

Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của một số cao chiết thảo mộc đối với *Aeromonas schubertii* gây bệnh đốm trắng nội tạng ở cá lóc (*Channa* sp.)

Lê Văn Hậu^{1*}, Lê Minh Nghĩa², Đặng Đình Khiêm³, Nguyễn Thị Huỳnh Như⁴, Lê Thị Thu Thảo¹, Ngô Huỳnh Phương Thảo¹

¹Phòng Công nghệ Sinh học Thủy sản, Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh, 2374 Đỗ Mười, phường Trung Mỹ Tây, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Khoa Sinh học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, phường Chợ Quán, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Khoa Khoa học Sinh học, Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, phường Linh Trung, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁴Công ty TNHH Pilmico Việt Nam, xã Bình Thành, tỉnh Đồng Tháp, Việt Nam

Ngày nhận bài 11/8/2025; ngày chuyển phản biện 12/8/2025; ngày nhận phản biện 30/8/2025; ngày chấp nhận đăng 8/9/2025

Tóm tắt:

Nghiên cứu nhằm đánh giá khả năng kháng khuẩn của năm loại cao chiết thảo mộc gồm lá bàng (LB), trà không (TK), lá ổi (OI), lá sen (LS) và xuyên tâm liên (XTL) đối với *Aeromonas schubertii* CL238 - tác nhân gây bệnh đốm trắng nội tạng trên cá lóc (*Channa* sp.). Phương pháp giếng khuếch tán trên đĩa thạch được sử dụng để xác định hoạt tính kháng khuẩn, đồng thời xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC). Nghiên cứu cho thấy, cả năm loại cao chiết đều có khả năng ức chế sự phát triển của *A. schubertii* CL238. Trong đó, các cao chiết LB, TK và OI có MIC/MBC là 6,25/12,5 mg/ml; còn LS và XTL có MIC/MBC là 12,5/25 mg/ml. Dựa trên hiệu lực kháng khuẩn, hai cao chiết TK và OI được chọn để đánh giá tính an toàn trên cá lóc giống ở liều 1xMBC và 5xMBC. Kết quả theo dõi trong hai tuần cho thấy, liều 1xMBC không gây chết cá (tỷ lệ sống 100%), trong khi liều 5xMBC ghi nhận tỷ lệ sống lần lượt là 85±5% (TK) và 35±5% (OI). Ngoài ra, liều gây chết 50% (LD₅₀) của vi khuẩn *A. schubertii* CL238 trên cá lóc giống (7 g/con) được xác định là 1,7x10² CFU/ml. Kết quả cho thấy, cao chiết trà không có tiềm năng cao nhất trong phòng ngừa bệnh đốm trắng nội tạng trên cá lóc.

Từ khóa: *Aeromonas schubertii*, bệnh đốm trắng nội tạng, cao chiết thảo mộc, *Channa* sp..

Chỉ số phân loại: 1.6, 4.5, 4.6

Evaluation of the antibacterial activity of selected herbal extracts against *Aeromonas schubertii* causing visceral white spot disease in Snakehead fish (*Channa* sp.)

Văn Hậu Lê^{1*}, Minh Nghĩa Lê², Đình Khiêm Đặng³, Thị Huỳnh Như Nguyễn⁴, Thị Thu Thảo Lê¹, Huỳnh Phương Thảo Ngô¹

¹Department of Aquacultural Biotechnology, Biotechnology Centre of Ho Chi Minh City, 2374 Do Muoi Street, Trung My Tay Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh City, 227 Nguyen Van Cu Street, Cho Quan Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Faculty of Biological Sciences, Nong Lam University - Ho Chi Minh City, Linh Trung Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁴Pilmico Vietnam Co., Ltd., Binh Thanh Commune, Dong Thap Province, Vietnam

Received 11 August 2025; revised 30 August 2025; accepted 8 September 2025

Abstract:

This study aims to evaluate the antibacterial activity of five herbal extracts, *Terminalia catappa* (LB), *Piper betle* (TK), *Psidium guajava* (OI), *Nelumbo nucifera* (LS), and *Andrographis paniculata* (XTL), against *Aeromonas schubertii* CL238, a pathogenic agent responsible for visceral white spot disease in Snakehead fish (*Channa* sp.). The agar well diffusion method was employed to assess antimicrobial activity, as well as determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). All five extracts exhibited inhibitory effects against the growth of *A. schubertii* CL238. Specifically, the LB, TK, and OI extracts demonstrated MIC/MBC values of 6.25/12.5 mg/ml, while LS and XTL presented MIC/MBC values of 12.5/25 mg/ml. Based on their demonstrated antibacterial efficacy, the TK and OI extracts were selected to assess safety on Snakehead fingerling fish at doses of 1xMBC and 5xMBC. After a two week observation period, the 1xMBC dose caused no mortality (100% survival) for both extracts, whereas the 5xMBC dose resulted in survival rates of 85±5% (TK) and 35±5% (OI). Furthermore, the median lethal dose (LD₅₀) of *A. schubertii* CL238 on fingerling Snakehead fish (7 g/fish) was determined to be 1.7x10² CFU/ml. The results indicated that betel leaf extract showed the most favourable preliminary profile among the tested extracts.

Keywords: *Aeromonas schubertii*, *Channa* sp., herbal extract, visceral white spot disease.

Classification numbers: 1.6, 4.5, 4.6

*Tác giả liên hệ: Email: lvhau.shtp@tphcm.gov.vn

1. Đặt vấn đề

Cá lóc (*Channa sp.*) là đối tượng thủy sản đang được nuôi phổ biến ở các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long như An Giang, Đồng Tháp, Cần Thơ [1]. Trong những năm qua, để nâng cao năng suất và đầu ra, cá lóc được nuôi theo mô hình thâm canh với mật độ cao [2]. Đây cũng là một trong những nguyên nhân chính khiến dịch bệnh lan rộng, ảnh hưởng nghiêm trọng đến sản xuất và hiệu quả kinh tế nuôi cá lóc thương phẩm ở khu vực Đồng bằng sông Cửu Long [3]. Trong nuôi trồng thủy sản, nhóm vi khuẩn *Aeromonas spp.* thường tìm thấy trong môi trường nước, chúng gây thiệt hại đáng kể cho đối tượng thủy sản trên toàn thế giới [4, 5]. Trong đó, vi khuẩn *Aeromonas schubertii* được xác định là tác nhân gây bệnh mới nổi trong các mô hình nuôi thủy sản [6, 7]. Vi khuẩn *A. schubertii* được phát hiện lần đầu tiên trên thế giới là gây bệnh ở người [8]. Năm 2010, nguyên nhân gây chết hàng loạt trên cá lóc nuôi tại Trung Quốc được xác định là do *A. schubertii* [9].

Tại Việt Nam, nghiên cứu đầu tiên về bệnh đốm trắng nội tạng trên cá lóc được xác định là do vi khuẩn *A. schubertii* gây ra [10]. Đồng thời, *A. schubertii* cũng được ghi nhận gây bệnh đốm trắng nội tạng trên cá lóc nuôi thâm canh ở bốn tỉnh Trà Vinh, An Giang, Đồng Tháp và Đồng Nai, bệnh thường xảy ra trên cá lóc giống [1] với tỷ lệ mắc bệnh 45-50%, gây ảnh hưởng đến sự phát triển của cá lóc nuôi và gây thiệt hại nghiêm trọng về kinh tế [1, 11]. Những nghiên cứu gần đây cho thấy, *A. schubertii* phân lập từ cá lóc bị bệnh ở tỉnh Vĩnh Long, An Giang, Cần Thơ có khả năng kháng đồng thời nhiều loại kháng sinh [12-14]. Điều này chứng tỏ rằng, việc phòng và điều trị bệnh đốm trắng nội tạng ở cá lóc sẽ trở nên khó khăn hơn. Ngày nay, giải pháp xử lý sinh học bằng các dược liệu thảo mộc được xem là lựa chọn tối ưu và cần thiết, đem tới những tác động tích cực trong điều trị bệnh, an toàn và hiệu quả đối với cá lóc thương phẩm. Do đó, nghiên cứu về các sản phẩm có nguồn gốc từ thảo mộc thiên nhiên là cần thiết để góp phần xử lý các bệnh trên cá lóc hiện nay, hướng đến mô hình nuôi thương phẩm bền vững, đảm bảo an toàn sinh học và giá trị thương mại của thủy sản.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Mẫu cá lóc có biểu hiện bệnh đốm trắng nội tạng được nuôi trên bể xi măng tại xã Bình Thành, tỉnh Đồng Tháp, Việt Nam (10°32'42.0"N 105°31'28.4"E).

Các loại thảo mộc khô có nguồn gốc tại Việt Nam gồm lá bàng, lá trầu không, lá ổi, lá sen và xuyên tâm liên được cung cấp bởi Công ty TNHH Tấn Phát, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam.

Cá lóc giống thử nghiệm có trọng lượng khoảng 7 g/con được mua tại trại giống của Hợp tác xã Tương Lai (xã Tân An Hội, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam), cá được thuần dưỡng trong bể composite hai tuần trước khi tiến hành thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập, định danh chủng vi khuẩn *A. schubertii* CL238

Mẫu gan, thận của cá bệnh được cấy rìa trên môi trường TSA, xuất hiện các khuẩn lạc màu vàng nhạt, tròn đều, hơi lồi ở tâm. Kích thước khoảng 0,5-1,5 mm sau khi ủ 24-48 giờ.

Định danh vi khuẩn phân lập bằng phương pháp giải trình tự gen *16S rRNA* với cặp mồi 27F- 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3', 1492R- 5'-TACGGTTACCTTGTACGACT-3' [15]. Khuẩn lạc đơn của các chủng được tăng sinh trong 5 ml môi trường TSB (Himedia, Ấn Độ), ủ 28°C, lắc 240 vòng/phút, 24 giờ. Dịch tăng sinh qua đêm (1 ml) được dùng để tách DNA bằng bộ kit Thermo Fisher Scientific. Phản ứng PCR được thực hiện với bộ kit DreamTaq PCR Master Mix 2X. Thành phần phản ứng gồm có 1 µl DNA, 0,2 µM mỗi mồi (PhusaBiochem), 1X DreamTaq Green PCR Master Mix trong tổng thể tích 25 µl. Chương trình nhiệt gồm một chu kỳ 94°C trong 5 phút, 30 chu kỳ với 94°C trong 30 giây, 60°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây, và một chu kỳ 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%. Kết quả điện di được quan sát bằng máy chụp ảnh gel điện di GelDoc-it2. Sản phẩm khuếch đại được tinh sạch bằng bộ kit GeneJET Thermo Fisher Scientific (Mỹ). Khoảng 200-300 ng/µl sản phẩm PCR đã tinh sạch và 1,6 µM mỗi tương ứng được dùng để giải trình tự bằng BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Mỹ). Thành phần phản ứng PCR BigDye gồm 1 µl mẫu DNA, 1,6 µM mỗi, 2 µl BigDye™ Terminator v3.1 và 1X dung dịch đệm trong thể tích 20 µl. Chương trình nhiệt gồm 30 chu kỳ, nhiệt độ bắt cặp 50°C và bổ sung thêm bước kéo dài ở 60°C trong vòng 4 phút. Sản phẩm PCR BigDye sau đó được tinh sạch bằng hỗn hợp NaOAc 3M: EDTA 125 mM: ethanol 99% với tỷ lệ 1:1:25 và ethanol 70%, trước khi được giải

trình tự trên dòng máy Genetic Analyzer 3500 (Hitachi). Mỗi đoạn trình tự được giải hai chiều. Các trình tự được phân tích bằng công cụ Align Sequence trong phần mềm MEGA 6 [16] và công cụ BLAST trên ngân hàng gen NCBI.

2.2.2. Ngâm và thu hồi các cao chiết thảo mộc sử dụng trong nghiên cứu

Ngâm và thu hồi cao chiết thảo mộc: Thảo mộc khô được xay nhuyễn thành bột mịn, ngâm trong dung môi ethanol 70° (w/v: 1/10) trong 72 giờ. Sau đó dịch chiết được lọc chân không qua giấy lọc Whatman có kích thước lỗ 25 µm, tiếp tục ngâm kiệt thảo mộc lần hai với ethanol 70°. Tất cả dịch chiết được cô quay chân không (BUCHI Labortechnik AG) ở nhiệt độ 50°C thu hồi ethanol, sấy khô cao chiết ở 65°C đến khối lượng không đổi, sau đó cao chiết khô sẽ được hòa tan với dung môi DMSO với nồng độ cuối 0,5%. Tính hiệu suất thu hồi cao chiết như sau:

$$\text{Hiệu suất (\%)} = \frac{\text{khối lượng cao chiết khô (g)}}{\text{khối lượng mẫu bột khô (g)}} \times 100 \quad [17]$$

2.2.3. Khảo sát hoạt tính kháng vi khuẩn *A. schubertii* CL238

Khảo sát hoạt tính kháng vi khuẩn *A. schubertii* CL238 của các cao chiết thảo mộc bằng phương pháp giếng khuếch tán đĩa thạch [18].

Cách tiến hành: Vi khuẩn *A. schubertii* CL238 được nuôi cấy trong môi trường TSB, lắc 250 vòng/phút ở 28°C, thời gian 24 giờ. Ly tâm 4.000 vòng/phút, ở 4°C, trong 15 phút thu cặn; huyền phù cặn với nước muối 0,85% sao cho OD_{600nm}=0,5. Trải 100 µl dịch vi khuẩn *A. schubertii* CL238 trên môi trường MHA được hấp khử trùng và đổ đĩa petri với độ dày 4-5 mm. Sau đó, tiến hành đục lỗ thạch, đường kính mỗi giếng 8 mm. Hút 30 µl cao chiết thảo mộc sàng lọc được pha loãng ở các nồng độ 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 mg/ml được nhỏ vào giếng. Kháng sinh Doxycycline (100 µg/ml) và dung môi DMSO cho thí nghiệm được làm đối chứng cho thí nghiệm. Tiến hành ủ ở 28°C, trong thời gian 24 giờ, ghi nhận đường kính vòng kháng khuẩn D (mm) xung quanh bề mặt giếng thạch. Chúng vi khuẩn *E. coli* ATCC 25922 được sử dụng song song để đảm bảo chính xác của thí nghiệm. Chúng vi khuẩn được tăng sinh trong môi trường LB lỏng hấp vô trùng ở điều kiện 37°C, 250 vòng/phút, trong 24 giờ. Sau đó tiến hành các bước thí nghiệm tương tự như đối với chủng vi khuẩn *A. schubertii* CL238. Thí nghiệm được thực hiện lặp lại ba lần.

2.2.4. Đánh giá nồng độ cao thảo mộc ức chế tối thiểu và nồng độ tiêu diệt tối thiểu đối với chủng vi khuẩn *A. schubertii* CL238

Khi biết được nồng độ bắt đầu xuất hiện vòng kháng khuẩn của cao chiết thảo mộc, bắt đầu khảo sát nồng độ ức chế tối thiểu chủng vi khuẩn *A. schubertii* CL238. Tính nhạy cảm của vi khuẩn *A. schubertii* CL238 đối với một hợp chất xác định dựa vào nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ tiêu diệt tối thiểu (MBC). MIC là nồng độ thấp nhất trong dãy nồng độ thử nghiệm của một hợp chất có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *A. schubertii* CL238 sau một thời gian ủ xác định. MBC là nồng độ thấp nhất làm giảm 99,9% lượng vi khuẩn *A. schubertii* CL238 ban đầu. Cao thảo mộc được đánh giá nồng độ MIC nhằm xác định nồng độ cao mà ở đó ức chế được 80% sự tăng trưởng của vi khuẩn *A. schubertii* CL238. Phương pháp pha loãng các cao chiết bậc hai trên đĩa 96 giếng được sử dụng để xác định nồng độ MIC đối với cao tổng của các thảo mộc mà có thể ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn *A. schubertii* CL238 (không làm đổi màu resazurin).

Tiến hành thực hiện khảo sát MIC như sau: hai chủng vi khuẩn *A. schubertii* CL238 và *E. coli* được tăng sinh tương tự như ở thí nghiệm kiểm tra khuếch tán đĩa thạch. Môi trường MHB được bơm 100 µl vào các giếng từ cột thứ 2 của đĩa 96 giếng. Thảo mộc được pha loãng như bảng 1.

Bảng 1. Nồng độ pha loãng của các cao thảo mộc trên đĩa 96 giếng.

Cao chiết	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nồng độ pha loãng thảo mộc ở đĩa 96 giếng (mg/ml)	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,195

Dịch vi khuẩn sau đó được bơm 100 µl vào mỗi giếng, ở các giếng đối chứng sẽ thay thế bằng dung môi DMSO, Doxycycline (1.000 µg/ml). Các đĩa 96 giếng trên được ủ trong điều kiện 24 giờ, ở 28°C. Sau đó 30 µl thuốc thử resazurin 0,01% được cho vào mỗi giếng và quan sát sự đổi màu để đánh giá MIC. Các giếng có sự đổi màu từ xanh sang hồng cho thấy có sự tăng trưởng của vi khuẩn trong giếng.

Giá trị MBC là nồng độ thấp nhất trong dãy nồng độ của các dịch cao chiết có thể tiêu diệt toàn bộ vi khuẩn *A. schubertii* CL238. Từ kết quả của thí nghiệm, xác định MIC mẫu ở các giếng không làm đổi màu thuốc thử resazurin được kiểm tra để xác định MBC của cao thảo mộc bằng phương pháp trải đĩa. 100 µl hỗn hợp từ các giếng kiểm tra MIC không chuyển sang màu hồng được trải lên môi trường thạch có nhiệt độ phù hợp với vi khuẩn được kiểm tra, quan sát sự xuất hiện của vi khuẩn sau thời gian phù hợp để xác định MBC, thí nghiệm được lặp lại ít nhất ba lần.

2.2.5. Đánh giá tính an toàn của cao chiết thảo mộc chọn lọc

Cao chiết TK và OI được hòa tan trong nước muối 0,85% ở hai nồng độ 1xMBC và 5xMBC, trung hòa ở nhiệt độ phòng sau ba giờ trước khi tiêm vào xoang bụng cá [19].

Thí nghiệm gồm: NT đối chứng âm, đối chứng dương và bốn nghiệm thức thảo mộc 1xMBC (12,5 mg/ml) và 5xMBC (62,5 mg/ml) cho hai loại thảo mộc (TK và OI). Mỗi nồng độ được bố trí 10 cá/bể và lặp lại hai lần, phương pháp tiêm vào xoang bụng với 100 µl/cá, đối chứng dương tiêm nước muối 0,85%. Thời gian theo dõi triệu chứng và ghi nhận tỷ lệ cá chết trong hai tuần.

2.2.6. Xác định liều gây chết 50% (LD_{50}) của chủng vi khuẩn *A. schubertii* CL238

Vi khuẩn *A. schubertii* CL238 được tăng sinh trên môi trường TSB, lắc 200 vòng/phút ở 28°C trong 24 giờ. Ly tâm thu sinh khối ở 4.000 vòng/phút, 20 phút, 4°C, rửa vi khuẩn hai lần bằng nước muối 0,85% và điều chỉnh về các nồng độ (10^2 , 10^3 , 10^4 CFU/ml), xác định lại nồng độ vi khuẩn bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch TSA. Tiến hành tiêm xoang bụng với liều 100 µl/cá (10 cá/bể, lặp lại hai lần), nghiệm thức đối chứng được tiêm nước muối 0,85%. Cá được tiếp tục nuôi trong bể nhựa 60 l với hệ thống cấp/xả nước và thổi khí độc lập. Thời gian theo dõi trong hai tuần.

Liều gây chết 50% (LD_{50}) được xác định theo công thức: $LD_{50} = 10^{a-x}$ [20], trong đó: a là số lũy thừa mà tại đó vi khuẩn gây chết thấp nhất (trên 50%), x được tính dựa vào công thức: $x = (Pa - 50) / (Pa - Pu)$ với Pa là tỷ lệ chết cận trên và Pu là tỷ lệ chết cận dưới của liều gây chết 50%.

2.2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. Các số liệu ghi nhận và xử lý theo các thuật toán xác suất thống kê và vẽ biểu đồ tỷ lệ sống/chết tích lũy của các thí nghiệm bằng phần mềm GraphPad Prism 8.0 với mức ý nghĩa ($p < 0,05$). Cây phát sinh loài, giá trị bootstrap được xử lý bằng phần mềm MEGA 6.

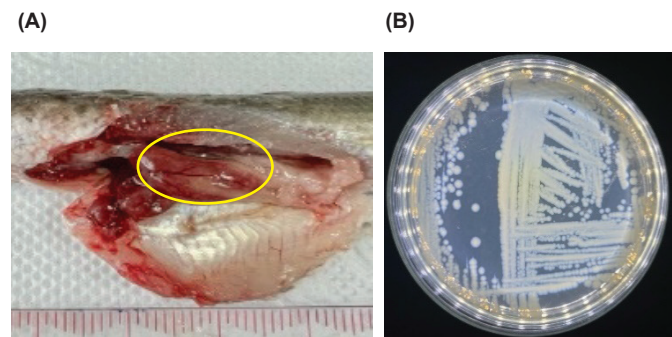
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân lập và định danh chủng vi khuẩn *A. schubertii* CL238

3.1.1. Phân lập chủng vi khuẩn *A. schubertii* CL238

Gan cá lóc bị bệnh xuất hiện nhiều nốt trắng, đục - đây là biểu hiện tổn thương điển hình ở cơ quan nội tạng

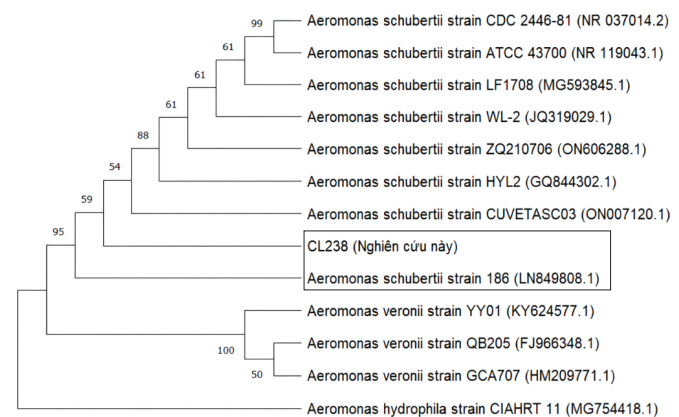
khi cá bị nhiễm khuẩn (hình 1). Các nghiên cứu trước đây đã ghi nhận cá lóc nhiễm *A. schubertii* thường có các biểu hiện bệnh lý đặc trưng như gan sưng to, hoại tử, xuất huyết dưới da, dịch đục trong xoang bụng và tổn thương nghiêm trọng ở gan và thận [1, 9]. Những dấu hiệu này giúp định hướng sớm nguyên nhân gây bệnh là do vi khuẩn thuộc chi *Aeromonas* gây ra.



Hình 1. Giải phẫu bệnh phẩm và phân lập vi khuẩn. (A) Gan cá có nhiều nốt trắng, đục; **(B)** Hình dạng khuẩn lạc CL238 mọc trên môi trường TSA sau 48 giờ cấy ria.

Khuẩn lạc của chủng CL238 mọc trên môi trường TSA sau 48 giờ cho thấy đặc điểm hình thái điển hình: tròn, bờ đều, hơi lồi, màu vàng đục, đường kính 1-1,5 mm, phù hợp với mô tả khuẩn lạc của *A. schubertii* trong các nghiên cứu trước đây [1, 10].

3.1.2. Định danh chủng vi khuẩn *A. schubertii* CL238 bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA



Hình 2. Vị trí trong cây quan hệ di truyền của chủng *A. schubertii* CL238 trong nghiên cứu này so với các trình tự tham chiếu trên GenBank. Cây quan hệ di truyền có độ tin cậy tối đa được xây dựng cho vùng gen 16S rRNA bằng cách sử dụng mô hình Kimura 2 tham số và 1.000 bản sao bootstrap. Các giá trị bootstrap trên 50% được hiển thị tại các điểm phân nhánh. Trình tự gen từ nghiên cứu này được xác định là *A. schubertii*.

Cây quan hệ di truyền (hình 2) được xây dựng dựa trên trình tự gen 16S rRNA có kích thước 1281 bp được so sánh với các chủng vi khuẩn thuộc chi *Aeromonas*,

với giá trị bootstrap thể hiện mức độ tin cậy gốc nhánh. Kết quả phân tích cho thấy, chủng CL238 có quan hệ gần gũi với các chủng *Aeromonas schubertii*, cùng nhánh với chủng *A. schubertii* 186 (mã số LN849808.1) với giá trị bootstrap là 95. Các chủng *A. schubertii* (CDC 2446-81, ATCC 43700, LF1708, WL-2, Z20170706, HYL2, CUVETASCO3) tạo thành một nhóm có giá trị bootstrap dao động từ 54 đến 99, cho thấy đây là nhóm đồng nhất về mặt di truyền. Chủng CL238 nằm gần các chủng này củng cố giả thuyết rằng nó thuộc cùng loài với *A. schubertii*. Trong khi đó, các chủng *Aeromonas veronii* (YY01, QB205, GCA707) tạo thành một nhóm riêng biệt với giá trị bootstrap cao (giá trị 100), cho thấy sự phân tách rõ ràng về mặt di truyền giữa *A. veronii* và *A. schubertii*. Chủng *A. hydrophila* CIAHRT 11 nằm ở nhánh ngoài.

3.2. Kết quả đối kháng của năm loại cao chiết thảo mộc

3.2.1. Kết quả đánh giá khả năng kháng khuẩn *A. schubertii* CL238 bằng phương pháp giếng khuếch tán

Kết quả thu nhận hiệu suất cao chiết thảo mộc được ghi nhận tại bảng 2.

Kết quả thu hồi cao chiết từ năm loại thảo mộc cho thấy, hiệu suất thu hồi dao động từ 12,00 đến 18,84%, phản ánh sự khác biệt đáng kể về hàm lượng chất chiết xuất trong từng loại nguyên liệu. Cao chiết LS trong nghiên cứu này có hiệu suất thu hồi cao nhất với 18,84%,

Bảng 2. Hiệu suất thu hồi của năm loại cao chiết thảo mộc.

STT	Cao chiết thảo mộc	Khối lượng cao lần 1 (g)	Khối lượng cao lần 2 (g)	Hiệu suất thu hồi (%)
1	LB	4,17	0,91	16,68
2	TK	3,78	1,99	15,16
3	OI	3,65	1,41	14,16
4	LS	4,71	1,12	18,84
5	XTL	3,00	0,85	12,00

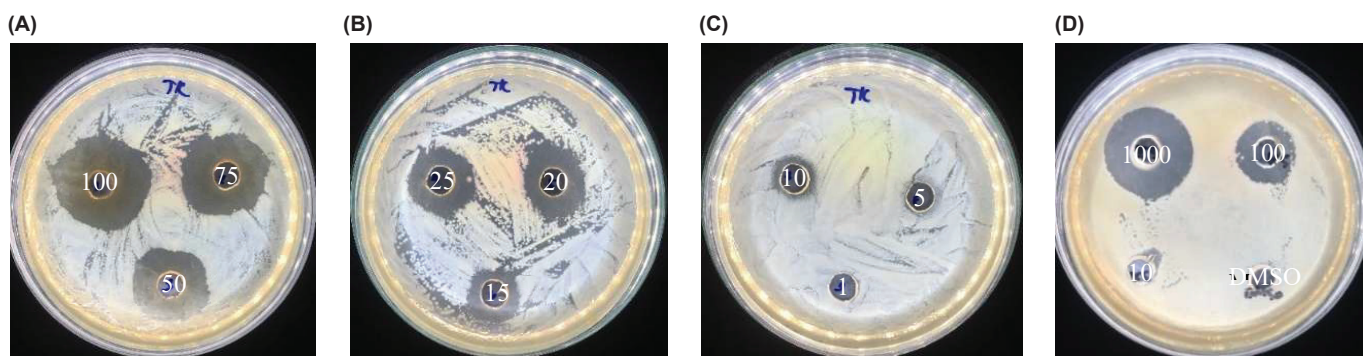
cho thấy nguyên liệu giàu các hợp chất có thể hòa tan trong dung môi ethanol 70%, trong khi kết quả nghiên cứu của K.S. Lee và cs (2006) [21] với hiệu suất thu hồi cao chiết trong ethanol 70% đạt 8,16%. Sự khác biệt này có thể phụ thuộc vào nguồn gốc, thời gian thu hoạch thảo mộc. XTL cho hiệu suất thu hồi thấp nhất 12,00%, có thể do hàm lượng tinh dầu và diterpenoid trong cây thường tồn tại ở nồng độ thấp và yêu cầu dung môi hoặc điều kiện chiết xuất đặc biệt hơn để đạt hiệu quả cao. Ngoài ra, các cao chiết LB, TK và OI chứa các hợp chất tanin, phenolic và saponin cho hiệu suất thu hồi trung bình từ 14 đến 16%. Sự khác biệt về hiệu suất thu hồi giữa các nguyên liệu phản ánh sự đa dạng trong thành phần hóa học của các hợp chất cũng như mức độ tương tác với các dung môi chiết khác nhau.

Kết quả đánh giá khả năng kháng khuẩn bằng phương pháp giếng khuếch tán đĩa thạch của năm loại cao chiết thảo mộc với chủng vi khuẩn *A. schubertii* CL238 được ghi nhận tại bảng 3 và hình 3.

Bảng 3. Kết quả đường kính vòng vô khuẩn của các cao chiết thảo mộc ở các nồng độ khác nhau [22].

Nồng độ (mg/ml)	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)				
	LB	TK	OI	LS	XTL
100	21,50 ^{ab} ±1,80	30,50 ^a ±4,33	25,67 ^{ab} ±3,79	27,33 ^{ab} ±0,76	22,67 ^b ±3,51
75	20,17 ^a ±2,57	28,00 ^a ±4,58	22,00 ^a ±4,00	23,00 ^a ±3,00	21,50 ^a ±3,77
50	18,67 ^a ±3,33	25,67 ^a ±6,05	20,00 ^a ±3,46	19,67 ^a ±2,08	20,50 ^a ±3,91
25	16,17 ^a ±3,33	23,00 ^a ±6,08	18,00 ^a ±1,80	17,67 ^a ±0,57	18,00 ^a ±2,65
20	15,33 ^a ±2,31	21,83 ^a ±5,39	16,00 ^a ±3,46	14,33 ^a ±0,57	17,00 ^a ±1,50
15	14,00 ^{ab} ±2,00	20,17 ^a ±4,19	14,17 ^{ab} ±3,33	7,67 ^{ab} ±6,66	12,67 ^b ±2,52
10	11,67 ^a ±0,57	16,00 ^a ±4,00	12,50 ^a ±2,60	0 ^b	4,00 ^{ab} ±6,93
5	9,00 ^{ab} ±8,54	13,33 ^a ±3,06	11,50 ^a ±1,00	0 ^b	0 ^b
1	4,33 ^a ±7,51	3,67 ^a ±6,35	0 ^b	0 ^b	0 ^b

Các ký tự trong cùng một hàng khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

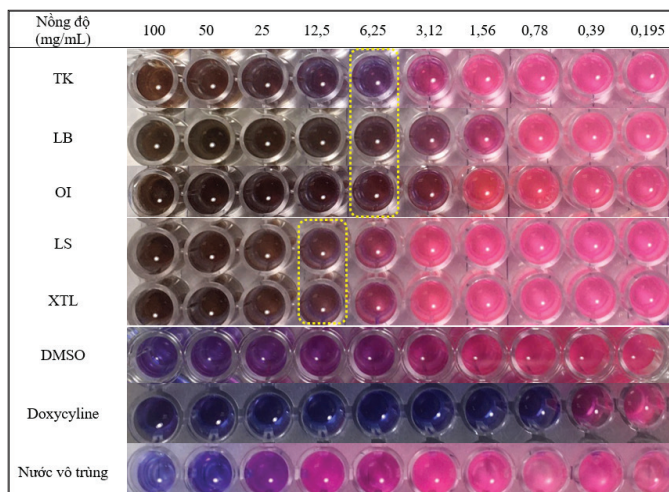


Hình 3. Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết thảo mộc không đối với vi khuẩn *A. schubertii* CL238. (A) Nồng độ 100, 75, 50 mg/ml; (B) Nồng độ 25, 20, 15 mg/ml; (C) Nồng độ 10, 5, 1 mg/ml; (D) Đối chứng: Doxycycline (1.000, 100, 10 µg/ml) và DMSO.

Thành phần cao chiết thảo mộc thường chứa các loại chất chống oxy hóa mạnh như flavonoid, tannin, saponin, steroid [23]. Trong đó, đặc biệt nhóm flavonoids (morin, morin-3-Olyxoside, morin-3-O-arabinoside, quercetin, quercetin-3-O-arabinoside) có khả năng kháng lại một số vi khuẩn gây bệnh phổ biến trên cá nước ngọt như: *A. hydrophila*, *F. columnare*, *S. agalactiae*... [24]. Các hợp chất trên có tác động trong việc kháng khuẩn thông qua việc phá vỡ thành tế bào, ngăn chặn sự tổng hợp protein và DNA, ức chế tiết enzyme của vi khuẩn [25].

3.2.2. Kết quả đánh giá nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ tiêu diệt tối thiểu (MBC)

Giá trị MIC của năm loại cao chiết đối với vi khuẩn *A. schubertii* CL238 được mô tả trong hình 4, phản ánh kết quả đánh giá *in vitro* về khả năng kháng khuẩn của các mẫu thử cao chiết ở các nồng độ pha loãng khác nhau.



Hình 4. Đánh giá *in vitro* khả năng kháng khuẩn của năm loại cao chiết với vi khuẩn *A. schubertii* CL238.

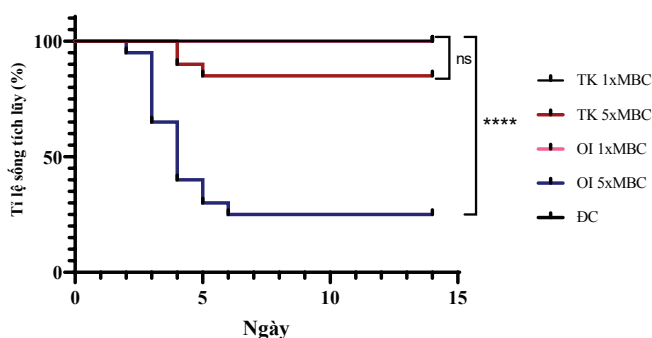
Bảng 4. Kết quả nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của năm loại cao chiết thảo mộc.

Thảo mộc	MIC	MBC	MBC/MIC
TK	6,25 mg/ml	12,5 mg/ml	2
LB	6,25 mg/ml	12,5 mg/ml	2
OI	6,25 mg/ml	12,5 mg/ml	2
LS	12,5 mg/ml	25 mg/ml	2
XTL	12,5 mg/ml	25 mg/ml	2
Doxycycline	15,62 µg/ml	31,25 µg/ml	
Nước vô trùng	x	x	
DMSO	0,25 ml	0,5 ml	

Khi giá trị $MBC/MIC \leq 4$, dịch chiết thảo mộc được xem là có khả năng diệt khuẩn, trong khi giá trị $MBC/MIC > 4$ chỉ cho thấy, tác dụng kìm khuẩn [26]. Dựa trên tiêu chí này, kết quả nghiên cứu cho thấy cả năm cao chiết đều có giá trị $MBC/MIC = 2$, chứng tỏ tất cả các loại cao chiết đều có khả năng diệt vi khuẩn *A. schubertii* CL238. Đáng chú ý, các cao chiết LB, OI và TK có giá trị MIC/MBC là 6,25/12,5 mg/ml, thấp hơn so với LS và XTL với MIC/MBC là 12,5/25 mg/ml, minh chứng hiệu lực diệt khuẩn của LB, OI và TK mạnh hơn so với hai cao chiết còn lại.

3.2.3. Đánh giá tính an toàn của cao chiết thảo mộc TK và OI trên cá lóc giống

Dựa trên kết quả đánh giá khả năng kháng khuẩn thông qua phương pháp giếng khuếch tán và giá trị MIC/MBC, hai cao chiết TK và OI đã được lựa chọn để tiếp tục đánh giá tính an toàn trên cá lóc giống, không chọn LB vì tính đối kháng *in vitro* không ổn định như TK và OI. Kết quả về tỷ lệ sống tích lũy (%) sau khi xử lý được trình bày ở hình 5.

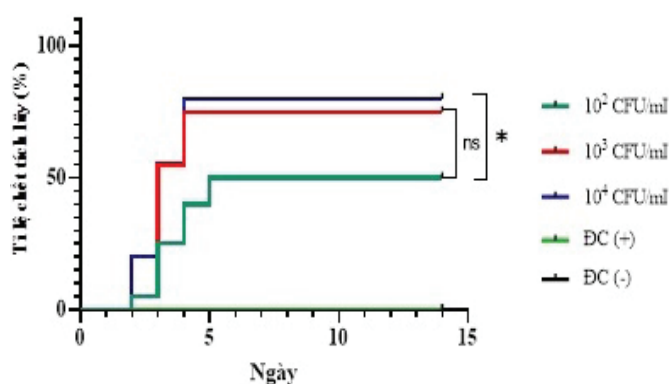


Hình 5. Tỷ lệ sống tích lũy (%) của cá lóc giống sau tiêm ổ bụng với thảo mộc TK và OI ở hai nồng độ 1xMBC và 5xMBC.

Qua kết quả đánh giá tính an toàn cho thấy, hai loại cao chiết thảo mộc TK và OI an toàn 100% ở nồng độ 1xMBC (12,5 mg/ml), đối với nồng độ 5xMBC (62,5 mg/ml) ở cao chiết TK có tỷ lệ sống $85 \pm 5\%$ và ở cao chiết OI có tỷ lệ sống $35 \pm 5\%$. Tại nghiệm thức OI 5xMBC, tỷ lệ cá chết cao từ ngày thứ 2 và giảm dần đến ngày thứ 6 và sau đó ngưng chết, điều này cho thấy cao chiết OI biểu hiện độc tính cao ở nồng độ 5xMBC. Do đó, cao chiết TK được xác định có tiềm năng ứng dụng phòng bệnh đốm trắng nội tạng trên cá lóc giống.

3.3. Xác định nồng độ gây chết 50% (LD_{50}) chủng vi khuẩn *A. schubertii* CL238 trên cá lóc giống

Sau thời gian theo dõi hai tuần, thí nghiệm được ghi nhận và đánh giá tỷ lệ chết tích lũy (%) tại hình 6.



Hình 6. Tỷ lệ chết tích lũy (%) của cá lóc giống sau cảm nhiễm với *A. schubertii* CL238 ở các nồng độ khác nhau bằng phương pháp tiêm ổ bụng.

Dựa trên kết quả tỷ lệ chết tích lũy được trình bày tại hình 6, nồng độ gây chết 50% (LD_{50}) của chủng vi khuẩn *A. schubertii* CL238 trên cá lóc giống được xác định là $1,7 \times 10^2$ CFU/ml. So sánh với các nghiên cứu trước cho thấy LD_{50} trong nghiên cứu này thấp hơn đáng kể. Cụ thể, Y.F. Chen và cs (2012) [9] xác định LD_{50} của chủng *A. schubertii* trên cá lóc *Channa maculata* dao động trong

khoảng $1,4 \times 10^4$ - $6,4 \times 10^6$ CFU/ml. Tương tự, T.T. Dung và cs (2019) [1] ghi nhận LD_{50} của hai chủng vi khuẩn *A. schubertii* SCL30 và STC56 trên cá lóc giống lần lượt là $6,59 \times 10^3$ CFU/ml và $8,12 \times 10^3$ CFU/ml. Ngoài ra, xác định LD_{50} của chủng *A. schubertii* HNL.6.1T là $3,32 \times 10^4$ CFU/ml [10]. Giá trị LD_{50} trong nghiên cứu hiện tại thấp hơn có thể được lý giải bởi hai yếu tố chính. Thứ nhất, cá lóc giống sử dụng trong thí nghiệm có kích cỡ nhỏ hơn (7 g/con) so với các nghiên cứu trước đó (9-20 g/con), khiến chúng dễ mắc cảm hơn với vi khuẩn. Thứ hai, độc lực của vi khuẩn *A. schubertii* có xu hướng gia tăng theo thời gian, có thể do sự xuất hiện ngày càng nhiều chủng kháng kháng sinh. Các chủng *A. schubertii* gần đây đã kháng 8/11 loại kháng sinh được khảo sát, với 100% chủng thể hiện khả năng kháng ít nhất hai loại kháng sinh trở lên, cho thấy nguy cơ lan truyền gen kháng sinh ngày càng gia tăng [14].

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chủng vi khuẩn gây bệnh đốm trắng nội tạng trên cá lóc (*Channa* sp.) đã được phân lập và định danh thông qua giải trình tự gen *16S rRNA* là *A. schubertii*.

Năm loại cao chiết thực vật gồm LB, TK, OI, LS và XTL được đánh giá khả năng kháng khuẩn thông qua phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch và xác định giá trị MIC/MBC. Trong đó, trà không được xác định lại loại cao chiết có tác dụng kháng khuẩn tốt, ổn định và an toàn cho vật chủ nhất. Nồng độ gây chết 50% (LD_{50}) của chủng *A. schubertii* CL238 trên cá lóc giống được xác định là $1,7 \times 10^2$ CFU/ml.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] T.T. Dung, N.B. Trung, L.M. Khoi (2019), "Isolation, identification and characterization of *Aeromonas schubertii* causing internal white spot on snakehead fish (*Channa striata*) in the Mekong Delta of Vietnam", *Can Tho University Journal of Science*, 55(2), pp.69-78, DOI: 10.22144/ctu.jvn.2019.049 (in Vietnamese).
- [2] L.X. Sinh, R. Pomeroy (2010), "Current situation and challenges for farming of snakehead fish (*Channa micropeltes* and *Channa striatus*) in the Mekong Delta, Vietnam", *Aquaculture Asia Magazine*, 15(4), pp.11-17.
- [3] P.M. Duc, T.N. Tuan, T.T.T. Hien (2012), "An investigation on pathogen infection to cultured snakehead (*Channa striata*) in An Giang and Dong Thap provinces", *Can Tho University Journal of Science*, 21(b), pp.124-132 (in Vietnamese).

- [4] L. Li, R. Yao, R.H. Olsen, et al. (2022), "Antibiotic resistance and polymyxin B resistance mechanism of *Aeromonas* spp. isolated from yellow catfish, hybrid snakeheads and associated water from intensive fish farms in Southern China", *LWT*, **166**, DOI: 10.1016/j.lwt.2022.113802.
- [5] M. Xue, Z. Xiao, Y. Li, et al. (2022), "Isolation, identification and characteristics of *Aeromonas caviae* from diseased largemouth bass (*Micropterus salmoides*)", *Fishes*, **7(3)**, DOI: 10.3390/fishes7030119.
- [6] H. Cao, A. Jian, S. He, et al. (2015), "*Aeromonas schubertii*: A potential pathogen for freshwater cultured whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei*", *Isr. J. Aquac.*, **67(1104)**, pp.1-6, DOI: 10.46989/001c.20732.
- [7] C. Liu, J. Ma, D. Zhang, et al. (2021), "Immune response and apoptosis-related pathways induced by *Aeromonas schubertii* infection of hybrid snakehead (*Channa maculata*♀×*Channa argus*♂)", *Pathogens*, **10(8)**, DOI: 10.3390/pathogens10080997.
- [8] F.W. Hickman-Brenner, G.R. Fanning, M.J. Arduino, et al. (1988), "*Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens", *J. Clin. Microbiol.*, **26(8)**, pp.1561-1564, DOI: 10.1128/jcm.26.8.1561-1564.1988.
- [9] Y.F. Chen, R.S. Liang, X.L. Zhuo, et al. (2012), "Isolation and characterization of *Aeromonas schubertii* from diseased snakehead, *Channa maculata* (Lacepède)", *J. Fish Dis.*, **35(6)**, pp.421-430, DOI: 10.1111/j.1365-2761.2012.01362.x.
- [10] D.T.H. Oanh, N.T. Nghia (2016), "Determination of causative agent of bacillary necrosis disease in snake-head fish (*Channa striata*) cultured in the Mekong Delta", *Journal of Agriculture and Rural Development*, **1**, pp.82-89 (in Vietnamese).
- [11] J.Y. Liu, A.H. Li (2012), "First case of *Aeromonas schubertii* infection in the freshwater cultured snakehead fish, *Ophiocephalus argus* (Cantor), in China", *J. Fish Dis.*, **35(5)**, pp.335-342, DOI: 10.1111/j.1365-2761.2012.01350.x.
- [12] D.T.M. Chau, L.H. Mai, T.T. Dung (2018), "Antimicrobial susceptibility of bacterial pathogen causing internal white spot disease in snakehead fish (*Channa striata*) in Tra Vinh", *Can Tho University Journal of Science*, **54(Aqua)**, pp.108-115, DOI: 10.22144/ctu.jsi.2018.043 (in Vietnamese).
- [13] P.T.H. Ha, D.H. Kim, Q.V.C Thi, et al. (2023), "Prevalence and antibiotic resistance of *Aeromonas schubertii* causing internal white spot disease on snakehead fish, *Channa striata*, in the Mekong Delta, Vietnam", *J. World Aquac. Soc.*, **54(5)**, pp.1260-1276, DOI: 10.1111/jwas.12954.
- [14] Q.V.C. Thi, N.B. Trung, T.T. Dung, et al. (2024), "The antibiotic susceptibility of *Aeromonas schubertii* isolated from snakehead in An Giang province of the Mekong Delta", *Veterinary Integrative Sciences*, **22(2)**, pp.609-629, DOI: 10.12982/VIS.2024.042.
- [15] H. Heuer, M. Krsek, P. Baker, et al. (1997), "Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients", *Appl. Environ. Microbiol.*, **63(8)**, pp.3233-3241, DOI: 10.1128/aem.63.8.3233-3241.1997.
- [16] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, et al. (2013), "MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0", *Mol. Biol. Evol.*, **30(12)**, pp.2725-2729, DOI: 10.1093/molbev/mst197.
- [17] H. Turker, A.B. Yildirim, F.P. Karakaş (2009), "Sensitivity of bacteria isolated from fish to some medicinal plants", *Turk. J. Fish Aquat. Sci.*, **9(2)**, pp.181-186, DOI: 10.4194/trjfas.2009.0209.
- [18] M. Balouiri, M. Sadiki, S.K. Ibnsouda (2016), "Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review", *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **6(2)**, pp.71-79, DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- [19] G. Balasubramanian, M. Sarathi, C. Venkatesan, et al. (2008), "Studies on the immunomodulatory effect of extract of *Cyanodon dactylon* in shrimp, *Penaeus monodon*, and its efficacy to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV)", *Fish Shellfish Immunol.*, **25(6)**, pp.820-828, DOI: 10.1016/j.fsi.2008.09.002.
- [20] L.J. Reed, H. Muench (1938), "A simple method of estimating fifty percent endpoints", *The American Journal of Hygiene*, **27(3)**, pp.493-497, DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.
- [21] K.S. Lee, M.G. Kim, K.Y. Lee (2006), "Antioxidative activity of ethanol extract from lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf", *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition*, **35(2)**, pp.182-186, DOI: 10.3746/jkfn.2006.35.2.182.
- [22] Clinical and Laboratory Standards Institute (2015), *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria* (3rd Ed.), CLSI guideline M45, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 120pp.
- [23] G. Prasad, G.L. Priyanka (2011), "Effect of fruit rind extract of garcinia gummi-gutta on haematology and plasma biochemistry of catfish *Pangasianodon hypophthalmus*", *Asian Journal of Biochemistry*, **6(3)**, pp.240-251, DOI: 10.3923/ajb.2011.240.251.
- [24] P. Rattanachaikunsopon, P. Phumkhachorn (2007), "Bacteriostatic effect of flavonoids isolated from leaves of *Psidium guajava* on fish pathogens", *Fitoterapia*, **78(6)**, pp.434-436, DOI: 10.1016/j.fitote.2007.03.015.
- [25] N.T.T. Linh, H.M. Huyen (2024), "Effectiveness of preventing infectious disease bacillary necrosis of *Pangasianodon hypophthalmus* of herbal extracts", *TNU Journal of Science and Technology*, **229(05)**, pp.451-458, DOI: 10.34238/tnu-jst.9563.
- [26] N. Canillac, A. Mourey (2001), "Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on listeria, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria", *Food Microbiol.*, **18(3)**, pp.261-268, DOI: 10.1006/fmic.2000.0397.