



XÁC ĐỊNH TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA DỊCH CHIẾT BẠCH HOA XÀ (*Plumbago zeylanica L.*) ĐỐI VỚI VI KHUẨN *Aeromonas hydrophila*

Nguyễn Lê Hoàng Yến¹

¹Trường Đại học Tây Đô

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 11/01/2019

Ngày nhận kết quả bình duyệt:
13/05/2019

Ngày chấp nhận đăng:
04/2020

Title:

Determine the antibacterial ability of *Plumbago zeylanica L.* extract against *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella ictaluri*

Keywords:

Aeromonas hydrophila,
antibacteria, *Edwardsiella ictaluri*, *Plumbago extract*

Từ khóa:

Aeromonas hydrophila, dịch chiết Bạch hoa xà, *Edwardsiella ictaluri*, kháng khuẩn

ABSTRACT

This experiment was conducted to determine the antibacterial ability of *Plumbago zeylanica* extract against *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella ictaluri* at density of 10^3 , 10^6 , 10^9 CFU/ml. *Plumbago zeylanica* was extracted by the methods: (i) boiled in distilled water at 98 °C; (ii) soaked in ethanol 70 % for 3 days; (iii) soaked in ethanol 70 % for 6 days. The results shows that, *Plumbago zeylanica* extracts of three methods of extracting were high resistance (the width of the antibacterial ring from 10 to 22,7 mm). However, the antibacterial ability of *Plumbago* extract by heating method in distilled water is the lowest, the ability of *Plumbago* extract by soaking in 70 % for 6 days with ratio 3:1 exposed the best results in against *E. ictaluri* at the density of 10^9 CFU/ml ($X = 22,7$ mm). This result also shows that there are positive relationship between the antibacterial ability of *Plumbago* extract and the bacterial density.

TÓM TẮT

Thí nghiệm được tiến hành nhằm xác định tính kháng khuẩn của dịch chiết bạch hoa xà (BHX) với hai loài vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* và *Edwardsiella ictaluri* ở các mật độ 10^3 , 10^6 , 10^9 (CFU/mL). Bạch hoa xà được chiết xuất bằng các phương pháp (i) đun trong nước cất ở 98 °C, (ii) ngâm trong cồn 70% trong 3 ngày và (iii) ngâm trong cồn 70% trong 6 ngày. Kết quả cho thấy, dịch chiết BHX từ ba phương pháp chiết xuất đều có tính kháng mạnh (vòng kháng khuẩn từ 10 – 22 mm) đối với *A. hydrophila* và *E. ictaluri*, tuy nhiên tính kháng của dịch chiết BHX được chiết xuất bằng phương pháp gia nhiệt ở 98 °C, 3 giờ trong nước cất là thấp nhất. Tính kháng khuẩn của dịch chiết BHX được chiết xuất bằng phương pháp ngâm 6 ngày trong cồn 70% với tỉ lệ BHX: dung môi (cồn) là 3:1 cho kết quả vòng kháng khuẩn *E. ictaluri* cao nhất ($X = 22,7$ mm) ở mật độ vi khuẩn 10^9 CFU/ml và kết quả này cho thấy tính kháng khuẩn của dịch chiết BHX và mật độ vi khuẩn có sự tương quan theo hướng tích cực.

1. GIỚI THIỆU

Trong nuôi trồng thủy sản, dịch bệnh trong nghề nuôi cá xảy ra quanh năm nhưng cao và nặng nhất

là trong giai đoạn giao mùa, điều kiện thời tiết, nhiệt độ thay đổi đột ngột vào mùa mưa, mùa nước đổ. Bệnh gan thận mủ do vi khuẩn

Edwardsiella ictaluri gây ra đang rất phổ biến, ảnh hưởng lớn đến giai đoạn cá hương, cá giống, và cả cá nuôi thương phẩm với tỷ lệ chết cao, có thể đến 90%, gây thiệt hại lớn cho người nuôi (Tư Thanh Dung và ctv, 2004). Bên cạnh đó, bệnh nhiễm trùng máu (bệnh đốm đỏ, xuất huyết...) do nhóm vi khuẩn *Aeromonas* sp. cũng gây thiệt hại nghiêm trọng không kém, thường gặp ở các động vật thủy sản nước ngọt như: trắm cỏ, basa, chép, tai tượng,... Mặt khác, chúng còn có thể gây bệnh ở ba ba, cá sấu, bệnh đỏ chân ở ếch, đốm nâu ở tôm càng xanh; tỉ lệ tử vong thường từ 30 - 70% (Bùi Quang Tề *et al.*, (2004); Dung *et al.*, (2008)). Kháng sinh đã được sử dụng để phòng và trị bệnh nhưng đưa đến hiện tượng kháng thuốc. Nghiêm trọng hơn là dư lượng kháng sinh có thể gây bệnh cho người và là rào cản cho các doanh nghiệp trong lĩnh vực xuất khẩu sản phẩm thủy sản. Trước tình hình đó, khuynh hướng chung của ngành thủy sản Việt Nam và thế giới là khuyến khích dùng các chế phẩm sinh học, vi sinh và thuốc phòng trị bệnh bằng thảo dược thay thế dần kháng sinh trong quá trình nuôi trồng. Chế phẩm sinh học đã được ứng dụng trong ương nuôi một số đối tượng thủy sản và đạt được những thành công, triển vọng trong việc cải thiện môi trường nước, hạn chế vi khuẩn gây bệnh, giúp nâng cao tỉ lệ sống của đối tượng nuôi. Bên cạnh đó, với biên độ an toàn lớn, ít ảnh hưởng tới môi trường sinh thái cũng như môi trường nuôi; đồng thời không ảnh hưởng tới sức khỏe của con người. Xu hướng sử dụng thảo dược trong việc xử lý bệnh trên động vật thủy sản đang được người nuôi ứng dụng rộng rãi do một số hoạt chất của nhiều loại thảo dược được hoạt động như chất kháng sinh, chất chống oxy hóa đã được sử dụng rộng rãi trong cuộc sống nói chung và thủy sản nói riêng. Đã có nhiều loại cây cỏ có hoạt tính kháng sinh được nghiên cứu sử dụng trong phòng và trị một số bệnh trên động vật thủy sản như cỏ mực, cây bàng, cây chó đẻ, xoan,... Tuy nhiên cây bạch hoa xà là loài mới, chưa được nghiên cứu ứng dụng nhiều trong thủy sản. Plumbagin (2-Methoxy-5-hydroxy-1-4-Napthoquinone), là một

napthoquinone tự nhiên có nhiều hoạt tính dược lý khác nhau và kháng sinh (Didry *et al.*, 1994) chứa trong cây bạch hoa xà. Nó cũng có tính sát trùng, kích thích tiêu hóa. Vì vậy, việc xác định tính kháng khuẩn của thảo dược trong thủy sản như một phương pháp mới và an toàn.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu thí nghiệm

Chủng vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* và vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* phân lập được từ bệnh phẩm cá tra.

Bạch hoa xà (*Plumbago zaylanica*) được xác định thông qua hình dạng bên ngoài dựa trên sự miêu tả của Đỗ Tất Lợi (2004). Lá là bộ phận của cây BHX được sử dụng trong thí nghiệm và thu hái tại vườn thảo dược, Khoa Dược Điều dưỡng – Trường Đại học Tây Đô.

Hóa chất chính: Cồn 70 %, BHIA (Brain Heart Infusion Agar), NA (Nutrien Agar), NB (Nutrien Broth).

2.2 Phương pháp chiết xuất thảo dược

Lá BHX được thu hái vào buổi sáng, rửa sạch, để ráo và sử dụng chiết xuất dịch chiết trong dung môi chiết xuất là nước cất, cồn 70% với các tỉ lệ lá BHX: Dung môi là 1:1, 2:1, 3:1

BHX được chiết xuất bằng 3 phương pháp sau:

Phương pháp 1: Gia nhiệt bạch hoa xà với nước cất (DW - Distilled Water).

Lá BHX được xay nhuyễn trong nước cất (ml) với thể tích tương ứng các tỉ lệ. Hỗn hợp được gia nhiệt bằng máy khuấy từ ở nhiệt độ 98 °C trong 3 giờ, để nguội. Hỗn hợp sau khi lọc qua giấy lọc được dịch chiết với các tỉ lệ lá: DW là 1:1, 2:1, 3:1 (Trương Thị Đẹp, 2005)

Phương pháp 2: Bạch hoa xà ngâm 3 ngày trong cồn 70%.

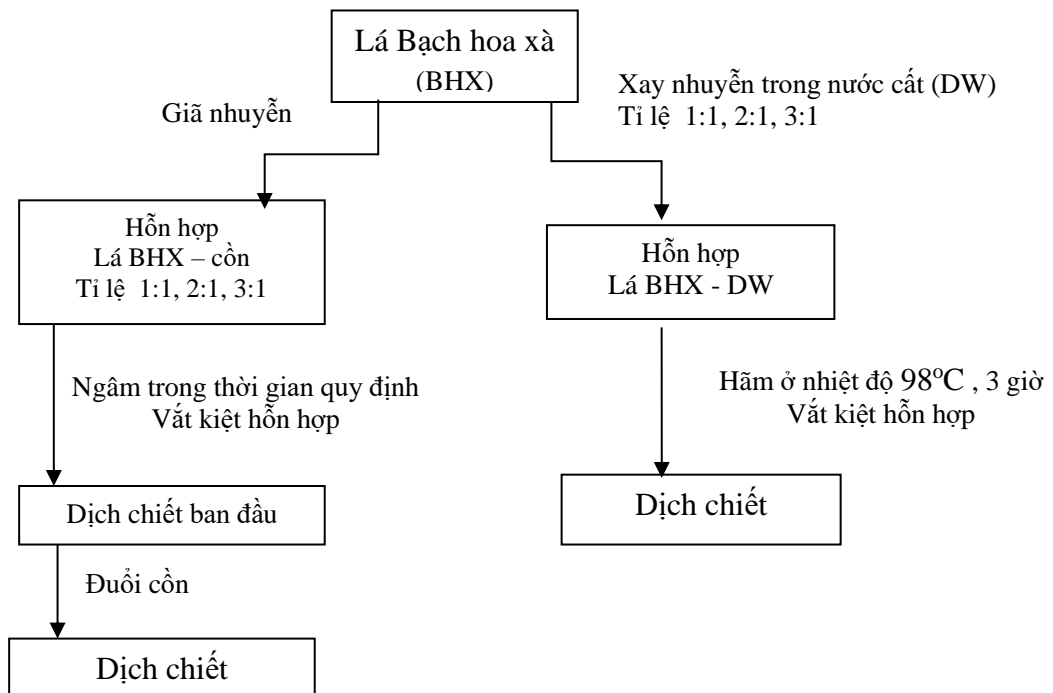
Lá BHX được xay nhuyễn cho vào bình thủy tinh chứa cồn 70% với thể tích tương ứng các tỉ lệ. Bịt kín miệng bình và để ở nhiệt độ phòng trong thời gian 3 ngày. Thêm nước cất cho đạt thể tích ban đầu và lọc qua giấy lọc thu được dịch chiết với

các tỷ lệ thảo dược: còn lần lượt bằng 1:1, 2:1, 3:1. Dịch chiết được đun sôi còn bằng cách khuấy đều ở nhiệt độ 40°C (Bộ Y tế, 2008).

Phương pháp 3: Bạch hoa xà ngâm 6 ngày trong còn 70%

Lá BHX được xay nhuyễn cho vào bình thủy tinh

chứa còn 70% với thể tích tương ứng các tỉ lệ. Bịt kín miệng bình và để ở nhiệt độ phòng trong thời gian 6 ngày. Thêm nước cất cho đạt thể tích ban đầu và lọc qua giấy lọc thu được dịch chiết với các tỷ lệ thảo dược: còn lần lượt bằng 1:1, 2:1, 3:1. Dịch chiết được đun sôi còn bằng cách khuấy đều ở nhiệt độ 40 °C (Bộ Y tế, 2008).



Hình 1. Sơ đồ tổng quát phương pháp chiết xuất dịch chiết từ lá Bạch hoa xà

2.3 Phương pháp xác định tính kháng khuẩn của dịch chiết Bạch hoa xà

Phương pháp khuếch tán trên thạch (dựa vào vòng kháng khuẩn) được sử dụng xác định tính kháng khuẩn của dịch chiết BHX đối với vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* và *Edwardsiella ictaluri* (Trương Công Quyền và ctv, 1986).

Vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* và *Edwardsiella ictaluri* được phục hồi, tách riêng và nuôi tăng sinh đạt các mật độ là $10^3, 10^6, 10^9$ (cfu/ml) thì tiến hành thực hiện thí nghiệm. Mỗi mật độ vi khuẩn được thực hiện 3 lần lặp lại tương ứng với từng phương pháp chiết xuất dịch chiết.

Tính kháng khuẩn của dịch chiết Bạch hoa xà đối với 2 vi khuẩn này được xác định bằng phương

pháp đục giếng. Bốn giếng có đường kính 6mm được đục trên mặt thạch ở mỗi đĩa petri đã được tán vi khuẩn, trong đó 3 giếng để chứa dịch chiết thảo dược với thể tích cho vào mỗi giếng là 50 μ l; 1 giếng để chứa dung môi đối chứng là nước cất hay còn 70% (đã đun sôi hết còn). Đường kính vòng kháng khuẩn được xác định bằng thước ô li sau khi ủ đĩa ở nhiệt độ 32 °C trong thời gian 24 giờ (Jan Hudzicki, 2009).

2.4 Xác định vòng kháng khuẩn

Khả năng kháng khuẩn của dịch chiết được ghi nhận qua vòng kháng khuẩn xuất hiện xung quanh các giếng trên đĩa thạch. Vòng kháng khuẩn (X) được đo bằng thước kẻ ô li và đánh giá tính kháng theo Jan Hudzicki, (2009) như sau:

X= 0: Không kháng

X < 5: Kháng yếu

5<X<10: Kháng trung bình

X = 10: Kháng mạnh

2.5 Xử lý số liệu

Số liệu được tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn bằng chương trình Microsoft Excel và so sánh sự khác biệt thống kê bằng chương trình SPSS 20.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả

Bảng 1. Kết quả thăm dò tính kháng khuẩn của dịch chiết Bạch hoa xà chiết xuất bằng phương pháp gia nhiệt

Tỉ lệ BHX: DW	Mật độ <i>A.hydrophila</i> (CFU/mL)			Mật độ <i>E.ictaluri</i> (CFU/mL)		
	10 ³	10 ⁶	10 ⁹	10 ³	10 ⁶	10 ⁹
1:1	10,0 ± 0,3 ^{aA}	10,3 ± 0,4 ^{aA}	10,0 ± 0,9 ^{aA}	9,9 ± 0,5 ^{Aa}	12,2 ± 0,4 ^{aB}	12,9 ± 0,3 ^{aB}
2: 1	11,4 ± 1,1 ^{aA}	11,4 ± 0,3 ^{bA}	10,6 ± 0,5 ^{aA}	10,9 ± 0,6 ^{bA}	13,3 ± 0,4 ^{aB}	14,3 ± 0,3 ^{bC}
3:1	12,5 ± 0,7 ^{bA}	12,3 ± 0,1 ^{cA}	12,3 ± 0,4 ^{bA}	12,7 ± 0,1 ^{cA}	14,9 ± 0,9 ^{bB}	15,4 ± 0,8 ^{cB}
Đối chứng	0	0	0	0	0	0

Ghi chú: Các giá trị có chữ cái in thường giống nhau trong cùng một cột, chữ cái in hoa giống nhau trong cùng một dòng thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$).

Dịch chiết bạch hoa xà có tác dụng kháng khuẩn *E.ictaluri* mạnh hơn vi khuẩn *A.hydrophila*. Đối với vi khuẩn *E.ictaluri*, vòng kháng khuẩn của dịch chiết dao động từ 9,9 -15,4 mm. Dịch chiết chiết xuất với tỉ lệ 3:1 cho kết quả vòng kháng khuẩn lớn nhất (15,4 mm) tại mật độ vi khuẩn là 10⁹ CFU/ml, khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ($P<0,05$) so với vòng kháng khuẩn chiết xuất với các tỉ lệ 1:1 và 2:1 và cũng khác biệt có ý nghĩa thống kê so với vòng kháng khuẩn tại mật độ *E.ictaluri* 10³, 10⁶ CFU/ml.

3.1.2 Khả năng kháng khuẩn của dịch chiết được chiết xuất bằng phương pháp ngâm với cồn 70% trong 3 ngày

Đối với vi khuẩn *A.hydrophila*, vòng kháng khuẩn của dịch chiết Bạch hoa xà đạt thấp nhất với tỉ lệ 1:1 (11,8 ± 0,1 mm) và mật độ vi khuẩn 10³

3.1.1 Khả năng kháng khuẩn của dịch chiết được chiết xuất bằng phương pháp gia nhiệt

Vòng kháng khuẩn của dịch chiết Bạch hoa xà đạt (10,3 - 12,3 mm) đối với vi khuẩn *Aeromonas* sp. ở mật độ vi khuẩn 10⁶ tốt hơn so với mật độ vi khuẩn 10³ và 10⁹ CFU/ml tương ứng từng tỷ lệ dịch chiết, tuy nhiên khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Với tỷ lệ 3:1, mật độ vi khuẩn 10⁹ CFU/ml, kết quả vòng kháng khuẩn *A.hydrophila* của dịch chiết là 12,3 mm và khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$) so với kết quả vòng kháng khuẩn ở mật độ 10³ và 10⁶ CFU/mL.

CFU/mL; đạt cao nhất (15,9 ± 0,3 mm) ở tỷ lệ dịch chiết 3:1 và mật độ vi khuẩn 10⁹ CFU/mL. Với phương pháp chiết xuất bằng cồn 70% trong thời gian 3 ngày, vòng kháng khuẩn *A.hydrophila* đạt (11,8 – 15,9 mm) lớn hơn so với tác dụng của dịch chiết được chiết xuất bằng phương pháp gia nhiệt (10,3 – 12,3 mm).

Dịch chiết BHX chiết xuất bằng cồn 70% và ngâm trong thời gian 3 ngày tác dụng lên vi khuẩn *E.ictaluri* tốt hơn, cho kết quả vòng kháng khuẩn cao hơn so với tác dụng lên vi khuẩn *A. hydrophila* và dịch chiết với tỉ lệ 3: 1 cũng cho kết quả vòng kháng khuẩn lớn nhất (15,3 – 20,4 mm) tương ứng từng mật độ vi khuẩn (Bảng 2), khác biệt có ý nghĩa thống kê so với vòng kháng khuẩn ở các tỉ lệ 1:1 và 2: 1 (12,7 – 17,8 mm).

Bảng 2. Kết quả thăm dò tính kháng khuẩn của dịch chiết Bạch hoa xà chiết xuất bằng phương pháp ngâm trong cồn 70% thời gian 3 ngày

Tỷ lệ BHX : cồn 70%	Mật độ <i>A. hydrophila</i> (CFU/mL)			Mật độ <i>E. ictaluri</i> (CFU/mL)		
	10 ³	10 ⁶	10 ⁹	10 ³	10 ⁶	10 ⁹
1:1	11,8 ± 0,1 ^{aA}	11,8 ± 0,5 ^{aA}	13,3 ± 0,4 ^{aB}	12,7 ± 0,2 ^{aA}	14,5 ± 0,6 ^{aB}	15,4 ± 0,4 ^{aB}
2:1	13,0 ± 0,5 ^{bA}	13,3 ± 0,2 ^{bA}	14,2 ± 0,4 ^{bB}	13,7 ± 0,1 ^{bA}	15,7 ± 0,1 ^{bB}	17,8 ± 0,8 ^{bC}
3:1	14,2 ± 0,6 ^{cA}	14,8 ± 0,3 ^{cA}	15,9 ± 0,3 ^{cB}	15,3 ± 0,8 ^{cA}	17,2 ± 0,6 ^{cB}	20,4 ± 0,7 ^{cC}
Đối chứng	0	0	0	0	0	0

Ghi chú: Các giá trị có chữ cái in thường giống nhau trong cùng một cột, chữ cái in hoa giống nhau trong cùng một dòng thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$).

3.1.3 Khả năng kháng khuẩn của dịch chiết được chiết xuất bằng phương pháp ngâm với cồn 70% trong 6 ngày

Vòng kháng khuẩn của dịch chiết Bạch hoa xà trên vi khuẩn *A. hydrophila*. thấp nhất tỷ lệ 1:1 (13,4 - 15,6 mm) và cao nhất ở tỷ lệ 3:1 (16,9 - 19,8 mm) với các mật độ vi khuẩn khác nhau. Ở mật độ vi khuẩn 10⁶, 10⁹ CFU/mL, với cả 3 tỷ lệ

dịch chiết đều cho kết quả vòng kháng khuẩn từ (14,2 - 17,7 mm) và khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Ở mật độ vi khuẩn *A. hydrophila* 10⁹ CFU/mL, kết quả vòng kháng khuẩn dao động từ 15,6 - 19,8 mm, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với kết quả vòng kháng khuẩn đạt được ở mật độ vi khuẩn 10³ CFU/mL (13,4 - 16,9 mm).

Bảng 3. Kết quả thăm dò tính kháng khuẩn của dịch chiết Bạch hoa xà chiết xuất bằng phương pháp ngâm trong cồn 70% thời gian 6 ngày

Tỷ lệ BHX : cồn 70%	Mật độ <i>A. hydrophila</i> (CFU/mL)			Mật độ <i>E. ictaluri</i> . (CFU/mL)		
	10 ³	10 ⁶	10 ⁹	10 ³	10 ⁶	10 ⁹
1:1	13,4 ± 0,6 ^{aA}	14,2 ± 0,8 ^{aA}	15,6 ± 0,3 ^{aB}	14,6 ± 0,4 ^{aA}	15,8 ± 0,4 ^{aA}	18,7 ± 1,3 ^{aB}
2:1	14,5 ± 0,2 ^{aA}	15,8 ± 0,5 ^{bA}	17,8 ± 1,3 ^{bB}	15,9 ± 0,2 ^{bA}	18,0 ± 0,3 ^{bB}	20,5 ± 1,5 ^{abC}
3:1	16,9 ± 1,2 ^{bA}	17,7 ± 0,6 ^{cA}	19,8 ± 1,0 ^{cB}	17,5 ± 0,4 ^{cA}	19,1 ± 0,8 ^{cB}	22,7 ± 0,5 ^{bC}
Đối chứng	0	0	0	0	0	0

Ghi chú: Các giá trị có chữ cái in thường giống nhau trong cùng một cột, chữ cái in hoa giống nhau trong cùng một dòng thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$).

Vòng kháng khuẩn của dịch chiết Bạch hoa xà trên vi khuẩn *E. ictaluri* ở các mật độ vi khuẩn 10³, 10⁶, 10⁹ CFU/mL cho kết quả thấp nhất ở tỷ lệ 1:1 (14,6 - 18,7 mm) và cao nhất ở tỷ lệ 3:1 (17,5 - 22,7 mm). Mật độ vi khuẩn càng tăng thì vòng kháng khuẩn càng lớn. Cụ thể là kết quả vòng kháng khuẩn đạt cao nhất là 22,7 mm với tỷ lệ dịch chiết 3:1 và mật độ vi khuẩn 10⁹ CFU/mL, khác biệt rất có ý nghĩa thống kê so với vòng kháng khuẩn thấp nhất ở mật độ vi khuẩn 10³ CFU/mL (14,6 ± 0,4 mm). So với kết quả vòng kháng khuẩn *A. hydrophila*, tác dụng kháng khuẩn

của dịch chiết Bạch hoa xà đối với vi khuẩn *E. ictaluri* thể hiện tốt hơn và phương pháp ngâm BHX trong với cồn 70% trong 6 ngày cho vòng kháng khuẩn cao nhất.

3.1.4. Ảnh hưởng của phương pháp chiết xuất lên tính kháng khuẩn của dịch chiết

Đối với vi khuẩn *Aeromonas hydrophila*

Vòng kháng khuẩn của dịch chiết BHX dao động từ 10 – 19,8 mm, lớn hơn 10 mm, tính kháng mạnh đối với vi khuẩn *Aeromonas* (Theo Jan Hudzicki, 2009). Bạch hoa xà khi chiết xuất với tỉ

lệ 3:1 luôn cho vòng kháng khuẩn từ 13,3 – 19,8 mm, lớn hơn và khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với vòng kháng khuẩn được tạo ra từ dịch chiết chiết xuất với tỉ lệ 2:1 và 1:1. Bên cạnh đó, vòng kháng khuẩn của dịch chiết được chiết xuất bằng cồn 70% trong 6 ngày đạt lớn nhất

(19,8 mm \pm 0,2 mm) đối với vi khuẩn có mật độ 10^9 CFU/ml. Như vậy, kết quả thí nghiệm cho thấy, phương pháp ngâm lá BHX tươi trong cồn 70% cho ra dịch chiết có tác dụng kháng *Aeromonas hydrophila* tốt nhất.

Bảng 4. Kết quả thăm dò tính kháng khuẩn của dịch chiết BHX đối với vi khuẩn *A. hydrophila*

PP	Mật độ <i>A. hydrophila</i> 10^3 CFU/ml			Mật độ <i>A. hydrophila</i> 10^6 CFU/ml			Mật độ <i>A. hydrophila</i> 10^9 CFU/ml		
	1:1	2:1	3:1	1:1	2:1	3:1	1:1	2:1	3:1
	PP1	10,0 \pm 0,3 ^a	11,4 \pm 1,1 ^a	12,5 \pm 0,7 ^a	10,3 \pm 0,4 ^a	11,2 \pm 0,3 ^a	12,3 \pm 0,1 ^a	10,0 \pm 0,9 ^a	10,6 \pm 0,5 ^a
PP2	11,8 \pm 0,1 ^b	13,0 \pm 0,5 ^b	14,2 \pm 0,6 ^a	11,8 \pm 0,5 ^b	13,3 \pm 0,2 ^b	14,8 \pm 0,3 ^b	13,3 \pm 0,4 ^b	14,2 \pm 0,4 ^b	15,9 \pm 0,3 ^b
PP3	13,4 \pm 0,6 ^c	14,5 \pm 0,9 ^c	16,9 \pm 1,2 ^b	14,2 \pm 0,8 ^c	13,3 \pm 0,2 ^b	17,7 \pm 0,6 ^c	15,6 \pm 0,3 ^c	17,8 \pm 1,3 ^c	19,8 \pm 1,2 ^c

Ghi chú: Các giá trị có chữ cái giống nhau trong cùng một cột thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$).

Đối với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*

Vòng kháng khuẩn của dịch chiết BHX đối với vi khuẩn *E. ictaluri* lớn hơn so với vòng kháng vi khuẩn *A. hydrophila*, thấp nhất đạt 9,9 mm đối với dịch chiết chiết xuất bằng phương pháp gia nhiệt với nước cất và cao nhất là 22,7 mm khi BHX được chiết xuất với tỉ lệ 3:1 bằng cồn 70% trong 6

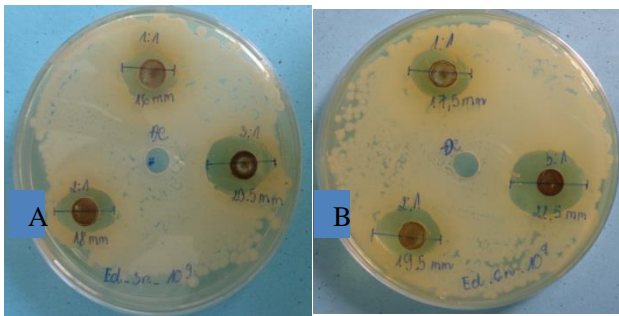
ngày, tương ứng mật độ vi khuẩn 10^9 CFU/ml. Dịch chiết được chiết xuất phương pháp gia nhiệt trong nước cất luôn cho kết quả vòng kháng khuẩn thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với vòng kháng khuẩn của hai phương pháp chiết xuất bằng cồn 70% (Bảng 5)

Bảng 5. Kết quả thăm dò tính kháng khuẩn của dịch chiết BHX đối với vi khuẩn *E. ictaluri*

PP	Mật độ <i>E. ictaluri</i> 10^3 CFU/ml			Mật độ <i>E. ictaluri</i> 10^6 CFU/ml			Mật độ <i>E. ictaluri</i> 10^9 CFU/ml		
	1:1	2:1	3:1	1:1	2:1	3:1	1:1	2:1	3:1
	PP1	9,9 \pm 0,5 ^a	10,9 \pm 0,6 ^a	12,7 \pm 0,1 ^a	12,2 \pm 0,4 ^a	13,3 \pm 0,4 ^a	14,8 \pm 0,9 ^a	12,9 \pm 0,3 ^a	14,3 \pm 0,3 ^a
PP2	12,7 \pm 0,2 ^b	13,7 \pm 0,1 ^b	15,3 \pm 0,8 ^b	14,5 \pm 0,6 ^b	15,7 \pm 0,1 ^b	17,2 \pm 0,6 ^b	15,4 \pm 0,4 ^b	17,8 \pm 0,8 ^b	20,4 \pm 0,7 ^b
PP3	14,6 \pm 0,5 ^c	15,9 \pm 0,2 ^c	15,9 \pm 0,2 ^b	15,8 \pm 0,4 ^c	18 \pm 0,3 ^c	19,1 \pm 0,8 ^c	18,7 \pm 1,3 ^c	17,8 \pm 0,8 ^b	22,7 \pm 0,5 ^c

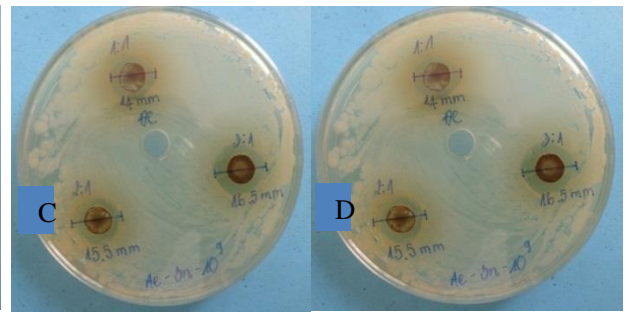
Ghi chú: Các giá trị có chữ cái giống nhau trong cùng một cột thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$).

Như vậy, BHX được chiết xuất bằng phương pháp ngâm trong cồn 70% từ 3 – 6 ngày đều cho kết quả kháng khuẩn *A. hydrophila* và *E. ictaluri* mạnh. Mật độ vi khuẩn càng cao thì dịch chiết được chiết xuất với tỉ lệ 3:1 cho vòng kháng càng lớn.



Hình 2a: Vòng kháng khuẩn đối với *E. ictaluri*, mật độ 109 CFU/mL

A.BHX chiết xuất bằng cồn 70% , ngâm 3 ngày
 B.BHX chiết xuất bằng cồn 70% , ngâm 3 ngày



Hình 2b: Vòng kháng khuẩn đối với *A. hydrophila*, mật độ 109 CFU/mL

C.BHX chiết xuất bằng cồn 70% , ngâm 3 ngày
 D.BHX chiết xuất bằng cồn 70% , ngâm 3 ngày

3.2 Thảo luận

Aeromonas hydrophila và *Edwardsiella ictaluri* là vi khuẩn gây bệnh phổ biến trên cá, gây thiệt hại đáng kể và đã kháng nhiều loại kháng sinh. *A. hydrophila* gây bệnh đốm đỏ trên cá, tỉ lệ tử vong từ 30 – 70%, đối với cá tra, cá basa giai đoạn giống có thể lên đến 100% (Bùi Quang Tê, 2004) và đã kháng mạnh nhiều kháng sinh mạnh như Ampicillin, Tetracycline, Novobiocin, ... (Orozoval *et al.*, 2008), kháng hoàn toàn với Cefalexin, Trimethoprim/Sulfamethoxazol (Quách Văn Cao Thi và *ctv.*, 2014). Vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh gan thận mũ trên cá da trơn, tỉ lệ tử vong thường 60 – 70%, đã kháng nhiều kháng sinh như Streptomycin (83%), Oxytetracycline (81%), Trimethoprim (73%) (Tu Thanh Dung *et al.*, 2008).

Theo Quách Văn Cao Thi và *ctv.*, (2014), có 30 dòng vi khuẩn *A. hydrophila* và 30 dòng vi khuẩn *E. ictaluri* đã kháng thuốc kháng sinh. Vi khuẩn *E. ictaluri* chỉ còn nhạy với kháng sinh nhóm penicillin như ampicillin, amoxicillin và 2 loại kháng sinh này được Quách Văn Cao Thi và *ctv.*, (2014) đề xuất sử dụng trong điều trị bệnh gan thận mũ gây ra trên cá tra. Thuốc kháng sinh Erythromycin thiocyanate được Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương (2012) thử nghiệm điều trị bệnh do *E. ictaluri* trên cá tra.

Chủng vi khuẩn *E. ictaluri* rất nhạy với thuốc kháng sinh Erythromycin thiocyanate với vòng kháng khuẩn dao động từ 20-25 mm và cá bị bệnh gan thận mũ do *E. ictaluri* gây ra đã có sự cải thiện tình trạng, tỉ lệ chết thấp hơn khi không sử dụng Erythromycin thiocyanate.

Kết quả thăm dò tính kháng khuẩn của thảo dược trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản vẫn chưa được công bố nhiều trên các báo khoa học. Theo Huỳnh Kim Diệu, (2010), có một số cây thuốc nam có hoạt phổ kháng mạnh trên vi khuẩn *E. ictaluri* như cây bàng, ổi, trầu không, cỏ sữa lá, rau dứa nước, cỏ mực. Kết quả vòng kháng khuẩn của dịch chiết BHX trong thí nghiệm đối với *A. hydrophila* và *E. ictaluri* tương đương với kết quả thăm dò hoạt tính kháng khuẩn của một số cây thuốc nam như bàng (18 -19 mm), cỏ mực (11 – 24 mm), ổi (17 – 21 mm), diệp hạ châu xanh (16 – 21 mm). Đa số các dịch chiết thảo dược đều có tính kháng khuẩn *E. ictaluri* mạnh hơn đối với vi khuẩn *A. hydrophila* (Huỳnh Kim Diệu, 2010). Như vậy, các kết quả nghiên cứu về thử hoạt tính kháng khuẩn của các cây thuốc nam đã vạch ra hướng mới, nghiên cứu sử dụng các cây thuốc nam trong điều trị bệnh do *Aeromonas hydrophila* và *Edwardsiella ictaluri* gây ra trên cá, nhằm thay thế kháng sinh, tránh được tồn dư kháng sinh trong sản phẩm, tốt cho sức khỏe người tiêu dùng.

4. KẾT LUẬN

Dịch chiết Bạch hoa xà được chiết xuất bằng phương pháp gia nhiệt hay ngâm trong cồn 70% đều có tính kháng mạnh đối với vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* và *Edwardsiella ictaluri*

Dịch chiết BHX được chiết xuất bằng cồn 70% trong thời gian ngâm 6 ngày cho kết quả kháng khuẩn *Aeromonas hydrophila* và *Edwardsiella ictaluri* cao nhất. Tuy nhiên, tác dụng kháng khuẩn của dịch chiết Bạch hoa xà đối với vi khuẩn *E. ictaluri* luôn cao hơn so với vi khuẩn *A. hydrophila*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bùi Quang Tề, Đỗ Thị Hòa, Nguyễn Hữu Dũng, Nguyễn Thị Muội, 2000. *Giáo trình bệnh học thủy sản*. Hồ Chí Minh: Nhà xuất bản Nông Nghiệp.
- Bộ y tế, 2008. *Kỹ thuật bào chế và sinh dược học các dạng thuốc*, tập II. Hà Nội: Nhà xuất bản Y học.
- Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012. Thử nghiệm điều trị bệnh do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* trên cá Tra (*Pangasius hypophthalmus*) bằng thuốc kháng sinh Erythromycin thiocyanate. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 2012:22c. 146-154
- Đỗ Tất Lợi, 2004. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Hà Nội: Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật.
- Huỳnh Kim Diệu, 2010. Hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh trên cá của một số cây thuốc nam ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 2010:15b. 222-229.
- Jan Hudzicki, 2009. Kirby - Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol.
- N.Didry, L.Dubrevil and M.Pinkas,1994. *Activity of anthroquinone and naphthoquinone compounds on oral bacteria Diepharmazie: Vol.49 (9) 681-683.*
- Orozoval P., Chikova V., Kolarova V., Nenova R., and Najdenskil H., 2008. Antibiotic resistance of potentially pathogenic *Aeromonas* strains, *Trakia journal of sciences*, 6:71-77
- Quách Văn Cao Thi, Từ Thanh Dung, Đặng Phạm Hòa Hiệp, 2014. Hiện trạng kháng thuốc kháng sinh trên hai loài vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila* gây bệnh trên cá tra ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí KH Trường ĐHTC*. Số chuyên đề thủy sản năm 2014: 7 -14.
- Trương Thị Đẹp, Nguyễn Thị Thu Hằng, Nguyễn Thị Thu Ngân và Liêu Hồ Mỹ Trang, 2005. *Thực vật dược*. Hà Nội: Nhà xuất bản Giáo dục.
- Trương Công Quyền, Vũ Công Thuyết (1986), *Thực hành dược khoa*, Hà Nội: NXB Y học, trang 505-507.
- Từ Thanh Dung, M.Crumlish, Nguyễn Thị Như Ngọc, Nguyễn Quốc Thịnh và Đặng Thụy Mai Thy, 2004. Xác định vi khuẩn gây bệnh trắng gan trên cá tra (*Pangasius hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*. Chuyên ngành thủy sản, 137-142.
- Tu Thanh Dung, Freddy H., Nguyen A.T., Patric S., Margo B. and Annemie D., 2008. Antimicrobial susceptibility pattern of *Edwardsiella ictaluri* isolates from natural outbreaks of bacillary necrosis of *Pangasianodon hypophthalmus* in Vietnam, *Microbial drug resistance*, 14 (4): 311-316.