

Tác dụng diệt khuẩn của dịch chiết thân lá thồm lôm (*Polygonum chinense* L.) đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp ở tôm nuôi nước lợ

Trương Thị Mỹ Hạnh^{1*}, Phạm Thị Yến¹, Phạm Thị Huyền², Huỳnh Thị Mỹ Lệ³,
Phạm Thị Hồng Minh⁴, Đỗ Tiến Lâm⁴, Trần Thị Hoài Vân^{4,5}, Phan Thị Vân¹

¹Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản 1

²Cao học K24, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³Học viện Nông nghiệp Việt Nam

⁴Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

⁵Học viện KH&CN, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

Ngày nhận bài 14/3/2017; ngày chuyển phản biện 17/3/2017; ngày nhận phản biện 11/4/2017; ngày chấp nhận đăng 24/4/2017

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả diệt khuẩn của thân và lá cây thồm lôm (*Polygonum chinense* L.) đối với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease - AHPND) ở tôm. Thân lá cây thồm lôm được ngâm chiết bằng dung môi ethanol. Phương pháp được áp dụng bao gồm thử kháng sinh đồ khuếch tán trên đĩa thạch của Kirby-Bauer và thử nghiệm trên tôm bằng hình thức cho ăn và ngâm với nồng độ tương ứng 25-30 g/100 kg tôm và 25-30 g/m³. Kết quả cho thấy, dịch chiết thồm lôm có hiệu quả diệt vi khuẩn *V. parahaemolyticus* với đường kính vòng vô khuẩn đạt 19,8-20,6 mm tương ứng với nồng độ sử dụng 66,7-200 µg/khoanh. Bên cạnh đó, sử dụng dịch chiết thồm bổ sung vào nước nuôi tôm 30 g/m³ tại 2 thời điểm (ngay khi công cường độc vi khuẩn *V. parahaemolyticus* với mật độ 10⁵-10⁶ cfu/ml và lần 2 cách lần 1 là 24 h), tỷ lệ sống của tôm đạt 60% so với lô đối chứng 0%, trong khi đó phương pháp bổ sung thảo dược vào thức ăn (25-30 g/100 kg tôm) không có hiệu quả do tôm không bắt mồi. Kết quả đạt được là cơ sở khoa học để phát triển sản phẩm thuốc thảo dược có hiệu quả phòng trị bệnh AHPND theo hướng an toàn sinh học và thân thiện với môi trường.

Từ khóa: Bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND), cây thồm lôm, hoạt tính kháng khuẩn.

Chỉ số phân loại: 4.5

Đặt vấn đề

AHPND xuất hiện lần đầu tiên tại Trung Quốc năm 2009, tiếp đến được ghi nhận tại Thái Lan năm 2010, Việt Nam năm 2011, Malaysia năm 2012 [1], Mexico năm 2013 [2] và gần đây nhất tại Philippine năm 2015 [3]. AHPND gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến ngành nuôi tôm công nghiệp, bệnh làm giảm 20% sản lượng tôm trên toàn thế giới [4]. Tác nhân gây bệnh AHPND ở tôm nuôi được xác định do vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* và *V. campbellii* [5-7]. Ba chủng vi khuẩn này đều chứa gen *pirAB_{vp}* - một loại gen Toxin gây AHPND ở tôm, điều đó cũng chỉ ra, gen sinh độc tố gây AHPND có thể lan truyền theo chiều ngang giữa các loài vi khuẩn (từ *V. parahaemolyticus* sang *V. harveyi*, *V. campbellii*) trong các ao nuôi tôm.

Nghiên cứu của Trương Thị Mỹ Hạnh và cs [8] tại vùng nuôi tôm tập trung ở Quỳnh Lưu, Nghệ An cho thấy, 9

chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND có kết quả 100% kháng với thuốc Ampicilline, 90,9% kháng với Neomycin, 66,7% kháng với Erythromycin và 55,6% kháng với Tetracycline. Đặc biệt, hiện tượng đa kháng được tìm thấy với 33,3% tổng số chủng kháng với 4 loại thuốc, kháng với 6 loại thuốc (22,2%) và kháng với 5 loại thuốc (11,1%) [8]. Tại Mexico, chủng *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND có tỷ lệ kháng kháng sinh Tetracyclin cao, nghiên cứu cũng chỉ ra *V. parahaemolyticus* mang gen mã hóa kháng tetB Tetracyclin [9]. Hiện tượng vi khuẩn kháng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản (NTTS) đã và đang diễn ra trong thực tế và cũng là vấn đề nghiêm trọng đối với hoạt động NTTS [10], là mối nguy hiểm tác động đến môi trường, tăng khả năng chuyển gen kháng kháng sinh từ động vật thủy sản sang động vật trên cạn, trong đó có con người [11]. Chính vì vậy, đến nay nhiều loại kháng sinh và một số thuốc tổng hợp đã bị cấm sử dụng trong NTTS và thay vào đó những giải pháp phòng

*Tác giả liên hệ: Email: tmhanh@ria1.org

Antibacterial effect of *Polygonum chinense* L. extract on pathogen bacteria of acute hepatopancreatic necrosis disease in brackish shrimps

Thi My Hanh Truong^{1*}, Thi Yen Pham¹,
Thi Huyen Pham², Thi My Le Huynh³,
Thi Hong Minh Pham⁴, Tien Lam Do⁴,
Thi Hoai Van Tran^{4,5}, Thi Van Phan¹

¹Research Institute for Aquaculture No1

²K24 Master of Faculty of Veterinary Medicine - Vietnam National University of Agriculture

³Vietnam National University of Agriculture

⁴Institute of Natural Products Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology

⁵Graduate University of Science and Technology (GUST), Vietnam Academy of Science and Technology

Received 14 March 2017; accepted 24 April 2017

Abstract:

The study was conducted to evaluate the bactericidal effect of *Polygonum chinense* L. on the bacterial strain (*Vibrio parahaemolyticus*) causing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps. The trunks and leaves of *P. chinense* L. trees were extracted by soaking in ethanol. Methods applied included: Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility testing and tests on shrimps by feeding with the diet of 25-30 g/100 kg of shrimps and soaking with the concentration of 25-30 g/m³. The results showed that crude extracts of *P. chinense* L. had anti-bacterial effects on *V. parahaemolyticus* with the inhibition zone diameter of 19.8-20.6 mm at the concentration of 66.7-200 µg/disc. In addition, using crude extracts added to water at the ratio of 30 g/m³ at 2 times (when the pathogenesis at the *V. parahaemolyticus* bacteria density of 10⁵-10⁶ cfu/ml and after 24 h), the survival rate was 60% compared with the control group 0%, while the method of herbal supplements to foods (25-30 g/100 kg of shrimps) was not effective because shrimps could not catch bait. The result achieved is a scientific basis for the development of herbal medicinal products to be effective in the prevention and treatment of AHPND towards biosafety and environmental friendliness.

Keywords: Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), Antibacterial activity, *Polygonum chinense* L..

Classification number: 4.5

và trị bệnh thân thiện với môi trường ngày càng được quan tâm. Các chất có nguồn gốc tự nhiên là nguồn nguyên liệu đã và đang được tập trung nghiên cứu trong những năm gần đây để sản xuất thuốc thảo dược như một giải pháp an toàn sinh học thay thế các thuốc hóa học tổng hợp [12].

Cây thồm lồm được xác định có thành phần chủ yếu là hợp chất triterpenesqualene (47,01%), và 1,2-benzenedicarboxylic acid, mono [2-ethylhexyl] ester (40,30%), tất cả các hợp chất được báo cáo có hoạt tính kháng khuẩn, diệt côn trùng, chống oxy hóa, chống viêm [13]. Trong dân gian, thồm lồm được sử dụng chữa các bệnh lở loét, viêm da, nhiễm khuẩn... [14]. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND của dịch chiết thô thân lá cây thồm lồm.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Mẫu thân và lá cây thồm lồm được thu tại Thái Nguyên vào tháng 11/2015 và được Bảo tàng thiên nhiên, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam định tên khoa học là *Polygonum chinense* L. (họ Polygonaceae).

Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND được lưu giữ tại Trung tâm Quan trắc môi trường và bệnh thủy sản miền Bắc (CEDMA), Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản I.

Đĩa giấy thấm được vô trùng và khoan giấy kháng sinh doxycyclin (30 µg) do Công ty TNHH Nam Khoa sản xuất.

Môi trường tối ưu của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* là Thiosulfate Citrate Bile Salts (TCBS), đun sôi để nguội đến 40-50°C đổ đĩa peptri sử dụng nuôi cấy vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Môi trường nuôi cấy cơ bản Nutrient Broth (NB) có bổ sung 2% NaCl, được hấp tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút, để nguội dùng nuôi tăng sinh vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Môi trường Mueller Hinton Agar (MA) bổ sung 2% NaCl, được hấp tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút, để nguội đến 40-50°C, đổ vào đĩa peptri (đường kính 10 cm) với độ dày của MA từ 3 đến 5 mm, được sử dụng để kiểm tra tính diệt khuẩn của dịch chiết thân lá thồm lồm.

Tôm thẻ chân trắng sử dụng trong thí nghiệm có trọng lượng 3-5 g/con, có kích thước đồng đều, phản xạ nhanh, ruột đầy thức ăn, có kết quả âm tính với vi rút gây bệnh đốm trắng, đầu vàng, taura và âm tính với vi khuẩn gây bệnh AHPND.

Bể composit cỡ nhỏ (300 lít), muối biển nhân tạo.

Phương pháp nghiên cứu

Thu dịch chiết thô thân lá thỏm lồi: Mẫu cây được để nơi thoáng mát, sau đó sấy khô ở nhiệt độ 40-50°C đến khối lượng không đổi. Nghiền nhỏ mẫu và ngâm chiết 5 lần với dung môi ethanol ở nhiệt độ thường. Các dịch chiết thu được đem dồn lại và cất kiệt dung môi dưới áp suất giảm, nhiệt độ < 50°C để thu được cặn chiết thô ethanol.

Pha dịch chiết thô thân lá thỏm lồi: Dịch chiết thô thân lá thỏm lồi được pha trong dung dịch DMSO (Dimethyl Sulfoxide) đạt nồng độ dung dịch 22,2; 40; 66,7 và 200 µg/µl.

Chuẩn bị nguồn vật liệu vi khuẩn gây bệnh AHPND: Chủng vi khuẩn thuần *V. parahaemolyticus* lấy từ tủ lưu mẫu -80°C tại CEDMA, được cấy ria trên đĩa thạch TCBS ủ trong tủ ấm 29°C/24 h, để chọn khuẩn lạc đơn điển hình. Khuẩn lạc đơn được nuôi cấy lắc trong bình tam giác với môi trường NB có bổ sung 2% NaCl đặt vào tủ ấm lắc ở 29°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 15 h thu dịch vi khuẩn.

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

Thí nghiệm đánh giá tác dụng diệt khuẩn của chiết xuất thảo dược: Tác dụng diệt khuẩn của các dịch chiết được kiểm tra bằng phương pháp kháng sinh đồ khuếch tán trên đĩa thạch của Kirby-Bauer. Các thao tác được thực hiện trong tủ cấy vi sinh Class II. Khi mật độ vi khuẩn đạt 10^8 cfu/ml, dùng micropipet hút 100 µl canh khuẩn nhỏ vào giữa đĩa thạch MH (Meuler - Hilton), dùng que thủy tinh trang đều, sau 10-15 phút, trên mặt đĩa thạch được đặt các đĩa giấy vô trùng có thấm 20 µl dịch chiết thảo dược cùng với đĩa giấy tẩm kháng sinh Doxycyclin (đối chứng là đĩa giấy vô trùng thấm 20 µl DMSO). Đĩa thạch được đặt trong tủ ấm 29°C/24 h, đọc kết quả bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn, rồi tính số bình quân. Trong thí nghiệm, đĩa kháng sinh Doxycyclin (30 µg) được sử dụng như đối chứng (Đ/C) dương và đĩa giấy vô trùng thấm DMSO được sử dụng như Đ/C âm.

Thí nghiệm đánh giá hiệu quả dịch chiết thô thân lá thỏm lồi đối với tôm gây nhiễm vi khuẩn gây bệnh AHPND được mô tả chi tiết trong bảng 1.

Bảng 1. Thí nghiệm đánh giá hiệu quả dịch chiết thô thân lá cây thỏm lồi.

Công thức 1			Công thức 2			Đ/C âm	
Thí nghiệm 1	Thí nghiệm 2	Đ/C dương	Thí nghiệm 3	Thí nghiệm 4	Đ/C dương		
Chất bổ sung	Dịch chiết thô thỏm lồi		Dịch chiết thô thỏm lồi			Không có bất kỳ tác động nào của dịch chiết thô thảo dược và vi khuẩn. Tôm nuôi bình thường	
Liều sử dụng	25 g/100 kg tôm	30 g/100 kg tôm	Thức ăn thường. Không có chất bổ sung	25 g/m ³	30 g/m ³		Thức ăn thường. Không có chất bổ sung
Cách dùng	Cho tôm ăn thức ăn bổ sung thảo dược trong 7 ngày liên tục		Bổ sung dịch chiết thô thảo dược vào 2 lần, lần 1 - cùng lúc với công cường độc <i>V. parahaemolyticus</i> và lần 2 - cách lần 1 là 24 h				
Thời gian công cường độc <i>V. parahaemolyticus</i>	Ngày thứ 8		Ngày thứ 1				
Mật độ <i>V. parahaemolyticus</i> công cường độc (cfu/ml)	10 ⁵ -10 ⁶		10 ⁵ -10 ⁶				
Các bể thí nghiệm được bố trí lặp lại 2 lần và được theo dõi ghi chép số tôm chết tích lũy theo thời gian và tái phân tích tác nhân vi khuẩn gây bệnh AHPND bằng kỹ thuật PCR							

Phân tích tác nhân gây bệnh AHPND ở tôm thẻ chân trắng bằng kỹ thuật PCR: Phân tích sử dụng cặp mồi AP3 (F: ATGAGTAACAATAAAACATGAAAC; R: GTGGTAATATTGTACAGAA) được công bố bởi Sirikharin và cs (2014). Cặp mồi AP3 đã khuếch đại đoạn gen 336 bp của gen Toxin gây hoại tử gan tụy cấp ở tôm, chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR được áp dụng như sau: 95°C (5 phút), [35 chu kỳ (94°C trong 1 phút, 53°C trong 30 giây và 72°C trong 40 giây)], 72°C (5 phút) và 4°C (∞). Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1% trong dung dịch 1X TAE và đọc kết quả dưới đèn UV.

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2010 và phần mềm trực tuyến Graphpad (<http://graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>).

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Tác dụng diệt khuẩn của dịch chiết thân lá thỏm lồi đối với vi khuẩn gây bệnh AHPND

Hiệu quả diệt khuẩn của dịch chiết thô thân lá thỏm lồi đối với *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND ở tôm được thể hiện ở bảng 2. Kết quả cho thấy, cặn chiết thô thu được từ thân lá cây thỏm lồi (sau khi xử lý ngâm chiết bằng dung môi ethanol) có hiệu quả diệt vi khuẩn gây bệnh AHPND ở tôm nuôi với đường kính vòng vô khuẩn dao động trong khoảng 19,8-20,6 cm khi sử dụng dịch chiết thô với lượng 66,7-200 µg, kết quả này tương đương với thuốc kháng sinh Doxycyclin (30 µg). Tính diệt

khuẩn của sản phẩm dịch chiết thô thỏm lồm giảm dần khi sử dụng nồng độ 40 μg và 22,2 $\mu\text{g/khoanh}$, tương ứng có đường kính vòng vô khuẩn đạt lần lượt 15,3 và 0 mm.

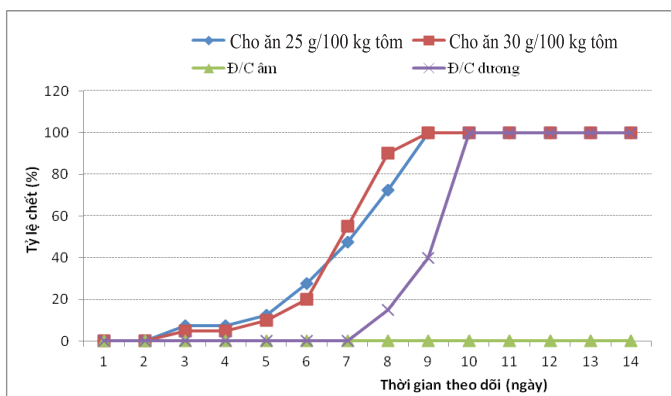
Bảng 2. Tác dụng diệt *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND của dịch chiết thân lá thỏm lồm.

Đường kính vòng vô khuẩn (mm)						
Nồng độ dịch chiết thô thân lá thỏm lồm ($\mu\text{g}/20 \mu\text{l/khoanh}$)				Giấy tẩm kháng sinh (Doxycyclin 30 $\mu\text{g/khoanh}$)		DMSO (Đ/C âm)
22,2	40	66,7	200			
0 ^a	15,3 $\pm$ 0,16 ^b	19,8 $\pm$ 0,45 ^c	20,6 $\pm$ 0,41 ^c	21,8 $\pm$ 1,8 ^c		0 ^a

Ghi chú: a, b, c trên cùng một hàng chỉ sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê $p < 0,05$.

Tác dụng thử nghiệm ở tôm trong quy mô phòng thí nghiệm

Ở lô 1, thí nghiệm bố trí đưa thảo dược vào cơ thể tôm bằng hình thức cho ăn. Kết quả thí nghiệm chỉ rõ, tôm có dấu hiệu chết bắt đầu ở ngày thứ 3 ở thí nghiệm 1 và 2 tương ứng bổ sung 25 g và 30 g/100 kg tôm. Tỷ lệ chết tăng dần từ 7,5 đến 47,5% (25 g/100 kg tôm) và 5 đến 55% (30 g/100 kg tôm) theo thời gian từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 7 của quá trình cho tôm ăn thức ăn có trộn dịch chiết thô thân lá thỏm lồm (hình 1). Sau 1 ngày công cường độ *V. parahaemolyticus*, tôm được cho ăn thức ăn chứa thảo dược chết với tỷ lệ lên đến 100%, trong khi đó lô Đ/C dương có tỷ lệ chết 100% ở ngày thứ 3 sau khi gây nhiễm và lô Đ/C âm tỷ lệ chết 0% đến ngày nuôi thứ 14 (hình 1). Bên cạnh đó, mẫu tôm thí nghiệm được phân tích AHPND bằng PCR với cặp mồi AP3 cho thấy, sau 1 ngày gây nhiễm bể cho ăn thảo dược và Đ/C dương, kết quả có 100% kết quả dương tính (bảng 3).



Hình 1. Tỷ lệ chết cộng dồn (%) của tôm khi cho ăn dịch chiết thô thân lá thỏm lồm.

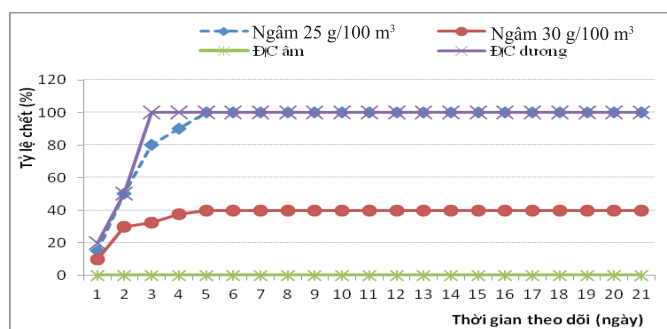
Đối với lô thí nghiệm sử dụng dịch chiết thô thảo dược bổ sung vào nước nuôi cùng thời điểm với công cường

Bảng 3. Tỷ lệ (%) mẫu dương tính với tác nhân gây bệnh AHPND trong quá trình thí nghiệm.

TT	Ngày thí nghiệm	Tỷ lệ (%) mẫu dương tính với tác nhân gây bệnh AHPND					
		Cho ăn			Ngâm		Đ/C âm
		25 g/100 kg tôm	30 g/100 kg tôm	Đ/C dương	25 g/m ³	30 g/m ³	Đ/C dương
1	2 ^(*)	#	#	#	66,7	33,3	100
2	3	#	#	#	66,7	0	100
3	9	100	100	100	#	#	0
4	21	Kết thúc thí nghiệm ngày thứ 14			#	0	#

Ghi chú: #: Không thu mẫu phân tích. Số mẫu mỗi lần phân tích $n = 3$; *: Thu mẫu trước khi bổ sung thảo dược lần 2.

độc vi khuẩn gây bệnh AHPND và bổ sung thảo dược lặp lại lần 2 sau 24 h, kết quả cho thấy tỷ lệ tôm chết 100% ở ngày thứ 3 và ngày thứ 5 lần lượt ở bể Đ/C dương và bể sử dụng thảo dược hàm lượng 25 g/m³, trong khi đó ở hàm lượng 30 g/m³ tỷ lệ chết cộng dồn là 40% sau 21 ngày ở thí nghiệm (hình 2). Kết quả phân tích AHPND trong quá trình thí nghiệm cho thấy, sau khi gây nhiễm và bổ sung thảo dược vào nước nuôi 1 ngày tỷ lệ mẫu nhiễm vi khuẩn gây bệnh AHPND lần lượt là 33,3; 66,7 và 100% tương ứng ở lô 25, 30 g/m³ và Đ/C dương (bảng 3). Đến ngày thứ 3, tỷ lệ (%) mẫu nhiễm vi khuẩn gây bệnh AHPND đã giảm xuống 0% ở lô sử dụng thảo dược thô 30 g/m³, trong khi đó 2 lô còn lại tỷ lệ % vẫn giữ nguyên ở ngày thứ 3 của thí nghiệm.



Hình 2. Tỷ lệ chết cộng dồn (%) của tôm thẻ chân trắng khi sử dụng dịch chiết thô bổ sung vào nước có tác nhân gây bệnh *V. parahaemolyticus*.

Thảo luận

Thỏm lồm là cây thuốc dân gian được sử dụng phổ biến, đặc biệt ở Trung Quốc và Ấn Độ, tác dụng chính được nghiên cứu và ứng dụng là chống tiêu chảy, viêm loét dạ dày và bảo vệ chống tổn thương ở gan [13, 15, 16]. Trong NTTS nói riêng, thỏm lồm đã được xác định có hiệu quả kháng khuẩn và nấm, đặc biệt loại thảo dược này có

phổ diệt khuẩn rộng đối với cả vi khuẩn gram dương và gram âm (*V. parahaemolyticus*) khi đạt đường kính vòng vô khuẩn tương ứng 18,0 (*Staphylococcus aureus*) và 22,3 mm (*Bacillus subtilis*), với hàm lượng 100 µg/khoanh giấy [17]. Kết quả nghiên cứu này minh chứng thêm việc thỏm lỏm có tính mẫn cảm cao với vi khuẩn gram âm khi đạt đường kính vòng vô khuẩn 19,8-20,6 mm (nồng độ 66,7-200 µg/khoanh) (bảng 2), đồng thời kết quả này không có sự khác biệt ý nghĩa ($p > 0,05$) đối với Doxycycline (30 µg). Hiện nay, Doxycycline là một trong số ít loại thuốc kháng sinh được phép sử dụng trong NTTS ở Việt Nam. Khi nghiên cứu dịch chiết thô thảo dược đối với riêng chủng vi khuẩn gây bệnh AHPND, một số kết quả được chỉ ra: Đối với hạt sim và lá sim (30 µg/µl) đường kính vòng vô khuẩn đạt 13,33 và 18,0 mm, trong khi đó lá ổi và lá trầu không (75 µg/µl) có đường kính vòng vô khuẩn đạt lần lượt 18,3 và 16,3 mm [18, 19], như vậy rõ ràng dịch chiết thô thỏm lỏm (với liều 10 µg/µl có đường kính vòng vô khuẩn 20,6 mm) có tính diệt khuẩn cao hơn so với 4 loại thảo dược (hạt sim, lá sim, lá ổi và lá trầu không) đã được nghiên cứu trước đây.

Sau khi có kết quả lập kháng sinh đồ đối với dịch chiết thô thỏm lỏm, thí nghiệm trên tôm nuôi được triển khai bằng hình thức cho ăn và ngâm trong quy mô phòng thí nghiệm. Đối với hình thức cho ăn, hiện tượng tôm chết bắt đầu ở ngày thứ 3, tỷ lệ tôm chết tăng dần theo thời gian từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 7, tỷ lệ chết không có sự khai khác ý nghĩa ($p > 0,05$) giữa nồng độ 25 và 30 g/100 kg tôm. Một số biểu hiện của tôm trong bể cho ăn thảo dược được ghi nhận như sau: Số tôm chết trong ruột không có thức ăn, một số tôm lột xác đã bị các cá thể tôm cùng đàn ăn thịt. Sau mỗi ngày trước khi ăn, đáy bể được xi phông thu được nhiều thức ăn thừa. Trong khi đó ở lô Đ/C dương và âm, ruột tôm đầy thức ăn, tôm phản xạ nhanh, đồng thời xi phông đáy bể không có thức ăn, chỉ có phân tôm. Sau khi công cường độc, tôm được cho ăn thức ăn chứa thảo dược chết (100%) sau 1 ngày, trong khi đó lô Đ/C dương chết (100%) ở ngày thứ 3. Qua đây nhận thấy, tôm không ăn mồi do dịch chiết thô thỏm lỏm có trong thức ăn, tôm chết do đói/ăn thịt lẫn nhau ở thời gian trước khi công cường độc, ngay sau khi công cường độc tôm chết nhanh hơn do chịu thêm ảnh hưởng của độc tố *V. parahaemolyticus*.

Ở lô thí nghiệm dịch chiết thô bổ sung vào nước tại 2 thời điểm (ngay khi công cường độc vi khuẩn và sau 24 h) với nồng độ sử dụng 25-30 g/m³ là hoàn toàn an toàn cho tôm nuôi [15]. Trong quá trình thí nghiệm, tôm được tái

phân tích vi khuẩn gây bệnh AHPND bằng kỹ thuật PCR sau 1 ngày gây nhiễm, kết quả cho thấy tỷ lệ mẫu dương tính với vi khuẩn gây bệnh AHPND đạt 33,3-100% (bảng 3). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Lai và cs [20] khi nhóm tác giả cho rằng, với hình thức gây nhiễm là ngâm tôm trong nước với mật độ *V. parahaemolyticus* 10⁶ cfu/ml, sau 6 giờ gây nhiễm tôm có kết quả dương tính với bệnh AHPND bằng kỹ thuật PCR. Đặc biệt, bằng kỹ thuật mô bệnh học đã xác định rõ biến đổi đặc trưng cơ bản của bệnh AHPND như các tế bào gan có nhân lớn bất thường và sự bong tróc tế bào [20]. Sở dĩ ở nghiệm thức bổ sung thảo dược 25-30 g/m³, tỷ lệ mẫu dương tính AHPND lần lượt tương ứng 66,7 và 33,3% thấp hơn so với lô Đ/C dương (100%), nguyên nhân do dịch chiết thô thảo dược đã diệt, ức chế vi khuẩn phát triển, mật độ vi khuẩn trong nước không đạt mức 10⁵-10⁶ cfu/ml. Vậy, với nồng độ dịch chiết thô thỏm lỏm 30 g/m³ bổ sung vào nước 2 lần đã có ý nghĩa quan trọng nâng cao tỷ lệ sống của tôm ở điều kiện tôm sống trong môi trường chứa tác nhân gây bệnh AHPND với mật độ 10⁵-10⁶ cfu/ml, tỷ lệ sống cộng dồn đến 21 ngày thí nghiệm là 60%, trong khi đó lô Đ/C dương tỷ lệ sống 0% ở ngày thứ 3 (hình 2), hơn nữa, ở ngày cuối thí nghiệm tôm có kết quả âm tính với vi khuẩn gây bệnh AHPND.

Kết luận

Dịch chiết thô ethanol thu được từ thân lá cây thỏm lỏm có hiệu quả diệt vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND với đường kính vòng vô khuẩn đạt 19,8-20,6 mm khi sử dụng nồng độ 66,7-200 µg/khoanh/20 µl.

Trong quy mô phòng thí nghiệm, sử dụng liều ngâm 30 g/m³, bổ sung vào 2 thời điểm (lần 1, bắt đầu công cường độc vi khuẩn với mật độ 10⁵-10⁶ cfu/ml và lần 2 cách lần 1 là 24 h) có hiệu quả nâng cao tỷ lệ sống 60% so với lô Đ/C dương 0%. Trong khi đó, phương pháp trộn dịch chiết thô vào thức ăn không có hiệu quả do tôm nuôi không ăn mồi.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi đề tài “Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng chế phẩm từ các hoạt chất thuộc lớp chất triterpenoit, diterpenoit và polyphenol có nguồn gốc tự nhiên thay thế kháng sinh trong phòng trị bệnh AHPND trên tôm nuôi ở Việt Nam”. Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đã tạo điều kiện thuận lợi cho việc thực hiện đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] FAO (2013), *Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome of cultured shrimp*, FAO Fisheries and Aquaculture Report, **No.1053**, Ha Noi, Vietnam.
- [2] L. Nunan, D. Lightner, C. Pantoja, S. Gomez-Jimenez (2014), "Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico", *Dis. Aquat. Organ*, **111**, pp.81-86.
- [3] L.D. De La Peña, N.A.R. Cabillon, D.D. Catedral, E.C. Amar, R.C. Usero, W.D. Monotilla, A.T. Calpe, D.D.G. Fernandez, C.P. Saloma (2015), "Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *p. monodon* cultured in the Philippines", *Dis. Aquat. Organ*, **116**, pp.251-254.
- [4] X. Hong, L. Lu, D. Xu (2016), "Progress in research on acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)", *Aquac. Int.*, **24**(2), pp.577-593.
- [5] L. Tran, L. Nunan, R.M. Redman, L.L. Mohny, C.R. Pantoja, K. Fitzsimmons, D.V. Lightner (2013), "Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp", *Dis. Aquat. Organ*, **105**, pp.45-55.
- [6] H. Kondo, P.T. Van, L.T. Dang, I. Hirono (2015), "Draft Genome Sequence of Non-Vibrio parahaemolyticus Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Strain KC13.17.5, Isolated from Diseased Shrimp in Vietnam", *Genome Announc*, **3**, pp.577-593.
- [7] J.E. Han (2017), *Four AHPND strains identified on Latin American shrimp farms*, <http://advocate.gaalliance.org/four-ahpnd-strains-identified-on-latin-american-shrimp-farms/>.
- [8] Trương Thị Mỹ Hạnh, Phạm Thị Yến, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Phan Thị Vân (2016), "Hiện trạng sử dụng thuốc và tính kháng kháng sinh của *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp ở tôm tại Quỳnh Lưu, Nghệ An", *Tạp chí Khoa học công nghệ*, **4**, tr.57-65.
- [9] J.E. Han, L.L. Mohny, K.F.J. Tang, C.R. Pantoja, D.V. Lightner (2015), "Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps", *Aquac.*, **2**, pp.17-21.
- [10] B. Vaseeharan, P. Ramasamy, T. Murugan, J.C. Chen (2005), "In vitro susceptibility of antibiotics against *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from *Penaeus monodon* hatcheries and ponds", *Int. J. Antimicrob. Agents*, **26**, pp.285-291.
- [11] T.P. Van Boeckel, S. Gandra, A. Ashok, Q. Caudron, B.T. Grenfell, S. Levin, R. Laxminarayan (2014), "Global antibiotic consumption 2000 to 2010: An analysis of national pharmaceutical sales data", *Lancet Infect. Dis.*, **14**(8), pp.742-750.
- [12] R. Solanki (2010), "Some medicinal plants with antibacterial activity", *Pharm Globate*, **4**(10), pp.123-129.
- [13] R. Neelamegam, B. Ezhilan (2012), "GC-MS analysis of phytochemicals in the ethanol extract of *Polygonum chinense* L.", *Pharmacognosy Res.*, **4**(1), p.11.
- [14] Thúy Hoàng (2015), "Thỏm lôm trị bệnh ngoài da", *Báo Sức khỏe đời sống*, <http://suckhoedoisong.vn/thom-lom-gai-tri-benh-ngoai-da-n106971.html>.
- [15] Manoj Kumar Das (2015), "Hepatoprotective and Cytotoxic Potential of Ethanolic Leaf Extract of *Polygonum chinense* L.", *Int. J. Med. Pharm. Sci.*, **5**, pp.41-48.
- [16] H.T. Xiao, S.W. Tsang, H.Y. Qin, F.F.K. Choi, Z.J. Yang, Q. Han, H.B. Bin, H.X. Chen Xu, H. Shen, A.P. Lu, Z.X. Bian (2013), "A bioactivity-guided study on the anti-diarrheal activity of *Polygonum chinense* L.", *J. Ethnopharmacol*, **149**, pp.499-505.
- [17] M. Maharajan, A. Rajendran, A. Binu Thomas, V. Aravindhan (2012), "Antibacterial and antifungal activities of *Polygonum chinense* L.", *Asian J. Plant Sci.*, **2**(5), pp.577-580.
- [18] Đặng Thị Lua, Lại Thị Ngọc Hà, Nguyễn Thanh Hải (2015), "Tác dụng diệt khuẩn của dịch chiết lá sim và hạt sim (*Rhodomyrtus tomentosa*) đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm nuôi nước lợ", *Tạp chí Khoa học và phát triển*, **13**, tr.1101-1108.
- [19] Đặng Thị Lua, Nguyễn Thị Hạnh, Hoàng Hải Hà, Trương Thị Mỹ Hạnh, Phan Thị Vân (2015), "Tác dụng diệt khuẩn in vitro của dịch chiết lá trầu không (*Piper betle* L.) và dịch chiết lá ổi (*Psidium guajava*) đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm nuôi nước lợ", *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, **11**, tr.92-97.
- [20] H.C. Lai, T.H. Ng, M. Ando, C.T. Lee, I.T. Chen, J.C. Chuang, R. Mavichak, S.H. Chang, M.D. Yeh, Y.A. Chiang, H. Takeyama, H.O. Hamaguchi, C.F. Lo, T. Aoki, H.C. Wang (2015), "Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp", *Fish Shellfish Immunol*, **47**, pp.1006-1014.