL, kế đến 512 µg/mL và 256 - 512 µg/mL (Huỳnh Kim Diệu và Lê Thị Loan Em, 2011). Ngoài ra, cũng có nghiên cứu so sánh về hoạt tính kháng khuẩn của các phần thân, lá và rễ của cỏ mực. Theo kết quả xác định hoạt tính kháng khuẩn của các loại cao chiết từ rễ, thân và lá cây cỏ mực với methanol cho thấy rằng cao chiết từ thân và lá ở nồng độ 32 µg/mL cho kết quả vòng kháng khuẩn đạt từ 25,5 - 26 mm, lớn hơn so với cao chiết từ rễ chỉ có 14,3 mm (Đái Xuân Trang và Võ Thị Tú Anh, 2016). Trên thực tế khi trộn dịch chiết cỏ mực vào thức ăn để tăng tỉ lệ sống và kích thích miễn dịch tự nhiên cho cá rô phi chỉ với liều 1% đã có hiệu quả. Theo kết quả nghiên cứu của Christybapita *et al.* (2007) cho thấy dịch chiết từ lá cây cỏ mực khi cho cá rô phi (*Oreochromis mossambicus*) ăn có tác dụng kích thích miễn dịch không đặc hiệu chỉ sau 1 tuần cho ăn với liều

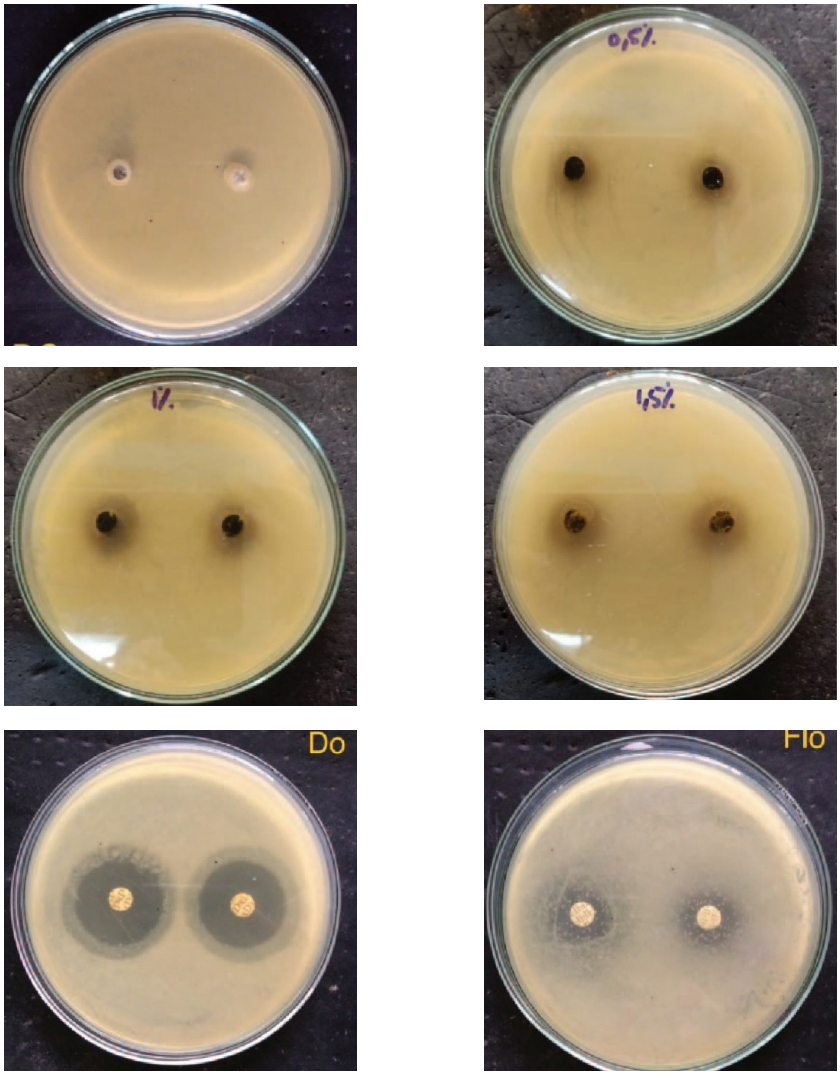
1% và làm tăng tỷ lệ sống lên 75% chỉ sau 2 tuần cho ăn. Qua đó, cho thấy rằng dịch chiết xuất từ lá của cây cỏ mực có tác dụng tăng cường các phản ứng miễn dịch không đặc hiệu và khả năng kháng bệnh xuất huyết do vi khuẩn *A. hydrophila* gây ra trên cá rô phi.

Kết hợp kết quả kháng sinh đồ của nghiên cứu này với các kết quả nghiên cứu trước đó và kết quả thống kê từ bảng 1 thì nồng độ dịch chiết cỏ mực 1,5% là thích hợp nhất để khuyến cáo người nuôi có thể ứng dụng dịch chiết cỏ mực để phòng và trị bệnh cho cá lóc giống. Kết quả từ bảng 1 cho thấy rằng ở 3 mức nồng độ sử dụng dịch chiết cỏ mực thì nồng độ 1,5% có giá trị ĐKTB vòng vô khuẩn khác biệt so với nồng độ 0,5% ($p < 0,05$) và không khác biệt với nồng độ 1% ($p > 0,05$). Tuy nhiên, ĐKTB vòng vô khuẩn của nồng độ 1,5% là lớn nhất và tương đương với ĐKTB vòng vô khuẩn của kháng sinh thương mại Flophenicol ($p > 0,05$).

Bảng 1. Kết quả thống kê ĐKTB vòng vô khuẩn của cỏ mực và thuốc kháng sinh thương mại

STT	Nồng độ (%)	ĐKTB (mm)
1	NT1 - 0,5	$12,7^{c} \pm 0,58$
2	NT2 - 1,0	$14,0^{bc} \pm 0,00$
3	NT3 - 1,5	$15,0^{b} \pm 0,00$
4	NT4 - Doxycyline	$21,3^{a} \pm 1,16$
5	NT5 - Flophenicol	$15,3^{b} \pm 0,58$

Ghi chú: Trong cùng 1 cột, các số có chữ theo sau khác nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).



Hình 4. Kết quả kháng sinh đồ của dịch chiết cỏ mực đối với vi khuẩn *Aeromonas schubertii*

3.4. Kết quả tỉ lệ sống và hiệu quả phòng bệnh của dịch chiết cỏ mực đối với cá lóc giống bệnh gan, thận mủ

Kết quả cho thấy rằng sau khi tiêm cảm nhiễm vi khuẩn gây bệnh một số cá có biểu hiện choáng và lờ đờ, nhưng sau 10 phút thì cá hoạt động trở lại bình thường. Sau 7 ngày theo dõi về tỉ lệ sống và giá trị RPS cho kết quả ghi trong bảng 1.

Bảng 1. Kết quả thống kê hiệu quả phòng bệnh của dịch chiết cỏ mực 1,5%

STT	NT	TLS (%)	RPS (%)
1	NT1	83,3 a ± 3,33	54,6 ± 15,75
2	NT2	80,7 a ± 3,33	
3	NT3	63,3 b ± 3,33	
P-value		*0,001*	

Ghi chú: Trên cùng một cột các chữ số mang cùng chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê (P < 0,05).

Tỉ lệ sống của cá lóc giống ở nghiệm thức cho ăn dịch chiết cỏ mực 1,5% đạt 83,3% ± 3,33 tương đương với đối chứng âm 80,7% và khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p > 0,05) nhưng lại khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng dương chỉ 63,3% ± 3,33 (p < 0,05). Đồng thời, giá trị RPS-Hiệu quả sử dụng dịch chiết cỏ mực đạt 54,6% ± 15,75 (Bảng 1). Như vậy, với giá trị RPS đạt được có thể sử dụng nồng 1,5% để phòng bệnh cho cá lóc giống. Bởi theo Amend (1981), giá trị RPS > 50% đã mang lại hiệu quả cao và có thể khuyến cáo sử dụng.

Kết quả tỉ lệ trong nghiên cứu này cao hơn kết quả nghiên cứu của Christybapita *et al*. (2007) khi cho cá rô phi (*Oreochromis mossambicus*) ăn thức ăn có bổ sung dịch chiết từ lá cây cỏ mực đã làm tăng tỷ lệ sống lên 75% chỉ sau 2 tuần cho ăn. Đồng thời, hiệu quả làm tăng tỉ lệ sống của dịch chiết cỏ mực cũng cao hơn so với hiệu quả của dịch tỏi trong phòng bệnh tôm chết sớm ở tôm thẻ chân trắng. Cụ thể, kết quả gần đây của Nguyễn Thị Hạnh và *cs*. (2021) đã cho thấy rằng tỉ lệ sống của tôm thẻ chân trắng được nâng lên đến 53% khi cho ăn thức ăn có trộn 15 mL dịch tỏi lên men/kg thức ăn/ngày, trong vòng 10 ngày.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Kết quả chiết xuất dịch chiết cỏ mực theo quy trình nhận được hiệu suất tương đối cao là 7,93%. Kết quả phân lập và định vi khuẩn gây bệnh gan thận mủ trên cá lóc giống là vi khuẩn *Aeromonas schubertii*. Kết quả kháng sinh đồ cho đường kính vòng vô trùng lớn nhất ở nồng độ 1,5% đối với vi khuẩn *Aeromonas schubertii*. Kết quả bổ sung dịch chiết cỏ mực vào thức ăn cho cá lóc giống trong thời gian 14 ngày liên tục có khả năng phòng bệnh hiệu quả và làm tăng tỉ lệ sống của cá lóc so với các nghiên cứu trước đó. Do đó, có thể khuyến cáo sử dụng dịch chiết cỏ mực nồng độ 1,5% để phòng bệnh gan, thận mủ trên cá lóc giống hiện nay.

4.2. Đề nghị

Đây là kết quả bước đầu cho thấy sự hiệu quả của dịch chiết cỏ mực đối với vi khuẩn *A. schubertii* gây bệnh gan, thận mủ trên cá lóc giống. Do đó, sử dụng kết quả nghiên cứu này để làm cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo tại hộ nuôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Huỳnh Kim Diệu và Lê Thị Loan Em, 2011. Đánh giá đặc tính thuần chủng và hoạt tính kháng khuẩn của cây cỏ mực (*Eclipta prostrate*) và cây diệp hạ châu thân xanh (*Phyllanthus niruri*) ở đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học,* 19a: 149-155.

Hồng Mộng Huyền, Võ Tấn Huy và 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 (Số chuyên đề: Thủy sản) (2): 143-150.

Lê Minh Khôi, Lê Nguyễn Thu Dung, Huỳnh Huy Cẩm Tú, Nguyễn Bảo Trung và Từ Thanh Dung, 2018. Ảnh hưởng của các chiết xuất từ lá ổi (*Psidium guajava*) và cỏ mực (*Eclipta alba*) lên sự đề kháng bệnh đốm trắng nội tạng ở cá lóc (*Channa striata*).

Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, 54 (Số chuyên đề: Thủy sản) (2): 177-186.

Đái Thị Xuân Trang và Võ Thị Tú Anh, 2016. Khảo sát hoạt tính kháng oxy hoá và kháng vi khuẩn *Enterobacter cloacae* của các cao chiết từ cây cỏ mực (*Eclipta alba* Hassk.). *Science & Technology Development,* 19 (5): 76-83.

Amend, D.F., 1981**.** Potency testing of fish vaccines. In *International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines*. Developments in Biological Standardization, 49, 447-454.

Banerjee, M., Moulick, S., Bhattacharya, K.K., Parai, D., Chattopadhyay, S., Mukherjee, S.K., 2017. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing, virulence and biofilm formation by extracts of Andrographis paniculata. *Microbial Pathogenesis,* 113: 85-93.

Blumenthal, M, Goldberg A, Brinckmann, J., 2000. *Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs*. Copyright American Botanical Council. Published by Integrative Medicine Communications, 1029 Chestnut Street, Newton, MA 02464: p. 401-403.

Chokotia L S, Pranav V, Rajkumar S, Harsha M., 2013. Pharmacological activities of *Eclipta alba* (L.). *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences*, 2 (4): 499-502. ISSN: 2278-0238.

Christybapita, D., Divyagnaneswari, M. And Michael, R.D., 2007. Oral administration of Eclipta alba leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and diseases of *Oreochromis mossambicus*. *Fish & Shellfish Immunology,* 23 (4): 840-852.

El-Mahmood, A.M. and Doughari, J.H., 2008. Phytochemical screening and antibacterial evaluation of the leaf and root extracts of *Cassia alata* Linn. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology,* 2 (7): 124-129.

Ellis, A.E. 1988. *General principles of fish vaccination*. In: Fish vaccination. A.E. Ellis, editor. Academic Press. San Diego, p. 1-19.

Febles, C.I., Arias, A., Gil-Rodrigez, M.C., Hardisson, A. and Sierra Lopez, A., 1995. *In vitro* study of antimicrobial activity in algae (Chlorophyta, Phaeophyta and Rhodophyta) collected from the coast of Tenerife. *Anuario del Instituto de Estudios Canarios,* 34: 191-192.

Harris, J.C., Cottrell, S.L., Plummer, S., Lloyd, D., 2001. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Applied Microbiology Biotechnology,* 57(3) 282-286.

Jahan R, Abdullah A, Snehali M, and Mohammed R., 2014. Ethnopharmacological Significance of *Eclipta alba* (L.) Hassk. (Asteraceae). *International Scholarly Research Notices.* Volume 2014, Article ID 385969, 22 pages.

Logambal, S.M., S. Venkatalakshmi, and R. Dinakaran Michael., 2000. Immunostimulatory effect of leaf extract of *Ocimum sanctum* Linn. in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Hydrobiologia,* 430.1 (2000): 113-120.

Lorian V., 1995**.** The need for surveillance for antimicrobial resistance. *Infection Control & Hospital Epidemiology,* 16.11 (1995): 638-641.

Munireddy D, Mannarreddy P, Manavalan T, and Puthupattu T., 2012. Synergistic antibacterial effect of methanolic extract of certain indian medicinal plants. *Journal of Modern Biotechnology*, 1 (1): 5-18.

Olusola, S.E., B.O. Emikpe, and F.E. Olaifa., 2013. The potentials of medicinal plant extracts as bio-antimicrobials in aquaculture. *International Journal of Medicinal Aromatic Plants*, 3.3 (2013): 404-412.

Pandey G, Madhuri S and A. K. Mandloi., 2012. Medicinal plants useful in fish diseases. *Plant Archives,* 12 (1): 1-4. ISSN 0972-5210.

Peng, W., Ge, S., Li, D., Mo, B., Daochun, Q., Ohkoshi, M., 2014. Report: molecular basis of antibacterial activities in extracts of Eucommia ulmoides wood. *Pakistan Journal Pharmaceutical Sciences,* 27: 2133-2138.

Rosell, K.G. and Srivastava, L.M., 1987. Fatty acids as antimicrobial substances in brown algae. *Hydrobiologia,* 151/152: 471-475.

Silva de S., L.T. de Pádua Pereira, U. de Oliveira, H.M. Brasil, E.M. Pereira, S.A. Chagas, E.C. Mourino & Martins M.L., 2019. Hemato-immunological and zootechnical parameters of Nile tilapia fed essential oil of Mentha piperita after challenge with Streptococcus agalactiae. *Aquaculture,* 506: 205-211.

Sukumaran, V., Park, S.C., Giri, S.S., 2016. Role of dietary ginger *Zingiber officinale* in improving growth performances and immune functions of *Labeo rohita* fingerlings. *Fish Shellfish Immunol.,* 57: 362-370. doi: 10.1016/j.fsi.2016.08.056.

Turker, H., Yıldırım, 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.

Xu, H.D., You, C.G., Zhang, R.L., Gao, P., Wang, Z.R., 2007. Effects of Astragalus polysaccharides and astragalosides on the phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis by macrophages. *Journal of International Medical Research,* 35: 84-90.

Zhao, Q., Chen, X.Y., Martin, C., 2016. Scutellaria baicalensis, the golden herb from the garden of Chinese medicinal plants. *Science Bulletin. (Beijing),* 61: 1391-1398.

Zhu Fei, 2020. A review on the application of herbal medicines in the disease control of aquatic animals. *Aquaculture,* 526 (2020): 735422.

Evaluation of antimicrobial potential of extracts from *Eclipta alba* against bacteria causing snakehead (*Channa striata*) bacillary necrosis disease at An Giang province

Nguyen Thi Thuy Hang, Trinh Thi Lan,
Nguyen Huu Yen Nhi, Nguyen Thi Bich Hanh

Abstract

Bacteria causing internal white spot disease in snakehead fish fingerling (*Channa striata*) in An Giang province have typical clinical signs as whitish nodules in the liver, spleen and kidney. On tryptic soya agar, the bacteria have small pale yellow colonies, after incubating at 28°C for 24-36 hours, negative Gram and short rod-shaped, motile, catalase and oxidase positive. Based on morphological, physiological, biochemical and genetic sequencing results, *Aeromonas schubertii* species were identified. The result of the antibacterial activity of extracts from *Eclipta alba* for *Aeromonas schubertii* with 0.5%; 1.0% and 1.5% dosage showed that all concentrations had antagonism compared with the control. The average diameter of inhibition ring was largest at a concentration of 1.5%; followed by 1.0% and 0.5%, respectively, such as 15.0 ± 0.00 mm; 14,0 ± 0.00 mm and 12.7 ± 0.58 mm. At the concentration of 1.5%, the survival rate of snakehead fish was 83.3% ± 3.33 and the RPS value was 54.5% ± 15.75.

Keywords: *Channa striata, Aeromonas schubertii, Eclipta alba,* internal white spot disease, antimicrobial activity

Ngày nhận bài: 16/02/2023
Ngày phản biện: 10/3/2023
Người phản biện: TS. Đặng Thụy Mai Thy
Ngày duyệt đăng: 28/3/2023

SỰ HIỆN DIỆN CỦA LOÀI *Aeromonas* spp. Ở CÁ TRA BỆNH XUẤT HUYẾT VÀ BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ CÁC KIỂU HÌNH LIÊN QUAN ĐẾN ĐỘC LỰC CỦA CHỦNG *Aeromonas hydrophila*

Lê Thị Thu Thảo[1], Vũ Thị Thanh Hương[1], Bùi Nguyễn Chí Hiếu[1],
Hồ Phú Khánh[2], Phan Đỗ Trọng Nghĩa[3], Ngô Huỳnh Phương Thảo[1,*]

TÓM TẮT

Aeromonas spp. là các tác nhân gây bệnh chính trong thủy sản, tuy nhiên việc định danh loài *Aeromonas* spp. bằng phương pháp PCR hiện chưa có độ chính xác cao. Bằng phương pháp giải trình tự gen *gyrB*, 40% chủng *Aeromonas* spp. trong tổng số 77 chủng được phân lập từ cá tra bị xuất huyết là chủng *A. hydrophila* và 49% số chủng khảo sát là *A. dhakensis.* Điều này cho thấy, dịch xuất huyết ở ao nuôi cá tra không chỉ bởi tác nhân chính *A. hydrophila* gây ra mà còn có sự hiện diện của *A.dhakensis.* Trong 332 chủng *Aeromonas* spp. khảo sát, 83 chủng *A. hydrophila* độc lực cao (vAh) và 03 chủng *A. hydrophila* không có độc lực (non-vAh) được phát hiện. Khi so sánh một số yếu tố kiểu hình liên quan đến độc lực của hai nhóm này, nhóm vAh có hoạt tính exoprotease cao hơn so với nhóm non-vAh, trong khi đó khả năng bơi sau 48 h ủ của nhóm non-vAh mạnh hơn so với nhóm vAh. Khả năng tạo màng sinh học biofilm và khả năng dịch chuyển bề mặt của hai nhóm chủng không có sự khác nhau.

Từ khóa: Cá tra, bệnh xuất huyết, *Aeromonas* spp., *gyrB*, biofilm, exoprotease

[1] Phòng Công nghệ sinh học Thủy sản, Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh
[2] Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh
[3] Đại học Quốc tế, Đai học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh
* Tác giả liên hệ, email: nhpthao.snn@tphcm.gov.vn