

**KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN CỦA DỊCH CHIẾT ÉP TƯƠI LÁ,
QUẢ VÀ HẠT CHÙM NGÂY ĐỐI VỚI *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*
VÀ *Vibrio harveyi* GÂY BỆNH TRÊN TÔM THẺ CHÂN TRẮNG**

**Trương Đình Hoài*, Vương Huy Khiêm, Nguyễn Thảo Anh,
Đặng Thị Hoá, Trần Thị Trinh, Đoàn Thị Ninh, Nguyễn Ngọc Tuấn**

Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

**Tác giả liên hệ: tdhoai@vnua.edu.vn*

Ngày nhận bài: 27.12.2024

Ngày chấp nhận đăng: 20.05.2025

TÓM TẮT

Nghiên cứu này đánh giá khả năng kháng khuẩn của dịch chiết từ các bộ phận cây chùm ngây lên vi khuẩn gây bệnh trên tôm thẻ chân trắng. Tổng số 9 chủng vi khuẩn được phân lập và định danh thành công bao gồm *Vibrio parahaemolyticus* (n = 3) từ tôm nhiễm bệnh hoại tử gan tụy cấp, *V. alginolyticus* (n = 3) từ tôm nhiễm bệnh phân trắng và *V. harveyi* (n = 3) nhiễm bệnh phát sáng. Từ 500g mỗi bộ phận sau khi chiết ép thu được 278ml dịch chiết quả non, 170ml dịch chiết lá tươi và 250ml dầu hạt. Kết quả đánh giá khả năng ức chế bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch, vòng vô khuẩn tạo ra đối với 3 loài vi khuẩn đạt 12,8-13,4mm đối với dịch chiết lá, 14,7-15,7mm đối với dịch chiết quả non, trong khi dầu hạt không tạo được vòng vô khuẩn. Dịch chiết lá tươi có khả năng ức chế hoàn toàn (MBC) vi khuẩn *V. parahaemolyticus* ở tỷ lệ pha loãng 1:16 (3,13% dịch chiết) và với hai loài *V. alginolyticus* và *V. harveyi* là 1:64 (0,78% dịch chiết). Dịch chiết quả non đạt giá trị MBC ở mức 1:32 (1,56% dịch chiết) đối với *V. parahaemolyticus* và 1:128 (0,39% dịch chiết) đối với hai loài vi khuẩn còn lại. Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng ứng dụng dịch chiết tươi từ lá, quả chùm ngây để kiểm soát bệnh vi khuẩn trên tôm.

Từ khoá: Dịch chiết chùm ngây, kháng khuẩn, tôm thẻ chân trắng, *Vibrio* spp.

**Antimicrobial Property of Moringa Oleifera Leaves, Pods
and Seeds Against *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*
and *Vibrio harveyi* Causing Diseases in White Leg Shrimp (*Penaeus vannamei*)**

ABSTRACT

This study evaluated the antibacterial activity of extracts from different parts of the moringa plant against pathogenic bacteria in whiteleg shrimp. A total of 9 bacterial strains were successfully isolated and identified, including *Vibrio parahaemolyticus* (n = 3) from shrimp infected with acute hepatopancreatic necrosis, *V. alginolyticus* (n = 3) from shrimp infected with white feces syndrome, and *V. harveyi* (n = 3) from luminous infected shrimp. From 500g of each part, 278ml of immature fruit extract, 170ml of fresh leaf extract, and 250ml of seed oil were obtained. The results from the inhibition assessment using the disk diffusion method showed that the inhibition zones for the three bacterial species ranged from 12.8 to 13.4mm for leaf extracts and 14.7 to 15.7mm for immature fruit extracts, while the seed oil did not produce any inhibition zones. The fresh leaf extract completely inhibited (MBC) *V. parahaemolyticus* at a dilution ratio of 1:16 (3.13% extract) and for the two species *V. alginolyticus* and *V. harveyi* at 1:64 (0.78% extract). The immature fruit extract achieved an MBC value of 1:32 (1.56% extract) against *V. parahaemolyticus* and 1:128 (0.39% extract) against the other two bacterial species. The study results demonstrate the potential application of fresh extracts from moringa leaves and pods for controlling bacterial infections in shrimp..

Keywords: Moringa oleifera extract, Antibacterial, Whiteleg shrimp, *Vibrio* spp.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) là đối tượng nuôi chủ lực ở nhiều quốc gia, với sản lượng hơn 5 triệu tấn/năm (FAO, 2020). Mặc dù sản lượng tăng nhiều trong thập kỷ qua, nhưng chi phí liên quan đến phòng và trị bệnh, đặc biệt là các bệnh do *Vibrio* ngày càng tăng. Các loài *Vibrio* liên quan đến nhiều dịch bệnh trên tôm, nhiều bệnh gây tỷ lệ chết lên tới 100%, gây thiệt hại cho ngành công nghiệp nuôi tôm thế giới hơn 4 triệu USD mỗi năm (Chellapandian & cs., 2021). Có rất nhiều loài *Vibrio* được báo cáo liên quan đến dịch bệnh trên tôm, tuy nhiên loài *Vibrio* chính gây bệnh gồm *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (Prachumwat & cs., 2019), *V. alginolyticus* cũng được xác định là một trong những tác nhân chính liên quan đến bệnh phân trắng trên tôm thẻ chân trắng (Kumara & cs., 2017; Piamsomboon & Han, 2022), *V. harveyi* được coi là tác nhân chính gây ra bệnh phát sáng trên tôm nhiều loài tôm, trong đó có tôm thẻ chân trắng (Nurhafizah & cs., 2021). Để hạn chế dịch bệnh do *Vibrio* gây ra, kháng sinh đã được sử dụng phổ biến gây ra nhiều hệ lụy cho ngành tôm như tình trạng kháng kháng sinh, ô nhiễm môi trường, tồn dư kháng sinh trong sản phẩm tôm khi tới tay người tiêu dùng hoặc xuất khẩu (Pérez-Sánchez & cs., 2018).

Một trong những giải pháp hạn chế việc dùng kháng sinh trong kiểm soát bệnh do *Vibrio* gây ra là sử dụng thảo dược và sản phẩm thảo dược (Aminzare & cs., 2018). Chùm ngây (*Moringa oleifera* Lamk) được xem là một trong những loài cây hữu dụng bậc nhất thế giới, do toàn bộ các phần trên cây này đều có thể được dùng làm thức ăn hoặc phục vụ cho các mục đích khác nhau. Chùm ngây đã được chứng minh có tác dụng hạ sốt, kháng viêm, kháng khuẩn, chữa thấp khớp và được nghiên cứu để ứng dụng trong thú y và nhân y (Nguyễn Linh Nhân & Nguyễn Thị Thu Hương, 2015). Trong nuôi trồng thủy sản, chùm ngây đã được chứng minh có tác dụng làm sạch nước ao nuôi (Bancesi & cs., 2020), bột hạt chùm ngây có khả năng kháng lại *V. cholerae* phân lập từ tôm

giai đoạn postlarvae (Flores & cs., 2022), lá chùm ngây có khả năng nâng cao miễn dịch không đặc hiệu kháng vi khuẩn *V. alginolyticus* (Abidin & cs., 2021).

Mặc dù vậy các sản phẩm chùm ngây cho nuôi trồng thủy sản rất hạn chế, hoặc các sản phẩm nghiên cứu được tạo ra dưới dạng cao chiết với giá thành cao, hoặc điều kiện chiết suất bằng cồn hoặc dung môi gây khó khăn cho việc áp dụng đại trà (Suhartono & cs., 2019). Trong khi cây chùm ngây có thể tận dụng ngay xung quanh khu vực nuôi trồng thủy sản và có thể chiết bằng nước nóng hoặc ép trực tiếp bằng các máy ép thông thường để trộn thức ăn cho tôm. Do vậy, nghiên cứu này sẽ đánh giá khả năng ức chế của các bộ phận gồm lá, quả và hạt của cây chùm ngây trên ba loài vi khuẩn chính gây bệnh trên tôm gồm *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* làm tiền đề ứng dụng dịch chiết ép tươi của các bộ phận cây chùm ngây trong phòng tổng hợp các bệnh vi khuẩn trên tôm thẻ chân trắng.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

Nghiên cứu sử dụng lá, quả non và hạt cây chùm ngây thu hái tươi từ cây; chủng vi khuẩn phân lập từ tôm bệnh tại Nghệ An, Nam Định và Quảng Ninh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu mẫu và phân lập vi khuẩn

Mẫu tôm thẻ chân trắng có biểu hiện nhiễm *Vibrio* sp. được thu từ 9 trại nuôi thương phẩm bao gồm: 3 trại tại Nghĩa Hưng (Nam Định), tôm có biểu hiện của bệnh hoại tử gan tụy cấp; 3 trại tại Quỳnh Lưu (Nghệ An), tôm có biểu hiện của bệnh phát sáng và 3 trại tại Tiên Yên (Quảng Ninh), tôm có biểu hiện của bệnh phân trắng. Mỗi trại nuôi tiến hành thu 10-15 con còn sống và được vận chuyển đến phòng thí nghiệm bằng phương pháp vận chuyển kín.

Ngay sau khi vận chuyển đến phòng thí nghiệm, mẫu gan tụy tôm được ria cấy trên môi trường Chrom Agar *Vibrio* (CHROMagar™,

Khả năng kháng khuẩn của dịch chiết ép tươi lá, quả và hạt chùm ngây đối với *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* và *Vibrio harveyi* gây bệnh trên tôm thẻ chân trắng

Pháp) ở nhiệt độ 28°C trong 24h-48h. Khuẩn lạc chiếm ưu thế được nuôi cấy thuần để tiến hành định danh và lưu ở điều kiện -80°C trong môi trường chứa glycerol để thực hiện nội dung nghiên cứu.

2.2.2. Định danh vi khuẩn

Định danh bằng hình thái, sinh hoá

Các chủng vi khuẩn sau khi nuôi cấy thuần được xác định hình thái khuẩn lạc, hình dạng vi khuẩn sau nhuộm Gram và được thử các đặc tính hình thái, sinh hoá bằng bộ kit API 20E (BioMerieux, Pháp) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Ba chủng vi khuẩn mỗi loài đã được định danh sơ bộ bằng sinh hoá sau khi so sánh với đặc tính sinh hoá của *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *V. alginolyticus* ATCC 17750 và *V. harveyi* ATCC 14126.

Giám định bằng PCR

Chín chủng vi khuẩn đã lựa chọn được sử dụng tách chiết DNA bằng bộ kit InstaGene™ Matrix (Bio-Rad, USA) để giám định bằng kỹ thuật PCR. Quy trình chiết tách DNA được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các cặp mồi đặc hiệu cho từng loài, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* và *V. harveyi* với đoạn gene đích, trình tự nucleotide và kích cỡ đoạn gene đích như trong bảng 1. Thành phần phản ứng PCR bao gồm: 12µl GoTaq Green Master Mix (Promega, Thermo Scientific, US); 1,5µl mỗi mồi xuôi, ngược (10 pmole); 5µl khuôn mẫu DNA và 2µl nuclease-free water. Đối chứng dương là DNA của các chủng chuẩn tương ứng với từng loài, đối chứng âm là nước free-DNA.

Chu trình nhiệt thiết đặt chung cho các phản ứng PCR bao gồm: tiền biến tính ở 94°C trong 2

phút; chu kỳ lặp lại 30 lần: biến tính ở 95°C trong 30 giây, gắn mồi ở 53°C trong 45 giây, tổng hợp kéo dài ở 72°C trong 30 giây; hoàn thành ở 72°C trong 10 phút (Deer & cs., 2010).

Sản phẩm PCR được điện di trên bản gel 1,5% agarose sử dụng buffer TBE với thang DNA chuẩn 100bp (marker). Sử dụng nguồn điện di ở hiệu điện thế 100V cường độ 100mA, thời gian chạy điện di trong 30 phút. Bản gel sau điện di được chụp bằng hệ thống chụp gel (Analytikjena, USA).

2.2.3. Tạo dịch chiết chùm ngây

Lá, quả và hạt từ cây chùm ngây được thu từ khu vực Gia Lâm, Hà Nội. Lá chùm ngây được thu ở giai đoạn bánh tẻ, xanh đều, không sâu bệnh; quả thu ở giai đoạn còn non, đều, nguyên vẹn. Quả già có màu vàng nâu được thu, tách và thu hạt. Sau khi thu lá, quả, hạt được rửa sạch, để khô ráo nước, ép bằng máy MISHIO (MK-39, Trung Quốc) và thu trực tiếp nước ép tươi và dầu. Lượng nguyên liệu sử dụng và thể tích dịch chiết thu được được tổng hợp trong bảng 2. Dịch sau chiết được bảo quản ở nhiệt độ 2-4°C để sử dụng trong vòng 3 ngày và được bổ sung muối để tạo môi trường dịch chiết có độ mặn 1% khi đánh giá khả năng ức chế để phù hợp với đặc điểm sinh lý và phát triển của vi khuẩn *Vibrio*.

2.2.4. Xác định khả năng kháng khuẩn trên đĩa thạch

Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (n = 3), *V. alginolyticus* (n = 3) và *V. harveyi* (n = 3) sau định danh được sử dụng để đánh giá khả năng ức chế của các loại dịch chiết theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch.

Bảng 1. Primer sử dụng để giám định PCR các loài vi khuẩn *Vibrio* sp. trong nghiên cứu

Loài vi khuẩn	Gene đích	Trình tự nucleotide	Kích cỡ (bp)	Tài liệu tham khảo
<i>V. harveyi</i>	toxR	F: TTCTGAAGCAGCACTCAC R: TCGACTGGTGAAGACTCA	390	Conejero & Hedreyda (2003)
<i>V. parahaemolyticus</i>	pirA	F: GTGTTGCATAATTTTGTGCA R: TTGTACAGAAACCACGACTA	360	Tinwongger & cs. (2014)
<i>V. alginolyticus</i>	gyrB	F: GAGAACCCGACAGAAGCGAAG R: CCTAGTGCGGTGATCAGTGTG	337	Zhou & cs. (2007)

Bảng 2. Khối lượng nguyên liệu sử dụng và thể tích dịch chiết thu được

Bộ phận cây	Khối lượng trước khi ép (g)	Thể tích dịch chiết thu được (ml)
Quả non	500	278
Lá	500	170
Hạt già	500	250

Bảng 3. Mức độ kháng khuẩn của dịch chiết chùm ngây phân chia theo đường kính vòng vô khuẩn

Đường kính vòng vô khuẩn	Mức độ kháng khuẩn
≤ 5mm	Yếu-
5-10mm	Vừa*
11-20mm	Mạnh**
≥ 21mm	Rất mạnh***

Sinh khối các chủng vi khuẩn nuôi tăng sinh trên môi trường BHIB (Merch, Darmstadt, Đức) sau 24h được thu, rửa và làm đồng nhất trong PBS bổ sung 1% muối. Mật độ vi khuẩn được điều chỉnh $\sim 1 \times 10^8$ CFU/ml bằng phương pháp so màu theo thang McFarland (mức 0,5) và chang đều lên mặt thạch TCBS (Merch, Darmstadt, Đức). Đĩa thạch sau khi rìa vi khuẩn được đục lỗ, tạo các giếng có đường kính 6mm và nhỏ 50 μ l từng loại dịch chiết tương ứng. Kháng sinh Doxycycline (Dx 30 μ g, Oxoid Thermo Scientific, USA) được đặt cùng trên từng đĩa thử để so sánh hiệu quả kháng khuẩn với các loại dịch chiết. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Các đĩa thạch được ủ ở 28°C trong 24 giờ và được đo đường kính vòng vô khuẩn để xác định khả năng kháng khuẩn của dịch chiết. Dựa trên kích thước vòng vô khuẩn, hoạt tính kháng khuẩn được chia thành các mức rất mạnh, mạnh, vừa và yếu (Bảng 3) theo mô tả của Faikoh & cs. (2014) và Pratiwi & cs. (2023).

2.2.5. Xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (minimum bactericidal concentration - MBC)

Loại dịch chiết có tạo vòng vô khuẩn từ mức “vừa” trở lên theo kết quả của thử nghiệm khuếch tán trên đĩa thạch được đưa vào xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu. Dịch chiết được pha loãng theo cấp số 2 với các tỷ lệ pha loãng từ 1:1 đến 1:256 bằng PBS có bổ sung 1%

muối, tương ứng với tỷ lệ phần trăm (%) dịch chiết giảm dần từ 50% đến 0,195%. Vi khuẩn (n = 9) được nuôi tăng sinh trong môi trường BHIB trong 24h, ly tâm thu sinh khối, đồng nhất trong PBS và điều chỉnh về mật độ khoảng 1×10^9 CFU/ml (thang MacFarland 3).

Đối với mỗi chủng vi khuẩn, chuẩn bị các dãy ống falcon 15ml, chứa 10ml dịch chiết đã pha loãng ở các tỷ lệ trên và 01 ống chứa PBS 1% muối sử dụng làm đối chứng. Tiến hành cấy 10 μ l vi khuẩn giống vào từng ống, lắc đều và ủ các ống thí nghiệm ở 28°C trong 24h. Sau khi ủ, lấy 50 μ l dịch trong các ống để chang cấy trên đĩa thạch TCBS. Liều MBC được xác định là mức pha loãng thấp nhất không còn vi khuẩn phát triển trên đĩa thạch sau chang cấy.

2.2.6. Xử lý số liệu

Số liệu về đường kính vòng vô khuẩn được phân tích thống kê mô tả và so sánh sự khác biệt về kích thước vòng vô khuẩn giữa các loại dịch chiết bằng phép thử ANOVA, Tukey post-hoc trên phần mềm SPSS. Số liệu đường kính vòng vô khuẩn được biểu diễn dưới dạng TB $\pm$ SE.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn

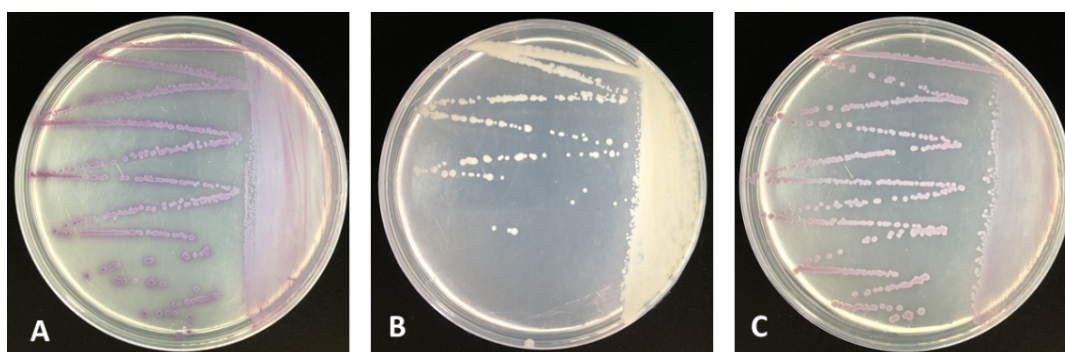
Nghiên cứu đã phân lập thành công nhóm chủng vi khuẩn từ mẫu tôm bệnh và lựa chọn

Khả năng kháng khuẩn của dịch chiết ép tươi lá, quả và hạt chùm ngây đối với *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* và *Vibrio harveyi* gây bệnh trên tôm thẻ chân trắng

được 3 chủng đại diện cho mỗi bệnh (1 chủng/trại) để đưa vào định danh. Kết quả xác định hình thái, sinh hoá cho thấy, 3 chủng vi khuẩn phân lập từ tôm có biểu hiện bệnh hoại tử gan tụy cấp đều có đặc điểm tương đồng với chủng chuẩn *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 như khuẩn lạc màu xanh trên TCBS, màu tím hoa cà trên môi trường Chrom Vibrio; 3 chủng phân lập từ tôm nhiễm bệnh phát sáng có đặc điểm tương đồng với chủng chuẩn *V. harveyi* ATCC 14126, khuẩn lạc màu xanh trên TCBS và màu tím nhạt trên thạch Chrom Vibrio. Trong khi đó, 3 chủng đại diện phân lập từ tôm có biểu hiện bệnh phân trắng có khuẩn lạc màu vàng trên TCBS và màu trắng trên môi

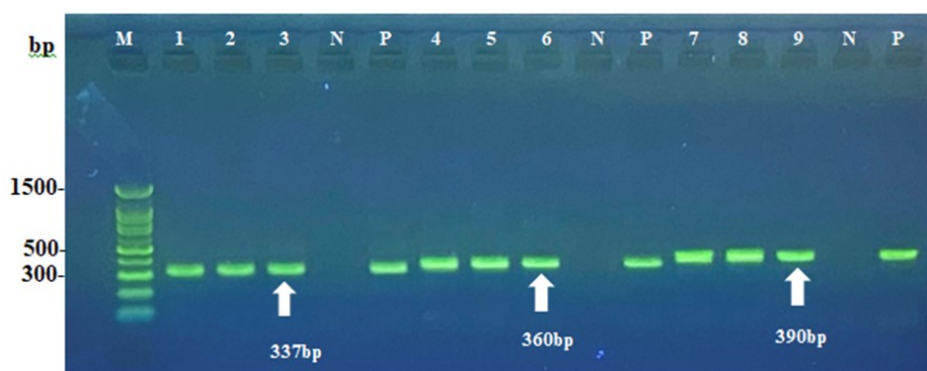
trường Chrom Agar Vibrio tương đồng với chủng chuẩn *V. alginolyticus* ATCC 17750 (Hình 1).

Các đặc tính sinh thái và sinh hoá khác của các chủng đều tương đồng với chủng chuẩn tương ứng khi sử dụng KIT API 20E (Bảng 4). Kết quả giám định PCR cho thấy 3 chủng phân lập từ tôm có nhiễm bệnh hoại tử gan tụy cấp dương tính với đoạn gene xác định loài *V. parahaemolyticus*, 3 chủng phân lập từ tôm có biểu hiện bệnh phát sáng và 3 chủng phân lập từ tôm có biểu hiện của hội chứng phân trắng, dương tính với đoạn gene xác định loài *V. harveyi* và loài *V. alginolyticus*. Vị trí xuất hiện vạch của các chủng đều tương đồng với các chủng chuẩn tương ứng (Hình 2).



Ghi chú: A: Vi khuẩn phân lập từ tôm có biểu hiện bệnh hoại tử gan tụy cấp; B: Vi khuẩn phân lập từ tôm có hội chứng phân trắng; C: Vi khuẩn phân lập từ tôm có biểu hiện phát sáng.

Hình 1. Hình thái khuẩn lạc vi khuẩn thuần phân lập từ các mẫu tôm bệnh phát triển trên thạch ChromAgar Vibrio



Ghi chú: M: Marker; Giếng 1-3: 03 chủng vi khuẩn *V. alginolyticus*; giếng 4-6: 03 chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*; giếng 7-9: 03 chủng *V. harveyi*; N: Đối chứng âm; P: Đối chứng dương tương ứng của các loài vi khuẩn.

Hình 2. Hình ảnh chạy điện di giám định PCR các chủng vi khuẩn *Vibrio* phân lập từ mẫu tôm bệnh

**Bảng 4. Đặc tính hình thái và sinh hoá
của vi khuẩn phân lập từ tôm thẻ chân trắng có biểu hiện bệnh trong nghiên cứu**

Chỉ tiêu	Chủng nghiên cứu <i>V. parahaemolyticus</i> (n = 3)	Chủng đối chứng <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	Chủng nghiên cứu <i>V. alginolyticus</i> (n = 3)	Chủng đối chứng <i>V. alginolyticus</i> ATCC 17750	Chủng nghiên cứu <i>V. harveyi</i> (n = 3)	Chủng đối chứng <i>V. harveyi</i> ATCC 14126
Hình dạng	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn
Nhuộm gram	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Phát triển trên TCBS	Xanh	Xanh	Vàng	Vàng	Xanh	Xanh
Phát triển trên Chrom Agar Vibrio	Tím hoa cà	Tím hoa cà	Trắng	Trắng	Tím nhạt	Tím nhạt
Di động	+	+	+	+	+	+
Oxidase (OX)	+	+	+	+	+	+
Cetalse	+	+	+	+	+	+
L-lysine	+	+	+	+	+	+
D-glucose	+	+	+	+	+	+
Trisodium citrate (CIT)	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-
Voges - Proskauer (VP)	-	-	-	-	-	-
D-manitol (MAN)	+	+	+	+	+	+
Ureaza (URE)	-	-	-	-	-	-
Amygdalin (AMY)	+	+	+	+	+	+
Inositol (INO)	-	-	-	-	-	-
L-rhamnose (RHA)	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: (+): Dương tính; (-): Âm tính.

Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* đã được xác định là tác nhân gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm ở Việt Nam và trên thế giới (Kumar & cs., 2020; Nguyễn Trọng Nghĩa & cs., 2015; Nguyễn Ngọc Phước & cs., 2020; Theethakaew & cs., 2017). Kết quả nghiên cứu cũng tái khẳng định *V. parahaemolyticus* là tác nhân gây bệnh hoại tử gan tụy cấp ở một số vùng nuôi tôm miền Bắc. Các đặc điểm hình thái, sinh hoá của các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* phân lập được trong nghiên cứu này đều tương đồng với các thông tin báo cáo trong các nghiên cứu trước. Bệnh phát sáng do tác nhân *V. harveyi* cũng gây tỷ lệ chết rất cao trên tôm nuôi (Nurhafizah & cs., 2021; Vinay & cs., 2019). Nghiên cứu cũng đã phân lập và định danh thành công tác nhân gây bệnh này với các đặc điểm hình thái, sinh hoá tương đồng với các chủng gây bệnh phát sáng đã được báo cáo. Trong khi đó, *V. alginolyticus* là một trong những tác nhân chính liên quan đến hội chứng phân trắng trên tôm thẻ (Kumar & cs., 2022; Wang & cs., 2020) và cũng đã được xác định là tác nhân gây ra hội chứng này trên tôm nuôi tại Quảng Ninh trong nghiên cứu này.

3.2. Kết quả đánh giá khả năng kháng khuẩn của dịch chiết chùm ngây trên đĩa thạch

Kết quả đánh giá khả năng kháng khuẩn của các loại dịch chiết đối với 3 loài vi khuẩn được tổng hợp trong bảng 5 dựa trên kích cỡ vòng vô khuẩn. Dịch chiết lá chùm ngây tươi tạo ra vòng vô khuẩn trung bình đối với 3 loài vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* lần lượt là 12,8, 13,4 và 13,0mm. So với thang phân chia mức độ kháng khuẩn cho các loại dịch chiết thảo dược mô tả bởi Faikoh & cs. (2014), dịch chiết lá thể hiện mức độ kháng khuẩn “mạnh” đối với cả 3 loài vi khuẩn. Dịch chiết quả chùm ngây tạo ra vòng vô khuẩn trung bình đạt 14,9, 15,7 và 14,7mm lần lượt với 3 loài vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* và *V. harveyi* và đều được đánh giá ở mức kháng khuẩn “mạnh” theo thang phân chia khả năng kháng khuẩn. Trong khi đó,

dầu hạt không tạo ra vòng kháng khuẩn cho cả 3 loài vi khuẩn và kháng sinh Doxycycline tạo ra vòng vô khuẩn từ 16,6mm đến 16,8mm đối với 3 loài vi khuẩn thử nghiệm.

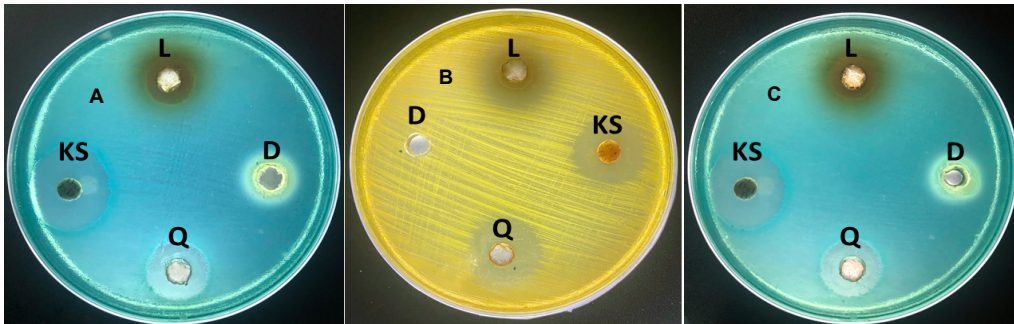
So sánh khả năng tạo vòng vô khuẩn giữa lá, quả non và kháng sinh Doxycycline cho thấy, đối với cả 3 loài vi khuẩn, hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết quả non đều tốt hơn, tạo ra vòng vô khuẩn kích cỡ lớn hơn so với dịch chiết từ lá ($P < 0,05$). Riêng đối với vi khuẩn *V. alginolyticus*, vòng vô khuẩn tạo ra khi sử dụng dịch chiết quả non còn tương đương với vòng vô khuẩn từ kháng sinh Doxycycline (30µg) (Hình 3).

Theo nghiên cứu của Hồng Mộng Huyền & cs. (2018), cao chiết từ lá chùm ngây cho vòng vô khuẩn của *V. harveyi* là 11mm và cho vòng vô khuẩn của *V. parahaemolyticus* là 9mm khi đánh giá trên môi trường Nutrien Agar bổ sung 1,5% muối (Na^+), thấp hơn so với kết quả dịch chiết tươi của lá chùm ngây đã thu được trong nghiên cứu này. Kết quả nghiên cứu này cho thấy dịch chiết quả chùm ngây tươi có khả năng ức chế mạnh nhất vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* và *V. harveyi*. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Hồng Nhi (2020) cho thấy cao chiết từ các bộ phận của cây chùm ngây lại cho vòng vô khuẩn $> 15,3\text{mm}$ với *Vibrio* spp., trên môi trường TSA bổ sung 1,5% muối NaCl - TSA⁺, trong khi Kenconojati & cs. (2023) cho thấy cao chiết chùm ngây có vòng vô khuẩn từ trung bình từ 8,27-22,92mm với *V. harveyi* và *V. parahaemolyticus* trên môi trường TSA bổ sung 3% muối NaCl . Điều đó cho thấy, có thể có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính kháng khuẩn khi sử dụng cao chiết, đặc biệt là hiệu suất chiết của cao chiết và sự tinh khiết sau khi chiết xuất (nếu cao chiết vẫn còn tạp dung môi). Ngoài ra, môi trường nuôi cấy vi khuẩn cũng có thể tác động đến kết quả vòng vô khuẩn khi nghiên cứu về cây chùm ngây đang sử dụng đa dạng môi trường nuôi cấy như Na^+ , TSA⁺ ở các nghiên cứu trước đó và TCBS trong nghiên cứu này. Do vậy, cần đánh giá ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy kích thước vòng vô khuẩn với chùm ngây trong các nghiên cứu tiếp theo.

**Bảng 5. Kết quả đánh giá khả năng diệt khuẩn
của dịch chiết chùm ngây theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch**

Loài vi khuẩn	Đường kính vòng vô khuẩn (mm, TB $\pm$ SE)			
	Hạt (dầu)	Lá	Quả	Doxycycline
<i>V. parahaemolyticus</i>	0	12,8 ^{a**} $\pm$ 0,40	14,9 ^{b**} $\pm$ 0,46	16,8 ^c $\pm$ 0,28
<i>V. alginolyticus</i>	0	13,4 ^{a**} $\pm$ 0,29	15,7 ^{b**} $\pm$ 0,58	16,6 ^b $\pm$ 0,41
<i>V. harveyi</i>	0	13,0 ^{a**} $\pm$ 0,37	14,6 ^{b**} $\pm$ 0,56	16,8 ^c $\pm$ 0,34

Ghi chú: Theo cùng 1 hàng, những giá trị mang các chữ cái khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$); **: Thể hiện khả năng kháng khuẩn ở mức “mạnh” theo mô tả của Faikoh & cs. (2014) và Pratiwi & cs. (2023) cho các loại chiết xuất thảo dược.



Ghi chú: A: *V. parahaemolyticus*; B: *V. alginolyticus*; C: *V. harveyi*; L: Lá; Q: Quả non; D: Dầu hạt; KS: Doxycycline 30 μ g.

Hình 3. Đánh giá khả năng kháng khuẩn của dịch chiết các bộ phận cây chùm ngây bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch TCBS với các loài vi khuẩn khác nhau

Bảng 6. Kết quả xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của dịch chiết lá tươi

Loài vi khuẩn	Chủng	Tỷ lệ pha loãng từ dịch chiết gốc (%)					PBS*
		1:1 (50%)	1:16 (3,13%)	1:32 (1,56%)	1:64 (0,78%)	1:128 (0,39%)	
<i>V. parahaemolyticus</i>	Vp1	-	-	+	+	+	+
	Vp2	-	-	+	+	+	+
	Vp3	-	-	+	+	+	+
<i>V. alginolyticus</i>	Va1	-	-	-	-	+	+
	Va2	-	-	-	-	+	+
	Va3	-	-	-	-	+	+
<i>V. harveyi</i>	Vh1	-	-	-	-	+	+
	Vh2	-	-	-	-	+	+
	Vh3	-	-	-	-	+	+

Ghi chú: +: Vi khuẩn phát triển; -: Vi khuẩn không phát triển; PBS*: PBS có bổ sung 1% muối; Vp1-Vp3: 3 chủng *V. parahaemolyticus*; Va1-Va3: 3 chủng *V. alginolyticus*; Vh1-Vh3: 3 chủng *V. harveyi*.

3.3. Kết quả xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC)

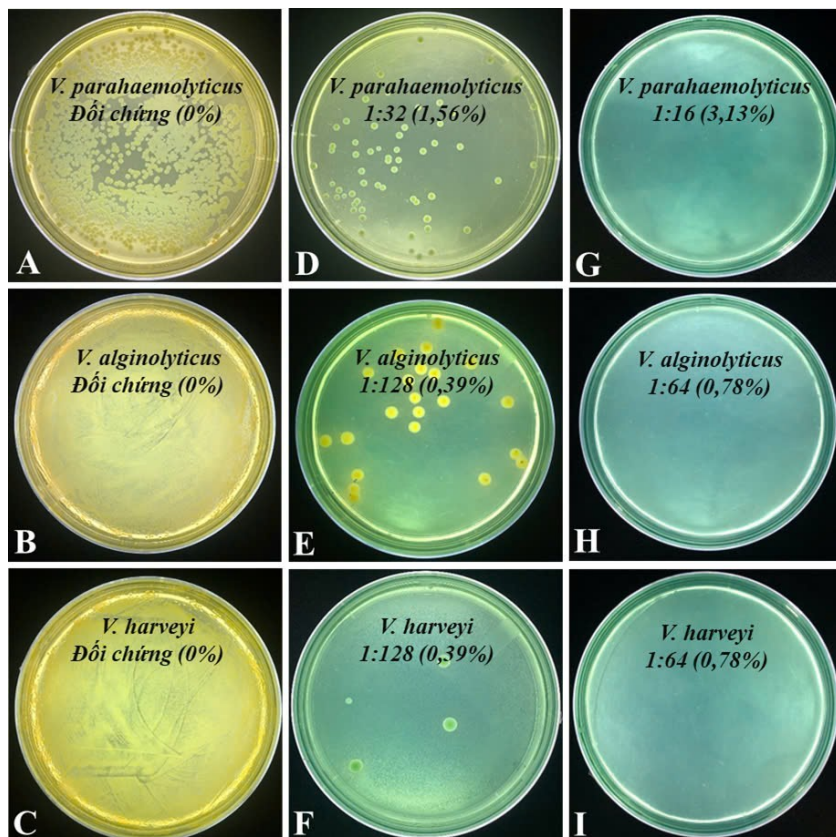
Dựa trên kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn, dịch chiết lá tươi và quả non

được sử dụng để xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu. Đối với dịch chiết lá tươi, có sự khác nhau về nồng độ diệt khuẩn tối thiểu đối với từng loài vi khuẩn, tuy nhiên trong cùng một loài vi khuẩn, giá trị này đồng nhất giữa các

Khả năng kháng khuẩn của dịch chiết ép tươi lá, quả và hạt chùm ngây đối với *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* và *Vibrio harveyi* gây bệnh trên tôm thẻ chân trắng

chúng (Bảng 6, Hình 4). Để diệt hoàn toàn vi khuẩn *V. parahaemolyticus* cần tỷ lệ pha loãng 1:16, tương đương với mức 3,13% dịch chiết, trong khi đối với hai loài vi khuẩn

V. alginolyticus và *V. harveyi* đều ở mức pha loãng 1:64 (0,78% dịch chiết). Trong khi đó, tất cả các ống đối chứng âm (PBS) đều có vi khuẩn phát triển tốt.



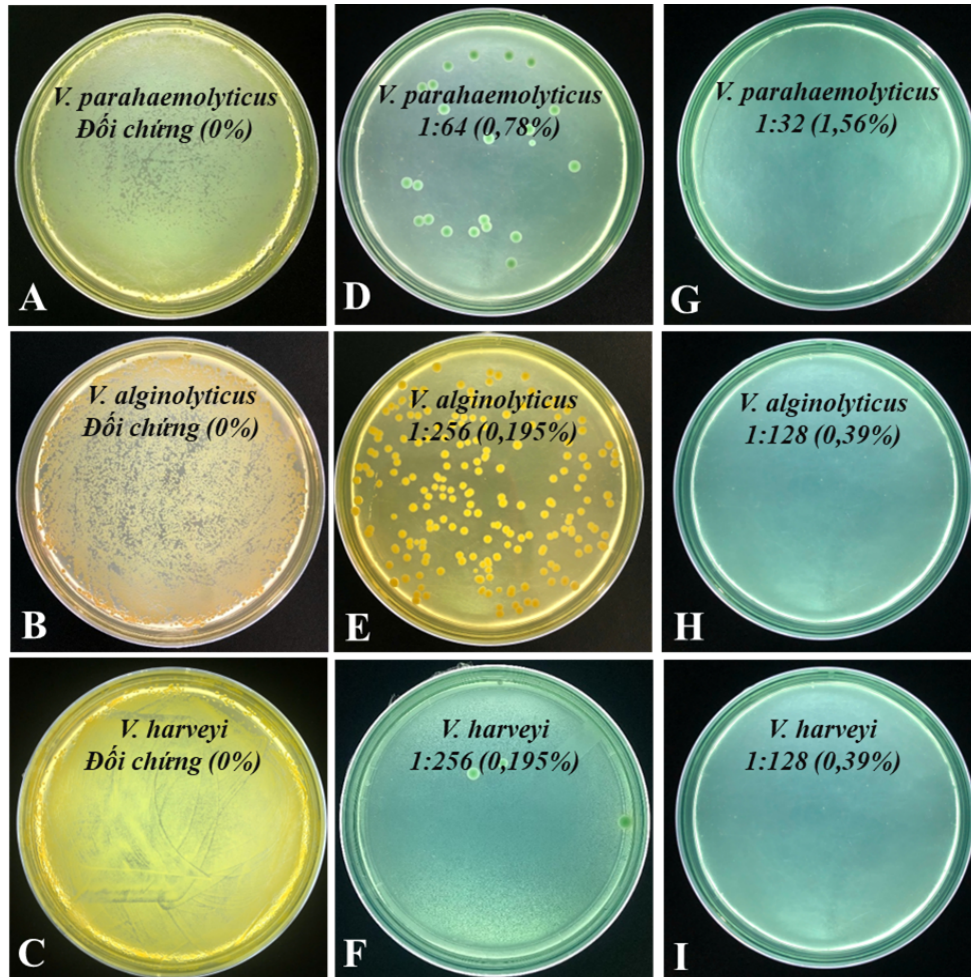
Ghi chú: Lô đối chứng không bổ sung dịch chiết (A, B, C), dịch chiết pha đến nồng độ vi khuẩn còn phát triển (D, E, F), nồng độ bổ sung dịch chiết vi khuẩn không phát triển (G, H, I).

Hình 4. Hình ảnh thử MBC dịch chiết lá tươi đối với các loài vi khuẩn trong nghiên cứu

Bảng 7. Kết quả xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của dịch chiết quả non

Loài vi khuẩn	Chủng	Tỷ lệ pha loãng từ dịch chiết gốc (%)					PBS*
		1:1 (50%)	1:32 (1,56%)	1:64 (0,78%)	1:128 (0,39%)	1:256 (0,195%)	
<i>V. parahaemolyticus</i>	Vp1	-	-	+	+	+	+
	Vp2	-	-	+	+	+	+
	Vp3	-	-	+	+	+	+
<i>V. alginolyticus</i>	Va1	-	-	-	-	+	+
	Va2	-	-	-	-	+	+
	Va3	-	-	-	-	+	+
<i>V. harveyi</i>	Vh1	-	-	-	-	+	+
	Vh2	-	-	-	-	+	+
	Vh3	-	-	-	-	+	+

Ghi chú: +: Vi khuẩn phát triển; -: Vi khuẩn không phát triển;



Ghi chú: Lô đối chứng không bổ sung dịch chiết (A, B, C), dịch chiết pha loãng đến nồng độ vi khuẩn có thể phát triển (D,E,F), nồng độ bổ sung dịch chiết vi khuẩn không phát triển (G, H, I).

Hình 5. Hình ảnh thử MBC dịch chiết quả non đối với các loài vi khuẩn trong nghiên cứu

Dịch chiết quả non cũng thể hiện sự khác nhau giữa về khả năng ức chế đối với các loài vi khuẩn khác nhau, nhưng không có sự khác biệt giữa các chủng trong cùng một loài vi khuẩn (Bảng 7, Hình 5). Để diệt hoàn toàn vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, dịch chiết quả non cần có nồng độ khoảng 1,56%, tương đương mức pha loãng tỷ lệ 1:32. Trong khi đó, khả năng kháng khuẩn của dịch chiết quả thể hiện mạnh hơn đối với hai loài vi khuẩn *V. alginolyticus* và *V. harveyi*, chỉ với nồng độ dịch chiết khoảng 0,39% (mức pha loãng 1:128) đã có thể ức chế hoàn toàn các chủng vi khuẩn. Lô thử nghiệm với PBS không bổ sung dịch chiết, vi khuẩn phát triển rất tốt.

Kamel (2001) cho rằng một số chất chiết xuất từ thực vật có khả năng diệt khuẩn giống như kháng sinh, chúng tác động vào màng tế bào của vi khuẩn và đây có thể là một cơ chế diệt khuẩn quan trọng của các hợp chất tự nhiên có trong thực vật giúp chúng có khả năng kháng lại vi sinh vật gây bệnh trong tự nhiên. Ngoài ra, Kamel (2001) còn cho rằng nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu đối với các chủng vi khuẩn gây bệnh có liên quan đến nồng độ hoạt chất và độ tinh khiết của chiết xuất. Hiện nay chưa có nghiên cứu về nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) từ dịch chiết tươi của các bộ phận chùm ngây vì hầu hết các nghiên cứu đều sử dụng dịch chiết hoặc cao

Khả năng kháng khuẩn của dịch chiết ép tươi lá, quả và hạt chùm ngây đối với *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* và *Vibrio harveyi* gây bệnh trên tôm thẻ chân trắng

chiết để đánh giá khả năng ức chế và diệt khuẩn (Olise & cs., 2021). Kết quả nghiên cứu cho thấy dịch chiết lá và quả chùm ngây tươi có khả năng diệt khuẩn *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* và *V. harveyi* tốt và có thể ứng dụng để phòng trị bệnh do vi khuẩn trên tôm.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã cho thấy dịch chiết chùm ngây (lá tươi và quả tươi) đều có khả năng diệt đồng thời 3 loài vi khuẩn thường gây bệnh cho tôm nuôi (*V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* và *V. harveyi*) với vòng kháng khuẩn từ dịch chiết quả tươi là 15,0-15,7mm, lá tươi là 13,0-13,8mm, trong khi đó, dầu hạt chùm ngây không có khả năng kháng 3 loài vi khuẩn trên. Dịch chiết quả tươi có nồng độ ức chế tối thiểu đối với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* 1,56% và đối với 2 loài *V. alginolyticus* và *V. harveyi* là 0,39% dịch chiết. Trong khi đó, dịch chiết lá tươi đạt nồng độ ức chế tối thiểu ở mức lần lượt là 3,13% (*V. parahaemolyticus*) và 0,78% (*V. alginolyticus* và *V. harveyi*). Với kết quả trên, dịch chiết quả và lá tươi cây chùm ngây cho thấy tiềm năng ứng dụng trong phòng bệnh thường gặp do vi khuẩn *Vibrio* spp. trên tôm thẻ chân trắng.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Học viện Nông nghiệp Việt Nam và Công ty TNHH BioFloc đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện nghiên cứu này (đề tài SVNCKH mã số SV2024-11-81).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abidin Z., Huang H.T., Liao Z.H., Chen B.Y., Wu Y.S., Lin Y.J. & Nan F.H. (2021). *Moringa oleifera* leaves' extract enhances nonspecific immune responses, resistance against *Vibrio alginolyticus*, and growth in whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*). *Animals*. 12(1): 42.

Aminzare M., Hashemi M., Abbasi Z., Mohseni M. & Amiri E. (2018). Vibriosis phytotherapy: A review on the most important world medicinal plants effective on *Vibrio* spp. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 8(01): 170-177.

Bancesi A., Pinto M.M.F., Duarte E., Catarino L. & Nazareth T. (2020). The antimicrobial properties of

Moringa oleifera Lam. for water treatment: a systematic review. *SN Applied Sciences*. 2: 1-9.

Chellapandian H., Sivakamavalli J., Anand A.V. & Balasubramanian B. (2021). Challenges in controlling vibriosis in shrimp farms. *Infections and sepsis development*. 195.

Conejero M. & Hedreyda C. (2003). Isolation of partial *toxR* gene of *Vibrio harveyi* and design of *toxR*-targeted PCR primers for species detection. *Journal of Applied Microbiology*. 95(3): 602-611.

Faikoh E.N., Hong Y.-H. & Hu S.-Y. (2014). Liposome-encapsulated cinnamaldehyde enhances zebrafish (*Danio rerio*) immunity and survival when challenged with *Vibrio vulnificus* and *Streptococcus agalactiae*. *Fish & Shellfish Immunology*. 38(1): 15-24.

FAO (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.

Flores B., Ramírez E., Moncada A., Salinas N., Fischer R., Hernández C., Mora-Sánchez B., Sheleby-Elías J., Jirón W. & Balcázar J.L. (2022). Antimicrobial effect of *Moringa oleifera* seed powder against *Vibrio cholerae* isolated from the rearing water of shrimp (*Penaeus vannamei*) postlarvae. *Letters in Applied Microbiology*. 74(2): 238-246.

Hồng Mộng Huyền, Võ Tấn Huy & Trần Thị Tuyết Hoa (2018). Hoạt tính kháng khuẩn của một số cao chiết thảo dược kháng vi khuẩn gây bệnh ở tôm nuôi. 54(2): 143-150

Kamel C. (2001). Natural plant extracts: Classical remedies bring modern animal production solutions. *Cahiers options méditerranéennes*. 54(3): 31-38.

Kenconoajati H., Ulkhaq M.F., Azhar M.H. & Rukmana N.R. (2023). Vibriocidal Activity of Ethanol Extract of *Moringa* Leaves and Its Effect on the Growth of Pacific White Shrimp. *Jurnal Medik Veterinar*. 6(1).

Kumar R., Ng T.H. & Wang H.C. (2020). Acute hepatopancreatic necrosis disease in penaeid shrimp. *Reviews in Aquaculture*. 12(3): 1867-1880.

Kumar T.S., Makesh M., Alavandi S. & Vijayan K. (2022). Clinical manifestations of White feces syndrome (WFS): and its association with Enterocytozoon hepatopenaei in *Penaeus vannamei* grow-out farms: A pathobiological investigation. *Aquaculture*. 547: 737463.

Kumara K.R.P.S., & Hettiarachchi M.H. (2017). White faeces syndrome caused by *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio fluvialis* in shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius 1798) - multimodal strategy to control the syndrome in Sri Lankan grow-out ponds. *Asian Fish Sci*. 30(4): 245-261.

Nguyễn Thị Hồng Nhi (2020). Hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết chùm ngây kháng vi khuẩn *Vibrio*

- spp. gây bệnh trên tôm thẻ chân trắng trong điều kiện *in vitro*. Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam. 5(144): 77-81.
- Nguyễn Linh Nhân & Nguyễn Thị Thu Hương (2015). Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa và kháng viêm của cao chiết từ hạt chùm ngây (*Moringa oleifera* lamk.). Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh. 9(15): 175-181.
- Nguyễn Ngọc Phước, Nguyễn Thị Xuân Hồng & Nguyễn Công Chung (2020). Nghiên cứu độc lực của một số chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) trên tôm chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) nuôi tại Thừa Thiên Huế. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 18(3): 202-211
- Nguyễn Trọng Nghĩa, Đặng Thị Hoàng Oanh, Trương Quốc Phú & Phạm Anh Tuấn (2015). Phân lập và xác định khả năng gây hoại tử gan tụy của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* phân lập từ tôm nuôi ở Bạc Liêu. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. (39): 99-107.
- Nurhafizah W.W.I., Lee K.L., Nadirah M., Danish-Daniel M., Zainathan S.C. & Najiah M. (2021). Virulence properties and pathogenicity of multidrug-resistant *Vibrio harveyi* associated with luminescent vibriosis in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. Journal of Invertebrate Pathology. 186: 107594.
- Olise N.A., Urama E.U., Odeyemi O., Oshim I.O. & Obroh A.A. (2021). Demonstration of the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of both *Moringa oleifera* and *Gongronema latifolium* extracts mixture against *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*. Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences. 23(1): 46-52.
- Pérez-Sánchez T., Mora-Sánchez B. & Balcázar J.L. (2018). Biological approaches for disease control in aquaculture: advantages, limitations and challenges. Trends in microbiology. 26(11): 896-903.
- Piamsomboon P. & Han J.E. (2022). White feces syndrome, a multifactorial syndrome of cultured shrimp: a mini review. Fishes. 7(6): 339.
- Pratiwi R.D., Kuswandari S. & Utomo R.B. (2023). Antibacterial effect of ethanol extract of moringa oleifera seeds against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Odonto: Dental Journal. 10(2): 180-187.
- Suhartono S., Ismail Y.S., Muhayya S.R. & Husnah M. (2019). Ethanolic extracts of *Moringa oleifera* leaves inhibit biofilm formation of *Vibrio alginolyticus in vitro*. Earth and Environmental Science. 348(1): 012018.
- Theethakaew C., Nakamura S., Motooka D., Matsuda S., Kodama T., Chonsin K., Suthienkul O. & Iida T. (2017). Plasmid dynamics in *Vibrio parahaemolyticus* strains related to shrimp Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS). Infection, Genetics and Evolution. 51: 211-218.
- Tinwongger S., Proespraiwong P., Thawonsuwan J., Sriwanayos P., Kongkumnerd J., Chaweepack T., Mavichak R., Unajak S., Nozaki R. & Kondo H. (2014). Development of PCR diagnosis for shrimp Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) strain of *Vibrio parahaemolyticus*. Fish Pathology. 49(4): 159-164.
- Vinay T.N., Ray A.K., Avunje S., Thangaraj S.K., Krishnappa H., Viswanathan B., Reddy M.A., Vijayan K.K. & Patil P.K. (2019). *Vibrio harveyi* biofilm as immunostimulant candidate for high-health pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* farming. Fish & Shellfish Immunology. 95: 498-505.
- Wang H., Wan X., Xie G., Dong X., Wang X. & Huang J. (2020). Insights into the histopathology and microbiome of Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, suffering from white feces syndrome. Aquaculture. 527: 735447.
- Zhou S., Hou Z., Li N. & Qin Q. (2007). Development of a SYBR Green I real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio alginolyticus* in seawater and seafood. Journal of Applied Microbiology. 103(5): 1897-1906.