

**Bài báo nghiên cứu**

**KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA DỊCH CHIẾT TỎI**  
**(*Allium sativum*) VÀ KINH GIỚI (*Elsholtzia ciliata*)**  
**LÊN VI KHUẨN *Edwardsiella ictaluri* GÂY BỆNH TRÊN CÁ TRA**  
**(*Pangasianodon hypophthalmus*)**

**Trần Thị Phương Dung<sup>1\*</sup>, Lưu Tăng Phúc Khang<sup>1</sup>,**

**Huỳnh Thị Trúc Quân<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Trúc Quyên<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Nông Lâm, Việt Nam

<sup>3</sup>Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn tỉnh Đồng Nai, Việt Nam

\*Tác giả liên hệ: Trần Thị Phương Dung – Email: [dungtp@hcmue.edu.vn](mailto:dungtp@hcmue.edu.vn)

Ngày nhận bài: 03-3-2022; ngày nhận bài sửa: 18-6-2022; ngày duyệt đăng: 22-6-2022

## TÓM TẮT

Nghiên cứu đánh giá khả năng ức chế tăng trưởng của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* phân lập được trên cá tra của dịch chiết có nguồn gốc từ tỏi và kinh giới. Tỏi và kinh giới sau khi xử lý nhiệt được nghiền nát và pha trong dung môi ethanol 70%, methanol 70%, acetone 70%, nước cất, lọc và cô quay chân không tạo được các dịch chiết có nồng độ 100 mg/mL. Kết quả cho thấy, dịch chiết tỏi có khả năng kháng khuẩn cao hơn dịch chiết kinh giới. Trong đó, dịch chiết tỏi, dịch chiết từ dung môi ethanol 70% cho hiệu quả kháng *Edwardsiella ictaluri* cao nhất với vòng kính vòng vô khuẩn lần lượt là  $2,17 \pm 0,61$  mm và giá trị tỉ lệ MBC/MIC là 3,9. Dịch chiết tỏi từ dung môi methanol 70% và dịch chiết kinh giới trong dung môi ethanol 70% cũng có khả năng kháng khuẩn và có tiềm năng sử dụng trong phòng trị bệnh do *Edwardsiella ictaluri* gây ra trên cá tra.

**Từ khóa:** hoạt tính kháng khuẩn; *Edwardsiella ictaluri*; dịch chiết; cá tra

## 1. Mở đầu

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là một trong những đối tượng có giá trị kinh tế cao được nuôi phổ biến ở đồng bằng sông Cửu Long (Phan et al., 2009). Theo báo cáo của Hiệp hội Chế biến và Xuất khẩu Thủy sản Việt Nam, năm 2020 sản lượng nuôi cá tra đạt 1,56 triệu tấn và giá trị xuất khẩu đạt 1,54 tỉ USD (VASEP, 2021). Sản xuất cá tra hiện nay đang phải đối mặt với nhiều khó khăn như việc thâm canh hóa làm cho dịch bệnh bùng phát mạnh (Tu et al., 2010; Le & Cheong, 2010). Vào cuối năm 1998, bệnh gan thận mũ trên

---

*Cite this article as:* Tran Thi Phuong Dung, Luu Tang Phuc Khang, Huynh Thi Truc Quan, & Nguyen Thi Truc Quyen (2022). Antimicrobial activity of extracts of garlic (*Allium sativum*) and marjoram (*Elsholtzia ciliata*) against *Edwardsiella ictaluri* causing disease in catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 19(9), 1472-1484.

cá tra được ghi nhận xuất hiện lần đầu tiên tại các tỉnh An Giang, Đồng Tháp và Cần Thơ ở cá tra, sau đó bệnh lan dần đến các vùng có nuôi cá lân cận (Ferguson et al., 2001), tác nhân là do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* (Crumlish et al., 2002). Hiện nay, bệnh gan thận mũ là một trong những bệnh phổ biến trên cá tra (Tran et al., 2021). Bệnh xuất hiện trên mọi giai đoạn ương, nuôi nhưng nhiều nhất trên cá dưới 4 tháng tuổi, đặc biệt giai đoạn cá hương 21-30 ngày tuổi, cá giống 40-90 ngày tuổi với tỉ lệ cá nhiễm bệnh lần lượt là 46% và 30% (Tran et al., 2021), theo sự tăng dần về mật khối lượng tỉ lệ cá mắc bệnh gan thận mũ giảm dần và không thấy cá bệnh ở giai đoạn đạt khối lượng trên 900 g (Ly, 2009). Để hạn chế dịch bệnh do vi khuẩn gây ra trên cá tra những hộ nuôi cá có xu hướng sử dụng các loại kháng sinh hoặc các loại hóa chất đặc trị. Luu và cộng sự (2021) cho thấy, ở các trang trại cá tại Việt Nam, có 23 loại thuốc kháng sinh và hóa chất khác nhau (thuộc 11 nhóm) được sử dụng, mỗi hộ nuôi cá tra sử dụng ít nhất 17 loại thuốc và hóa chất nhằm diệt khuẩn, quản lí chất lượng nước và phòng trị bệnh. Tuy nhiên, việc sử dụng quá nhiều hóa chất và kháng sinh đang được khuyến cáo cần phải giảm bớt do một số nguyên nhân như có thể dẫn đến hiện tượng đa kháng thuốc của các loài vi khuẩn (Tu et al., 2010), suy thoái môi trường, tồn dư thuốc kháng sinh trong sản phẩm thủy sản ảnh hưởng không tốt tới sức khỏe con người (Aoki, 1988; Sarter et al., 2007). Do đó, việc tìm ra giải pháp thay thế sử dụng kháng sinh là nhu cầu tất yếu.

Trong thời gian gần đây, sử dụng thảo dược trong phòng trị bệnh đặc biệt là những bệnh nhiễm khuẩn đang ngày càng trở nên phổ biến, vì có nhiều ưu điểm như nguyên liệu dễ tìm kiếm, giá thành thấp, chứa nhiều chất có hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng stress (Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2009; Chakraborty & Hancz, 2013). Trong đó, tỏi (*Allium sativum*) là một thảo dược có chứa hoạt chất kháng sinh tự nhiên rất mạnh (allicin) và các hợp chất có nhiều tác dụng sinh học khác (các hợp chất sulphur và polyphenol) (Vu, 1993; Bui & Nguyen, 2009; Rahman et al., 2012; Gull et al., 2012) nên được sử dụng rộng rãi trong thú y (Do, 1999; Bui & Nguyen, 2009). Bui & Le (2006) đã phối hợp chất chiết từ tỏi và sài đất (*Weledia calendulacea*) để tăng cường hệ miễn dịch cho cá tra chống lại vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* gây bệnh xuất huyết. Ngoài ra, kinh giới (*Elsholtzia ciliata*) cũng là thảo dược có vai trò kháng khuẩn do chứa các hợp chất phenolic, chẳng hạn như flavonoid (Dorman & Deans, 2000) và caryophyllene, 8,13-epoxy-androst-14-en-3-one, p-menth-1-en-4-ol (Janssen et al., 1987; Dongsa et al., 1992). Vì vậy, nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định khả năng kháng khuẩn của dịch chiết tỏi và kinh giới đối với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* giúp định hướng trong ứng dụng thảo dược nhằm phòng và trị bệnh trên cá tra.

## 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

#### 2.1.1. Thảo dược

Hai loại thảo dược gồm tỏi và kinh giới được thu hái ở các vườn giống ở huyện Cần Giò, Thành phố Hồ Chí Minh (Bảng 1).

**Bảng 1.** Các loại thảo dược trong nghiên cứu và nguồn gốc

STT	Loại thảo dược	Tên khoa học	Bộ phận sử dụng tạo dịch chiết	Trạng thái	Nguồn gốc
1	Tỏi	<i>Allium sativum</i>	Toàn củ	Tươi	Huyện Cần Giò, TPHCM
2	Kinh giới	<i>Elsholtzia ciliata</i>	Lá cây	Tươi	Huyện Cần Giò, TPHCM

### 2.1.2. Vi khuẩn

Chủng vi khuẩn dùng cho thí nghiệm thử nghiệm khả năng kháng khuẩn của dịch chiết thảo dược là *Edwardsiella ictaluri* Gly09M phân lập từ cá tra bệnh gan thận mũ nuôi tại tỉnh An Giang năm 2009. Chủng vi khuẩn được cấy chuyển và công cường độc, tái phân lập định kì 01 lần/năm tại Trung tâm Quan trắc môi trường và bệnh thủy sản Nam Bộ (Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II).

### 2.1.3. Phương pháp định danh lại vi khuẩn

Các phương pháp định danh lại vi khuẩn trước khi sử dụng cho thí nghiệm theo Lê Hữu Phước (2013) gồm: (1) vi khuẩn được phục hồi trên môi trường thạch máu cừu ở trong tủ ẩm 48 giờ ở 28°C và quan sát khuẩn lạc; (2) các đặc điểm về sinh-hoá của vi khuẩn được xác định bằng cách kiểm tra các chỉ tiêu cơ bản qua sử dụng bộ kit API 20E (MicrobankTM, PRO-LAB Diagnostics, UK) theo khóa phân loại Bergey (1996); (3) phương pháp PCR (Polymerase chain reaction) xác định *E. ictaluri* theo Yeh và cộng sự (2005) sử dụng cặp mồi ngoài F3 (5' – TAA GAC TCC AGC CCT CGG – 3') và B3 (5' – TTC CCT CGC TGG AAG TGG – 3'). Phản ứng PCR thực hiện trong 50 µl hỗn hợp phản ứng gồm: 1X PCR master mix (Promega), 1 µM mồi F3 và B3 mỗi loại, và 2 µl DNA mạch khuôn. Phản ứng luân nhiệt như gồm 1 chu kì 95°C trong 5 phút; 30 chu kì 95°C trong 30 giây, 52°C trong 30 giây và 72°C trong 45 giây; 1 chu kì 72°C kéo dài 10 phút, giữ ở 4°C. Sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel 1,5% agarose bổ sung ethidium bromide (0,5 mg/L) kèm thang chuẩn DNA 100bp (Invitrogen).

### 2.1.4. Phương pháp tạo dịch chiết thảo dược với các dung môi khác nhau

Thảo dược (củ tỏi và lá kinh giới) được tạo dịch chiết bằng phương pháp chiết ngâm (Vongsak et al., 2013): (1) thảo dược tươi được sơ chế, sau đó được xắt nhỏ, sấy bằng thiết bị sấy cho đến khi độ ẩm đạt <10%, nghiền bằng máy xay gia dụng cho đến khi thành dạng bột mịn; (2) 4g bột thảo dược được ngâm với 250 mL ethanol 70% (VNChemsol, Việt Nam), methanol 70%, acetone 70%, nước cất trong erlen dung tích 500 mL trong 72 giờ ở điều kiện 28°C, khuấy đều 2-3 lần/ngày; (3) hỗn hợp ngâm sau đó được lọc 2 lần qua giấy lọc Φ 2,5 µm cô quay chân không ở 48°C để loại bỏ dung môi.

### 2.2.3. Đánh giá in vitro hoạt tính kháng khuẩn *Edwardsiella ictaluri* của các loại dịch chiết

- *Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch*

Nghiên cứu sử dụng phương pháp khuếch tán đĩa thạch để khảo sát tính kháng khuẩn của các dịch chiết thảo dược đối với các chủng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*. Đường kính vòng vô khuẩn của thảo dược ở các nồng độ trên vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* được so sánh với nghiệm thức Doxycycline và nước cất vô trùng để đánh giá hoạt tính của thảo dược (CLSI M100, 2017). Thí nghiệm khảo sát *in vitro* hoạt tính kháng *Edwardsiella ictaluri* của thảo dược gồm 10 nghiệm thức mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, đối chứng dương là Doxycycline, đối chứng âm là nước cất vô trùng, và 8 nghiệm thức còn lại là dịch chiết kinh giới và tỏi trong các dung môi ethanol 70%, methanol 70%, acetone 70%, nước cất vô trùng.

(1) Chuẩn bị vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* được cấy hoạt hóa từ ống giống trên môi trường BA bổ sung 5% máu cừu và ủ ở tủ cấy tĩnh 28°C trong thời gian 48 giờ. Lấy một khuẩn lạc cho vào môi trường BHIB tiếp tục tăng sinh trong 48 giờ tiếp theo và tiến hành pha loãng dung dịch vi khuẩn trong nước muối sinh lý 0,9% để mật độ dung dịch vi khuẩn đạt  $10^5$  CFU/mL; (2) Dịch chiết thảo dược trong các dung môi khác nhau được pha loãng 100 mg/mL trong DMSO và bảo quản ở tủ 4°C, Doxycycline được pha loãng tới nồng độ 10 mg/mL trong nước vô khuẩn dùng làm đối chứng dương cho thí nghiệm; (3) Trải dịch vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* đã chuẩn lên đĩa môi trường BHIA chờ 15 phút để khô; (4) Đục 4 giếng trên mỗi đĩa thạch bằng dụng cụ đục lỗ tiệt trùng và cho 100  $\mu$ L dung dịch thảo dược và mỗi giếng; (5) Đĩa được ủ ở điều kiện nhiệt độ 28°C trong 48 giờ và đọc kết quả bằng cách đo đường kính lớn nhất của vòng vô khuẩn.

- *Phương pháp xác định giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC, Minimum Inhibitory Concentration) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC, Minimum Bactericidal Concentration) của các loại dịch chiết*

(1) Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC): được thực hiện trên đĩa 96 giếng (Luong et al., 2016). Môi trường BHIB được bổ sung 100  $\mu$ L vào giếng trên đĩa 96 giếng bằng pipette 8 kênh. Mỗi loại dịch thảo dược/Doxycycline/nước cất vô trùng được thêm 100  $\mu$ L mỗi loại vào mỗi giếng khác nhau. Pha loãng bậc 2 các giếng bằng cách trộn đều và chuyển 100  $\mu$ L hỗn hợp sang cột bên cạnh. Quy trình được lặp lại cho đến giếng thứ mười của hàng, 100  $\mu$ L của dịch sau khi trộn ở giếng cuối cùng được hút bỏ. Dịch vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* được bổ sung 100  $\mu$ L vào các giếng, sau đó bổ sung 40  $\mu$ L thuốc thử Resazurin 0,01%, ủ trong điều kiện nhiệt độ 28°C từ 16 đến 18 giờ. Quan sát sự đổi màu của thuốc thử và ghi nhận giá trị MIC. Thuốc thử resazurin có màu xanh dương trong dung dịch, các giếng có sự tăng trưởng của vi khuẩn sẽ làm đổi màu của dung dịch resazurin từ màu xanh sang màu hồng. Giá trị MIC đối với mỗi loại cao chiết thảo dược là nồng độ thảo dược thấp nhất tại đó vi khuẩn không phát triển (không làm đổi màu resazurin).

(2) Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) được xác định bằng phương pháp trải đĩa thạch (OonmettaAree et al., 2006). Lấy 100  $\mu$ L mẫu ở các giếng không làm đổi màu thuốc thử sẽ được trải trên BHIA sau đó tiếp tục ủ ở điều kiện nhiệt độ 28°C. Sự xuất hiện hay

không của vi khuẩn trên đĩa thạch được quan sát để xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của thảo dược.

Xác định khả năng diệt khuẩn của dịch chiết thảo dược qua tỉ lệ MBC/MIC theo phương pháp của Canillac và Mourey (2001): (1) tỉ lệ MBC/MIC nhỏ hơn hoặc bằng 4, chiết xuất được xem là có khả năng diệt khuẩn; (2) tỉ lệ này lớn hơn 4, thì có tác dụng kìm khuẩn.

#### 2.2.4. Phương pháp xử lí số liệu

Tất cả số liệu của đề tài được xử lí theo các thuật toán xác suất thống kê bằng phần mềm SPSS 20.0. Mức ý nghĩa được sử dụng để kiểm định sai khác có ý nghĩa giữa các nghiệm thức là 0,05 ( $p < 0,05$  thì sự sai khác có ý nghĩa thống kê) thông qua phân tích phương sai một yếu tố (ONEWAY ANOVA).

### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Kết quả tái định danh vi khuẩn

Kết quả kiểm tra các đặc điểm về hình thái của chủng vi khuẩn *E. ictaluri* Gly09M trước khi sử dụng cho thí nghiệm như sau: (i) vi khuẩn gây tan huyết trên môi trường thạch máu cừu phát triển thành khuẩn lạc có màu trắng đục, nhỏ li ti (đường kính thường <1,0 mm), khuẩn lạc sẽ phát triển rõ hơn, có màu trắng hơi trong, lồi và tròn với đường kính là 0,5 - 2 mm sau 48 giờ ủ ở 28°C (Hình 1A); (ii) Đặc điểm sinh hóa: vi khuẩn *E. ictaluri* cho phản ứng đường hầu hết là âm tính, arabinose cho kết quả dương tính nhẹ, phản ứng dương tính với Lysine, âm tính với Arginine (Hình 1B và Bảng 2); (iii) khi được kiểm tra bằng kĩ thuật PCR, nghiên cứu đã khuếch đại đoạn trình tự 234 bp của đoạn gen *eip18* của vi khuẩn *E. ictaluri* (Hình 1C). Kết quả xác định chủng vi khuẩn trong nghiên cứu là vi khuẩn *E. ictaluri* Gly09M tương tự với kết quả định danh từ nghiên cứu của Le (2013).



**Hình 1.** Các đặc điểm hình thái, sinh lí và sinh hóa của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* chủng Gly09M

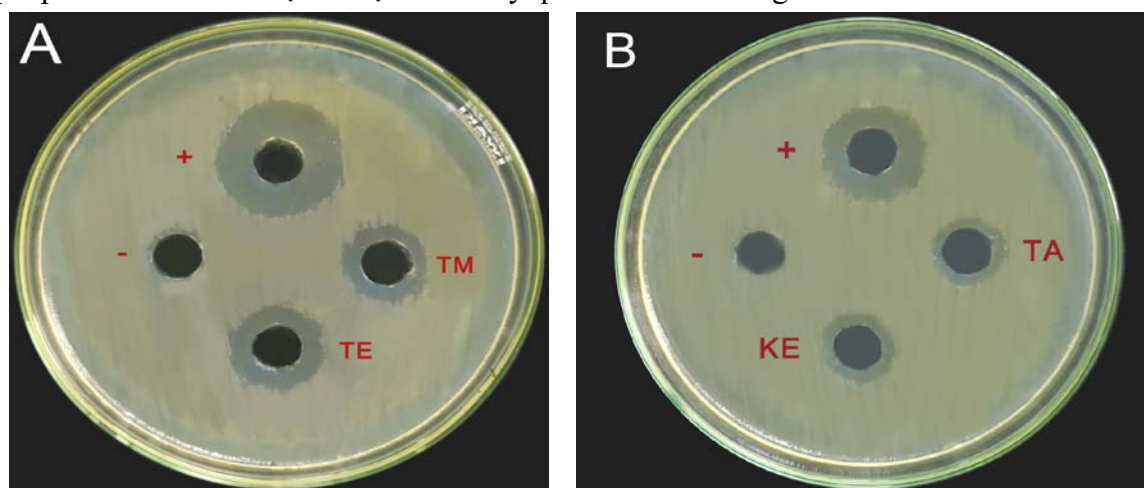
A. Khuẩn lạc vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* phát triển trên môi trường thạch máu cừu trong vòng 48 giờ. B. Kết quả định danh vi khuẩn bằng bộ kit API 20E. C. Kết quả định danh vi khuẩn bằng kĩ thuật PCR

**Bảng 2. Kết quả kiểm tra sinh hóa chủng vi khuẩn *E. ictaluri***

Phản ứng	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	VP	GEL	GLU	MAN
Kết quả	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-
Phản ứng	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NIT	O/F	LAC	NO <sub>3</sub>	ESCULIN
Kết quả	-	-	-	-	+	-	+	+	+/+	+	+	+

**3.2. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch**

Dịch chiết thảo dược tỏi và kinh giới trong các dung môi khác nhau được sử dụng để xác định hoạt tính kháng khuẩn với chủng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan thận mủ trên cá tra. Kết quả xác định hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết thảo dược bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch được trình bày qua Hình 2 và Bảng 3.



**Hình 2.** Vòng vô khuẩn của dịch chiết chiết xuất thảo dược trong các dung môi (kết quả đại diện): TE: tỏi + ethanol 70%; TM: tỏi trong methanol 70%;

+: đối chứng dương: Doxycycline; -: đối chứng âm: nước vô khuẩn (Hình A);

TA: tỏi trong acetone 70%; KE: kinh giới + ethanol 70%;

+: đối chứng dương: Doxycycline; -: đối chứng âm: nước vô khuẩn (Hình B)

Kết quả cho thấy, các loại dịch chiết từ tỏi đều có khả năng ức chế phát triển của *Edwardsiella ictaluri* như dịch chiết trong các dung môi ethanol 70%, acetone 70%, methanol 70%, nước cất (Hình 2) với đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là  $2,17 \pm 0,61$  mm,  $1,76 \pm 0,06$  mm,  $2,17 \pm 0,32$  mm và  $2,10 \pm 0,1$  mm, cao nhất là dịch chiết trong dung môi methanol 70% và ethanol 70%, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức của dịch chiết tỏi ( $p > 0,05$ ) (Bảng 3). Kết quả nghiên cứu tương đồng với nghiên cứu của Corzo-Martinez và cộng sự (2007) cho thấy tỏi có khả năng kháng vi khuẩn, nấm trên cá do chứa các hợp chất lưu huỳnh chẳng hạn như allin, diallylsulphydes và allicin. Tuy

nhiên, dịch chiết tỏi trong nghiên cứu có khả năng kháng khuẩn thấp hơn các nghiên cứu của Nguyen và cộng sự (2016) cho thấy khả năng kháng *Aeromonas hydrophila* gây bệnh lở loét trên cá lóc đen (*Channa striata* Bloch, 1793) của dịch ép tỏi cô đặc với đường kính vòng vô khuẩn cao (25,97 mm). Theo Nguyen và Dang (2016), cũng cho thấy, cao khô tỏi ở nồng độ thử nghiệm là 30 µg/µL có khả năng diệt khuẩn cao với 2 chủng vi khuẩn gây bệnh trên cá trắm cỏ với đường kính vòng vô khuẩn trung bình lần lượt là 18,33 ± 1,57 mm và 18,33 ± 1,53 mm. Dịch ép tỏi trong nghiên cứu này có mức độ kháng khuẩn yếu hơn so với những công trình đã nghiên cứu do nồng độ của các thành phần dịch chiết pha loãng hơn các nghiên cứu trước đây nhưng dịch chiết vẫn thể hiện được khả năng kháng khuẩn thông qua việc hình thành được vòng vô khuẩn trên đĩa thạch tại Hình 2.

**Bảng 3.** Bảng tổng hợp kết quả khảo sát in vitro hoạt của tỏi và kinh giới trong các dung môi khác nhau bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch

Loại dịch chiết/ dung môi	Đường kính vòng vô khuẩn <i>Edwardsiella ictaluri</i> (d, mm)					
	Methanol 70%	Ethanol 70%	Acetone 70%	Nước cất <sup>1</sup>	Doxycycline <sup>2</sup>	Nước vô khuẩn <sup>3</sup>
Tỏi (100 mg/mL)	2,17 ± 0,32 <sup>by</sup>	2,17 ± 0,61 <sup>by</sup>	1,76 ± 0,06 <sup>by</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>ax</sup>	4,20 ± 0,25 <sup>cx</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>ax</sup>
Kinh giới (100 mg/mL)	0,00 ± 0,00 <sup>ax</sup>	1,06 ± 0,12 <sup>bx</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>ax</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>ax</sup>	4,20 ± 0,25 <sup>cx</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>ax</sup>

<sup>1</sup>: dung môi để tạo dịch chiết là nước cất; <sup>2</sup>: đối chứng dương; <sup>3</sup>: đối chứng âm; \*a, b: sự khác biệt của các nghiệm thức theo hàng; x, y: sự khác biệt của các nghiệm thức theo cột ở mức ý nghĩa p=0,05

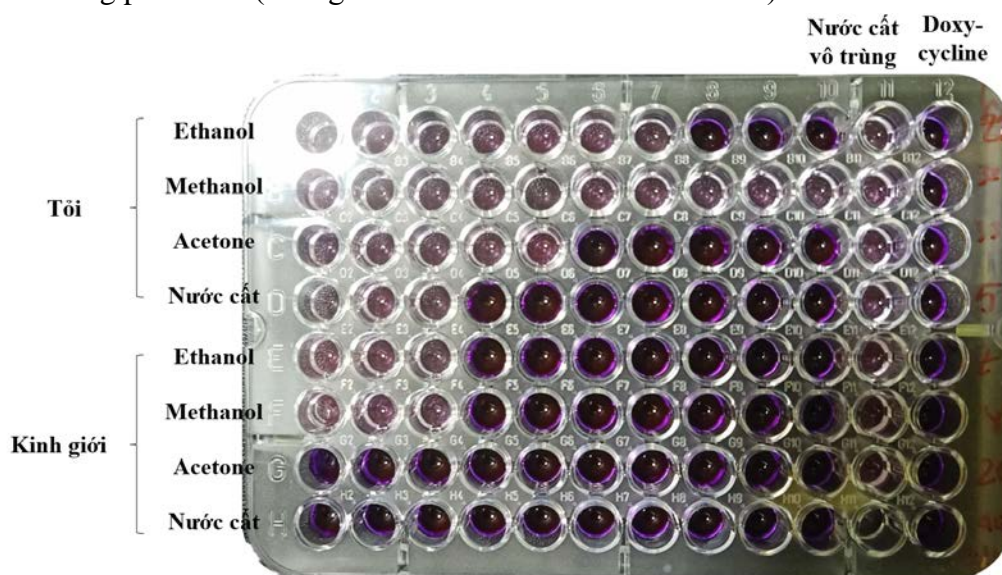
Trong các dịch chiết từ kinh giới với các loại dung môi chỉ có trong dung môi ethanol 70% cho thấy khả năng kháng khuẩn với đường kính vòng vô khuẩn 1,06 ± 0,12 mm và không thể hiện tính kháng khuẩn đối dịch chiết chiết xuất từ acetone 70%, methanol 70% và nước cất vô trùng. Các nghiên cứu khác cũng chỉ ra các chất loliolide có trong thành phần của kinh giới có hoạt tính kháng khuẩn tùy thuộc từng loại vi khuẩn, cụ thể khả năng kháng lại các chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* và *Neisseria gonorrhoeae* nhưng không thể hiện hoạt tính kháng một số vi khuẩn khác như *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus fermentum*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* (Dang & Le, 2017). Trong nghiên cứu này cho thấy, dịch chiết từ kinh giới với dung môi ethanol 70% có khả năng kháng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan thận mũ trên cá tra.

Đường kính vô khuẩn của các hai loại dịch chiết thảo dược thấp hơn khi sử dụng kháng sinh Doxycycline (đường kính vòng vô khuẩn của kháng sinh lớn khoảng 2 lần so với đường kính vòng vô khuẩn từ dịch chiết tỏi được chiết xuất trong các dung môi (acetone 70%, ethanol 70%, methanol 70%, nước cất) và khoảng 4 lần so với đường kính vòng vô khuẩn của dịch chiết kinh giới chiết xuất trong dung môi ethanol 70%. Kết quả này tương tự với

những nghiên cứu khác cho thấy kháng sinh vẫn có khả năng kháng khuẩn cao hơn các loại thảo dược tự nhiên, chẳng hạn như khả năng kháng khuẩn của dịch chiết tỏi trên cá lóc đen kháng *Aeromonas hydrophila* gây bệnh lở loét thấp hơn kháng sinh Doxycycline (đường kính vòng vô khuẩn tương ứng 25,97 mm so với 38,80 mm) (Nguyen et al., 2016); trên tôm thẻ chân trắng trị bệnh hoại tử gan tụy cấp gây ra bởi vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio harveyi* (đường kính vòng vô khuẩn tương ứng 18,20 mm so với 24,00 mm) (Nguyen et al., 2021); trên cá rô phi các loại kháng sinh có hoạt tính kháng khuẩn *Streptococcus agalactiae* cao hơn các cao chiết thảo dược từ 1-15,22 lần (Nguyen et al., 2019).

**3.2. Kết quả xác định giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC, Minimum Inhibitory Concentration) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC, Minimum Bactericidal Concentration) của các loại dịch chiết**

Qua kết quả khảo sát khảo sát tính đối kháng của các dịch chiết thảo dược đối với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* thông qua đo đường kính vòng vô khuẩn trên đĩa giấy khuếch tán, nghiên cứu xác định các dịch chiết tỏi có khả năng kháng khuẩn trong các dung môi ethanol 70%, methanol 70%, acetone 70%, nước cất và dịch chiết kinh giới có khả năng kháng khuẩn trong dung môi methanol 70%. Do đó, nghiên cứu chọn các loại dịch chiết này để xác định giá trị MIC và MBC. Kết quả khả năng diệt khuẩn của dịch chiết thảo dược qua tỉ lệ MBC/MIC được thể hiện trong Hình 3 với quan sát nồng độ thảo dược thấp nhất tại đó vi khuẩn không phát triển (không làm đổi màu thuốc thử resazurin).



**Hình 3.** Kết quả xác định giá trị nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của các loại dịch chiết tỏi và kinh giới trong các loại dung môi khác nhau trên đĩa 96 giếng

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy trong các loại dịch chiết thảo dược với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*, dịch chiết của tỏi cho kết quả kháng khuẩn tốt hơn kinh giới với kết quả MIC trong khoảng 0,01-1,67 mg/mL. Kết quả MIC trong nghiên cứu thấp hơn so với cao chiết thảo dược nghệ có nồng độ ức chế tối thiểu trên tôm thẻ chân trắng đối với các loại vi



khuẩn *Vibrio harveyi*, *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus* và *Vibrio fluvialis* lần lượt là 0,47; 0,47; 0,94; 0,47; 3,75 và 0,47 mg/mL (Lawhavit et al., 2011).

**Bảng 4. Kết quả MIC và MBC**

Dịch chiết/ dung môi (100 mg/mL)	Kết quả		
	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MBC/MIC
<b>Tỏi (100 mg/mL)</b>			
Ethanol 70%	<b>0,16</b>	<b>0,63</b>	<b>3,9</b>
Methanol 70%	<b>0,01</b>	<b>0,04</b>	<b>4</b>
Acetone 70%	0,31	1,67	5,4
Nước cất	1,67	10	5,9
<b>Kinh giới (100 mg/mL)</b>			
Ethanol 70%	<b>2.5</b>	<b>10</b>	<b>4</b>

Theo Canillac và Mourey (2001), nếu tỉ lệ MBC/MIC nhỏ hơn hoặc bằng 4, chiết xuất được xem là có khả năng diệt khuẩn; mặt khác, nếu tỉ lệ này lớn hơn 4, thì có tác dụng kìm khuẩn. Từ kết quả nghiên cứu MIC và MBC cho thấy, dịch chiết tỏi trong dung môi ethanol 70% và methanol 70% có khả năng diệt được vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan thận mỡ trên cá tra với MBC/MIC lần lượt là 3,9 và 4; trong khi dịch chiết tỏi trong dung môi acetone 70% và nước cất có khả năng kìm vi khuẩn này phát triển và dịch chiết kinh giới trong dung môi ethanol 70% có khả năng diệt khuẩn. Kết quả nghiên cứu tương đồng với nghiên cứu của Nguyen (2019) cho thấy khả năng kháng khuẩn của các loại thảo dược, cụ thể cao chiết vỏ quế được chiết xuất trong dung môi ethanol 96% hoặc methanol 99,8% có hiệu quả kháng khuẩn cao nhất với vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* SA3 và SA4 trên cá rô phi. Một số nghiên cứu cho thấy các chất chiết xuất từ thảo dược có khả năng kháng khuẩn giống như kháng sinh, chúng tác động vào màng tế bào của vi khuẩn nhằm tiêu diệt vi khuẩn, tuy nhiên 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 (Kamel, 2001).

**4. Kết luận**

Kết quả của nghiên cứu đã chỉ ra rằng đối với chủng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh trên cá tra, dịch chiết tỏi có khả năng kháng khuẩn cao hơn dịch chiết kinh giới. Trong đó, dịch chiết tỏi từ dung môi ethanol 70% cho hiệu quả kháng *Edwardsiella ictaluri* cao nhất. Dịch chiết tỏi từ dung môi methanol 70% và dịch chiết kinh giới trong dung môi ethanol 70% cũng có khả năng diệt khuẩn và có tiềm năng sử dụng trong phòng trị bệnh do *Edwardsiella ictaluri* gây ra trên cá tra. Trong các nghiên cứu tương lai, cần thực hiện các nghiên cứu đánh giá tính an toàn và hiệu quả của dịch chiết tỏi trộn vào thức ăn trong việc phòng và trị bệnh trên cá tra.

❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aoki, T. (1988). Drug resistance plasmids from fish pathogens. *Microbiol Sciences*, 5(7), 219-223.
- Bui, Q. T., & Le, X. T. (2006). Research results on preparations (VTS1 - C), (VTS1 - T) extracted from herbs for disease prevention and treatment for black tiger shrimp and catfish. Aquaculture Research Institute 1, Institute of Industrial Chemistry.
- Bui, T. T., & Nguyen, T. T. H. (2009). *Duoc lieu hoc Thu y [Veterinary Medicine]*. Agricultural Publishing House.
- Canillac, N., & Mourey, A. (2001). Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology*, 18(3), 261-268.
- Chakraborty, S. B., & Hancz, C. (2013). Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. *Reviews in Aquaculture*, 3, 103-119.
- Corzo-Martinez, M., Corzo, N., & Villamiel, M. (2007). Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 609-625.
- Crumlish, M., Tu, D. T., Turnbull, J. F., Nguyen, N. T. N., & Ferguson, H. W. (2002). Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam. *Journal of Fish Diseases*, 25(12), 733-736.
- Dang, T. T. N., & Le, T. H. (2017). Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của tinh dầu cay kinh giới (*Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyland) [Study on chemical constituents and antimicrobial activities of essential oil from *Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyland)]. *Hue University Journal of Science*, 2(42), 85-91.
- Do, T. L. (1999). *Nhung cay thuoc va vi thuoc Viet Nam [Vietnam medicinal plants and herbs]*. Science and Technology Publishing House, Hanoi.
- Dongsa K., Ryongung C., & Shen X. Y. (1992). Diterpenoids from *Rabdosia japonica*. *Phytochemistry*, (31), 697-670.
- Dorman H. J. D., & Deans S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol*, 88, 308-316.
- Ferguson H. W., Turnbull J. F., Shin A., Thompson K., Tu D.T., & Crumlish M. (2001). Bacillary necrosis in farmed *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), from the Mekong Delta, Vietnam. *Journal of Fish Diseases*, 24, 509-513.
- Gull, I., Saeed, M., Shaukat, H., Aslam, S. M., Samra, Z. Q., & Athar, A. M. (2012). Inhibitory effect of *Allium sativum* and *Zingiber officinale* extracts on clinically important drug resistant pathogenic bacteria. *Annals clinical Microbiology Antimicrobials*, 11(8).
- Hoang, D. H., & Nguyen, V. L. (2017). Xác định các cấu tử hóa học và hoạt tính sinh học của tinh dầu cay kinh giới dãy Hạ Giang (*Elsholtzia Winitiana Craib*) [Constituents and biological activity of Hạ Giang *Elsholtzia Winitiana Craib* oil]. *Thai Nguyen University Journal of Science and Technology*, 164(04), 127-131.

- Janssen, A. M., Scheffer, J. J., & Baerheim, S. A. (1987). Antimicrobial activities of essential oils, a 1976-1986 literature review on possible applications. *Pharm Weekbl Sci*, 9, 193-197.
- Kamel, C. (2001). Tracing modes of action and the roles of plant extracts in non-ruminants. *Recent advances in animal nutrition*, 135-150.
- Kirby-Bauer, A. (1996). Antimicrobial sensitivity testing by agar diffusion method. *J Clin Pathol*, 44, 493.
- Lawhavinit, O. A., Sincharoenpokai, P., & Sunthornandh, P. (2011). Effects of ethanol tumeric (*Curcuma longa* Linn.) extract against shrimp pathogenic *Vibrio* spp. and on growth performance and immune status of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Agriculture and Natural Resources*, 45(1), 70-77.
- Le, H. P. (2013). Summary report on scientific and technological results of the project "Improving the efficiency of using inactivated vaccines through protein heat shock", Research Institute For Aquaculture No.2.
- Le, T. C., & Cheong, F. (2010). Perceptions of risk and risk management in Vietnamese catfish farming: An empirical study. *Aquaculture Economics and Management*, 14, 282-314.
- Luu, Q. H., Nguyen, T. B. T., Nguyen, T. L. A., Do, T. T. T., Dao T. H. T., & Padungtod, P. (2021). Antibiotics use in fish and shrimp farms in Vietnam. *Aquaculture Reports*, 20, 100711.
- Ly, T. T. L., Vo, H. P., Le, H. T., Ma, T. L., Nguyen, D. T., & Doan, V. C. (2009). Bao cao so ket de tai "Nghien cuu benh trang mang, trang gan tren ca Tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) va bien phap phong tri [Preliminary report on the topic "Research on white gill disease, white liver disease in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) and prevention measures].
- Luong, T. M. N., Nguyen, T. T. L., Nguyen, N. Q., Pham, T. N. H., Truong, T. H. H., Tran, T. H., & Pham, T. H. (2016). Nghien cuu hoat tinh khang *Staphylococcus aureus* va *Klebsiella pneumoniae* cua cao chiet la dam but (*Hibiscus rosa sinensis* L.) [Study on the antibacterial activities of Hibiscus rosa-sinensis leaf extracts against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*]. *Science & Technology Development*, 19, 84j-94.
- Nguyen, D. V., Truong, T. T. V., & Ho, V. H. (2016). Kha nang khang khuan cua dich ep mot so loai thao duoc tri benh lo loet do vi khuan *Aeromonas hydrophila* gay ra tren ca loc den (*Chana striata* Block, 1793) [Examining anti-bacterial effects of juices derived from medicinal herbs on *Aeromonas hydrophila* strain causing ulcer on snakeheads]. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 9(10).
- Nguyen, T. H., & Dang, T., L. (2016). Danh gia kha nang diet khuan cua dich chiet toi (*Allium sativum* L.) doi voi mot so vi khuan gay benh tren tom [Evaluation of the bactericidal ability of garlic extract (*Allium sativum* L.) against some pathogenic bacteria in shrimp]. *Science and technology in aquaculture development*, Agricultural Publishing House.
- Nguyen, T. H., Phan, T. V., Pham, T. Y., Le, T. M., & Truong, T. M. H. (2021). Kha nang khang khuan va phong benh hoai tu gan tuy cap o tom the chan trang (*Penaeus vannamei*) cua toi (*Allium sativum*) len men [Antimicrobial activity and prevention acute hepatopancreatic necrosis disease in brackish whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*) of the fermented garlic (*Allium sativum*)] *Vietnam Journal of Science and Technology*, 63(2).

- Nguyen, T. T. Q., Le, L. C., Doan, V. C., Nguyen, D. T., Ma, T. L., Tran, H. B. N., Nguyen, T. N., & Nguyen, T. N. T. (2019). Kha nang doi khang vi khuan *Streptococcus agalactiae* phan lap tren ca ro phi (*Oreochromis* spp.) boi mot so cao chiet thao duoc [Antibacterial effect towards streptococcus agalactiae isolated from tilapia (*Oreochromis* spp.) by herbal extracts]. *Journal of Fisheries Science and Technology, Nha Trang University*, 3, 124-132.
- Oonmetta-Aree, J., Suzuki, T., Gasaluck, P., & Eumkeb, G. (2006). Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT-Food Science and Technology*, 39(10), 1214-1220.
- Phan, L. T., Bui, T. M., Nguyen, T. T. T., Gooley, G. J., Ingram, B. A., Nguyen, H. V., Nguyen, P. T., & De Silva, S. S. (2009). Current status of farming practices of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* in the Mekong Delta, Vietnam. *Aquaculture*, 296, 227-236.
- Rahman, M., Fazlic, M. V., & Saad, N. W. (2012). Antioxidant properties of raw garlic (*Allium sativum*) extract. *International Food Research Journal*, 19(2), 589-591.
- Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2009). Potential of cinnamon (*Cinnamomum verum*) oil to control *Streptococcus iniae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fisheries Science*, 76, 287-293.
- Sarter, S., Kha, N. H. N., Hung, L. T., Lazard, J., & Didier, M. (2007). Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. *Food Control*, 18 (11), 1391-1396.
- VASEP. (2021). Vietnamese striped catfish exported to the US is on the way to recovery and breakthrough Retrieved March 01, 2022 from: <https://tongcucthuysan.gov.vn/vi-vn/th%C6%B0C6%A1ng-m%E1%BA%A1i-th%E1%BB%A7y-s%E1%BA%A3n/xu%E1%BA%A5t-nh%E1%BA%ADp-kh%E1%BA%A9u/doc-tin/016018/2021-07-08/ca-tra-viet-nam-xuat-khau-sang-hoa-ky-dang-tren-da-phuc-hoi-va-but-pha>
- Tran, T. T. H., Boerlage, A. S., Tran, T. M. D., Dang, T. M. T., Nguyen, T.T.H., Humphry, R. W., & Nguyen, T. P. (2021). Nursing stages of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Vietnam: Pathogens, diseases and husbandry practices. *Aquaculture*, 533, 736-114.
- Tu, T. D., Haesebrouck, F., Sorgeloos, P., Baele, M., Decostere, A., & Nguyen, A. T. (2010). Hien trang khang thuoc khang sinh tren vi khuan *Edwardsiella ictaluri* gay benh gan, than mu tren ca tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) o dong bang song Cuu Long [Antimicrobial resistance of *Edwardsiella ictaluri* isolates from natural outbreaks of bacillary necrosis of *Pangasianodon hypophthalmus*]. *Can Tho University Journal of Science*, 15, 162-171.
- Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., & Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*, 44, 566-571.
- Vu, X. Q. (1993). *Nhung cay thuoc nam chua mot so benh viem nhiem [The medicinal plants cure some inflammatory diseases]*. Medical Publishing House.
- Yeh, H. Y., Shoemaker, C. A., & Klesius, P. H., (2005). Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of channel catfish *Ictalurus punctatus* important bacterial pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Microbiological Methods*, 63, 36-44.

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACTS OF GARLIC (*Allium sativum*)  
AND MARJORAM (*Elsholtzia ciliata*) AGAINST *Edwardsiella ictaluri* CAUSING DISEASE  
IN CATFISH (*Pangasianodon hypophthalmus*)**

**Tran Thi Phuong Dung<sup>1\*</sup>, Luu Tang Phuc Khang<sup>1</sup>,  
Huynh Thi Truc Quan<sup>2</sup>, Nguyen Thi Truc Quyen<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Ho Chi Minh City University of Education, Vietnam

<sup>2</sup>Nong Lam University, Vietnam

<sup>3</sup>Dong Nai Department of Agriculture and Rural Development

\*Corresponding author: Tran Thi Phuong Dung – Email: dungttp@hcmue.edu.vn

Received: March 03, 2022; Revised: June 18, 2022; Accepted: June 22, 2022

**ABSTRACT**

*This study evaluated the growth inhibition ability of Edwardsiella ictaluri bacteria isolated on catfish by extracts derived from garlic and marjoram. Extracts of garlic and marjoram were mixed in a solvent of 70% ethanol, 70% methanol, 70% acetone, distilled water after heat treatment, filtration, and vacuum evaporation to produce extracts with a concentration of 100 mg/mL. The results showed that garlic extract had a higher antibacterial ability than marjoram extract. Garlic extract and 70% ethanol extract showed the highest effectiveness against Edwardsiella ictaluri with aseptic ring diameter of  $2,17 \pm 0,61$  mm and MBC/MIC value of 3,9. Garlic extract mixed with 70% methanol solvent and marjoram extract in 70% acetone solvent also have antibacterial and potential use in the prevention and treatment of diseases caused by Edwardsiella ictaluri in catfish.*

**Keywords:** antibacterial activity; *Edwardsiella ictaluri*, herbal extract; Pangasius