Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên
Vol. 128, No. 1E, 107–114, 2019

pISSN 1859–1388
eISSN 2615–9678

HOẠT TÍNH KHÁNG VI KHUẨN *Vibrio parahaemolyticus* GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP TRÊN TÔM CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*) CỦA CÂY CHÓ ĐẺ THÂN XANH (*Phyllanthus amarus*) VÀ CHẾ PHẨM EM_5

Antibacterial activity of *Phyllanthus amarus* and effective microorganism (EM_5) toward acute hepatopancreatic necrosis disease caused by *Vibrio parahaemolyticus* in white leg shrimps (*Litopenaeus vannamei*)

Phạm Thị Hải Yến[1], Nguyễn Duy Quỳnh Trâm[1], Hoàng Thị Ngọc Hân[2], Trần Vinh Phương[2]*

[1] Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam
[2] Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, tỉnh lộ 10, Phú Thượng, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Trần Vinh Phương (Thư điện tử: tvphuong@hueuni.edu.vn)
(*Ngày nhận bài (received): 10–9–2019; Ngày chấp nhận đăng (accepted): 17–10–2019*)

Tóm tắt. Nghiên cứu này xác định tỷ lệ phối hợp tối ưu giữa cây chó đẻ thân xanh (*Phyllanthus amarus*) với chế phẩm sinh học (EM_5) để kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm thẻ chân trắng. Bốn tỷ lệ phối hợp gồm 1:0,5; 1:1; 1:1,5 và 1:2 (kg/L) được thử nghiệm với 4 lần lặp lại. Kết quả cho thấy tỷ lệ 1:2 có hoạt tính kháng khuẩn cao nhất với đường kính vòng kháng khuẩn là 20,00 ± 1,41 mm. Tám hoạt chất thiên nhiên trong cao chiết được xác định bằng GC-MS, trong đó beta sitosterol có tỷ lệ cao nhất (41,08%) và methyl palmitate thấp nhất (4,23%). Chế phẩm có khả năng kháng khuẩn tốt hơn so với ampicilin (10 μg) và erythromycin (30 μg).

Từ khóa: Cây chó đẻ thân xanh, chiết xuất, kháng khuẩn, gan tụy cấp

Abstract. This study determines the optimal combination rate between *Phyllanthus amarus* and the Effective Microorganism (EM_5) toward acute hepatopancreatic necrosis caused by *V. parahaemolyticus* in white leg shrimps (*L. vannamei*). Four combination rates including 1:0.5, 1:1, 1:1.5, and 1:2 (kg/L) were studied with 4 replications. The results showed that the combination 1:2 has the largest inhibitory diameter of 20.00 ± 1.41 mm. Eight natural compounds in the extracts were detected using GC-MS with beta sitosterol the most abundant (41.08%) and methyl palmitate the least (4.23%). The extract has higher antibacterial activity than ampicillin (10 μg) and erythromycin (30 μg).

Keywords: *Phyllanthus amarus*, extract, antibacterial activity, acute hepatopancreatic necrosis

1 Đặt vấn đề

Tại Việt Nam, một số nghiên cứu về tác dụng của thảo dược trong phòng trị bệnh trên tôm, cá cũng đã được công bố trong những năm gần đây. Bùi Quang Tề đã công bố chế phẩm thảo dược (VTS1-C và VTS1-T) được phối chế từ các hoạt chất chiết tách được từ tỏi (*Allium sativum*), sài đất (*Weledia*

calendulacea) để phòng bệnh cho cá tra và tôm sú nuôi [1]. Bokashi trầu được chiết xuất từ lá trầu và lên men với các vi sinh vật có lợi có khả năng kháng khuẩn và tăng cường vi sinh vật có lợi trong đường tiêu hóa của động vật thủy sản [2]. Xuất phát từ những tác dụng của cây chó đẻ thân xanh (*Phyllanthus amarus*) chữa bệnh gan, các nhà nghiên cứu đã tiến hành các thử nghiệm sử dụng chiết xuất để phòng bệnh cho tôm nuôi. Theo Hai [3], dịch chiết từ cây chó đẻ thân xanh có khả năng kháng các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC12.020, *V. parahaemolyticus* KC13.14.2 và *V. harveyi* KC13.17.15 gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) trên tôm ở tất cả các nồng độ từ 1.000 đến 3.000 µg/đĩa. Việc sử dụng kháng sinh bừa bãi trong các trại sản xuất giống thủy sản cũng như trong các mô hình nuôi thủy sản hiện nay đã gây nên hiện tượng kháng thuốc của vi khuẩn gây bệnh. Vì vậy, việc nghiên cứu sản xuất các chế phẩm có nguồn gốc thảo dược đã trở thành một trong những cách tiếp cận mới thay thế cho việc sử dụng kháng sinh nhằm đảm bảo chất lượng sản phẩm vật nuôi, an toàn cho người tiêu dùng cũng như thân thiện với môi trường sinh thái.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Cây chó đẻ thân xanh (*P. amarus*) được thu gom ở các vùng gò đồi tại Thừa Thiên Huế. Đây là những cây trưởng thành với chiều cao từ 15 đến 35 cm, màu sắc xanh tươi, không dập nát. Chế phẩm sinh học thứ cấp EM$_5$ (*Effective Microorganism*) được cung cấp bởi Trung tâm Ươm tạo và Chuyển giao công nghệ, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế sử dụng làm dung môi chiết xuất hoạt chất với thành phần vi sinh vật có lợi bao gồm các chủng *Lactobacillus* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus* spp. [2, 4].

Chủng vi khuẩn gây bệnh: Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được xác định là tác nhân gây bệnh AHPND trên tôm thẻ chân trắng được phân lập, định danh và lưu giữ ở –80 °C tại Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế. Sau đó mẫu vi khuẩn được phục hồi nuôi cấy tăng sinh trở lại trong môi trường Tryptic Soy Brorth (TSB) có bổ sung 2% NaCl trong tủ ấm lắc 2 tầng (GFL 3032, hãng GFL) ở 37 °C, tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 24 giờ. Mật độ vi khuẩn có trong huyền dịch sau khi nuôi cấy được xác định theo phương pháp đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 600 nm trên máy quang phổ UV-VIS (U2900, Hitachi, Nhật Bản). Mật độ vi khuẩn sẽ được điều chỉnh về 10^6 CFU/mL để thử kháng sinh đồ dựa trên mật độ vi khuẩn nuôi cấy ban đầu (OD = 1, tương đương mật độ vi khuẩn khoảng 10^8 CFU/mL).

Vật liệu khác: Sử dụng môi trường pepton kiềm đặc để thử khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, môi trường được hấp khử trùng ở 121 °C trong 15 phút (MC-40L, Nhật Bản) sau đó để nguội tới 40–50 °C rồi đổ vào đĩa Petri có đường kính 9 cm với độ dày 4,0 ± 0,2 mm. Đĩa giấy thấm nước cất vô trùng (đối chứng âm) và đĩa kháng sinh Doxycyclin (30 µg), Erithromycin (30 µg) và Ampicillin (10 µg) (đối chứng dương) để sử dụng thử kháng sinh đồ.

2.2 Phương pháp

Xác định tỷ lệ phối trộn tạo hỗn hợp sản phẩm từ dịch chiết cây chó đẻ thân xanh kết hợp với EM5

Các tỷ lệ nguyên liệu cây chó đẻ thân xanh và EM$_5$ được phối hợp theo 4 nghiệm thức khác nhau (Bảng 1). Cây chó đẻ thân xanh được cắt thành khúc nhỏ, sau đó cho vào máy xay nhuyễn và ủ trong EM$_5$ ở điều kiện yếm khí và nhiệt độ từ 34 đến 39 °C; pH dao động từ 3,8 đến 4,5. Sau 4 ngày, tiến hành ép,

pISSN 1859–1388
eISSN 2615–9678

Bảng 1. Tỷ lệ phối hợp giữa cây chó đẻ thân xanh và EM_5

Nghiệm thức	Cây chó đẻ thân xanh tươi (kg)	EM_5 (lít)
NT 1	1	0,5
NT 2	1	1,0
NT 3	1	1,5
NT 4	1	2,0

vắt để lấy hỗn hợp chế phẩm (CP) và thử nghiệm kháng khuẩn để xác định tỷ lệ phối hợp có khả năng kháng khuẩn tối ưu.

Thí nghiệm được tiến hành bằng cách cố định khối lượng cây chó đẻ thân xanh tươi và thay đổi thể tích chế phẩm EM_5 nhằm mục đích xác định được thể tích chế phẩm EM_5 phù hợp làm dung môi có thể ủ ngập hoàn toàn nguyên liệu và có được hoạt chất chiết xuất tối ưu thông qua kết quả đường kính vòng kháng khuẩn.

Xác định khả năng kháng khuẩn của hỗn hợp chế phẩm

Tác dụng diệt khuẩn của dịch chiết dạng cao của chế phẩm được kiểm tra bằng phương pháp kháng sinh đồ khuếch tán trên đĩa thạch của Kirby-Bauer. Các thao tác được thực hiện trong tủ cấy vô trùng Labcaire VLF-R. Huyền dịch chứa tế bào vi khuẩn (100 µL, 10^6 CFU/mL) được sử dụng để dàn đều trên đĩa thạch chứa môi trường pepton kiềm đặc đã được hấp khử trùng. Các đĩa giấy vô trùng (d = 0,6 mm) được đặt lên trên bề mặt đĩa thạch (4 đĩa mẫu và 1 đĩa đối chứng âm (đệm hòa tan cao chiết (H_2O) và 1 đĩa đối chứng dương (kháng sinh)). Lấy 50 µL dung dịch hòa tan cao chiết chế phẩm ở các nồng độ 1.000; 750; 500 và 250 mg/mL và 50 µL kháng sinh doxycylin (30 µg), erythromycin (30 µg) và ampicillin (10 µg) tẩm lên các đĩa giấy thí nghiệm. Đĩa sau đó được giữ nguyên trong tủ lạnh ở 4 °C trong 8 giờ để cho dịch chiết sản phẩm khuếch tán ra xung quanh đĩa giấy. Sau đó, các đĩa thạch được ủ trong tủ ấm ở 37 °C trong 24 giờ. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 4 lần trên cùng 1 đĩa thạch, đo đường kính vòng kháng khuẩn sau 24, 48, 72 và 96 giờ.

Xác định thành phần hoạt chất trong hỗn hợp chế phẩm

Căn cứ vào kết quả thử khả năng kháng khuẩn của thí nghiệm trên, chúng tôi lựa chọn nghiệm thức có khả năng kháng khuẩn tối ưu để tiến hành xác định sự có mặt của các hợp chất thiên nhiên có trong cao chiết chế phẩm bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS).

Xử lý số liệu

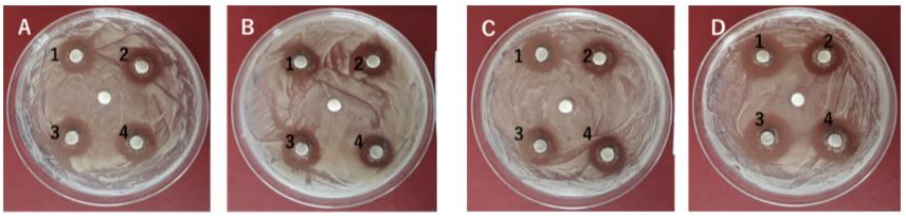
Các số liệu thô sau khi thu thập được nhập vào Excel để xử lý, sau đó được tính toán bằng phần mềm SPSS 16.0, phân tích phương sai ANOVA một yếu tố để so sánh sự khác nhau về đường kính vòng kháng khuẩn ở mức ý nghĩa thống kê $p \leq 0,05$ bằng phương pháp kiểm định LSD.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Đánh giá khả năng kháng của chế phẩm từ dịch chiết cây chó đẻ thân xanh kết hợp với EM$_5$

Kết quả cho thấy dịch chiết từ cây chó đẻ thân xanh kết hợp với EM$_5$ gồm các chủng vi sinh vật có lợi có trong chế phẩm có khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND trên tôm thẻ chân trắng. Các nghiệm thức có tỷ lệ phối hợp khác nhau thể hiện đường kính vòng kháng khuẩn cũng khác nhau. Đường kính vòng kháng khuẩn tăng dần khi liều lượng dung môi càng cao (Hình 1 và Bảng 2).

Từ Hình 1 và Bảng 2 có thể thấy đường kính vòng kháng khuẩn của các nghiệm thức giảm dần theo thời gian từ 24 đến 72 giờ và vi khuẩn bắt đầu phát triển trở lại sau 96 giờ ở tất cả các nghiệm thức. Cụ thể, sau 24 giờ đường kính vòng kháng khuẩn ở mật độ vi khuẩn 10^6 CFU/mL tương ứng với thể tích 100 µL, ở các nghiệm thức 1, nghiệm thức 2, nghiệm thức 3 và nghiệm thức 4, đường kính vòng kháng khuẩn đạt lần lượt là 15,88 ± 1,44; 16,38 ± 1,11; 15,88 ± 0,63 và 20,00 ± 1,41 mm (Hình 1), trong đó chỉ có kết quả đường kính vòng kháng khuẩn ở nghiệm thức 4 (NT4) là cao hơn so với các nghiệm thức còn lại (p < 0,05). Sau 48 giờ, đường kính vòng kháng khuẩn ở NT1, NT2 và NT3 đạt lần lượt 14,25 ± 1,26; 15,75 ± 0,50 và 14,75 ± 0,29 mm và không sai khác thống kê (p > 0,05). Trong khi đó, ở NT4 đường kính vòng kháng khuẩn đạt 18,50 ± 2,27 mm và cao hơn so với tất cả các nghiệm thức còn lại (p < 0,05). Tương tự, 72 giờ là thời điểm vòng kháng khuẩn thấp nhất ở nghiệm thức 1, 2, 3 và 4 đạt lần lượt là 13,13 ± 1,03; 14,63 ± 0,48; 13,63 ± 0,25 và 17,38 ± 2,17 mm, trong đó chỉ có đường kính vòng kháng khuẩn ở NT4 là cao nhất (p < 0,05). Đến 96 giờ thì vi khuẩn đã phát triển trở lại trên toàn bộ đĩa thạch. Điều này cho thấy khả năng kháng khuẩn đạt tối ưu khi kết hợp cây chó đẻ thân xanh tươi với EM$_5$ theo tỷ lệ 1:2 (NT4). Mặc dù cùng một đơn vị nguyên liệu cây chó đẻ thân xanh nhưng khi được ủ trong chế phẩm EM$_5$ với thể tích lớn hơn thì khi này nguyên liệu (dịch chiết và bã) cây chó đẻ thân xanh được ủ ngập hoàn toàn trong EM$_5$, do đó



Hình 1. Kết quả kháng khuẩn của các tỷ lệ phối hợp lên *V. parahaemolyticus*
Ghi chú: NT1 (A), NT2 (B), NT3 (C), NT4 (D) và (1), (2), (3), (4): số lần lặp lại

Bảng 2. Khả năng kháng khuẩn của các nghiệm thức đối với *V. parahaemolyticus*

Nghiệm thức	Mật độ vi khuẩn CFU/mL	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)			
		24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ
NT 1	10^6	15,88^a ± 1,44	14,25^a ± 1,26	13,13^a ± 1,03	+
NT 2		16,38^a ± 1,11	15,75^a ± 0,50	14,63^a ± 0,48	+
NT 3		15,88^a ± 0,63	14,75^a ± 0,29	13,63^a ± 0,25	+
NT 4		20,00^b ± 1,41	18,50^b ± 2,27	17,38^b ± 2,17	+

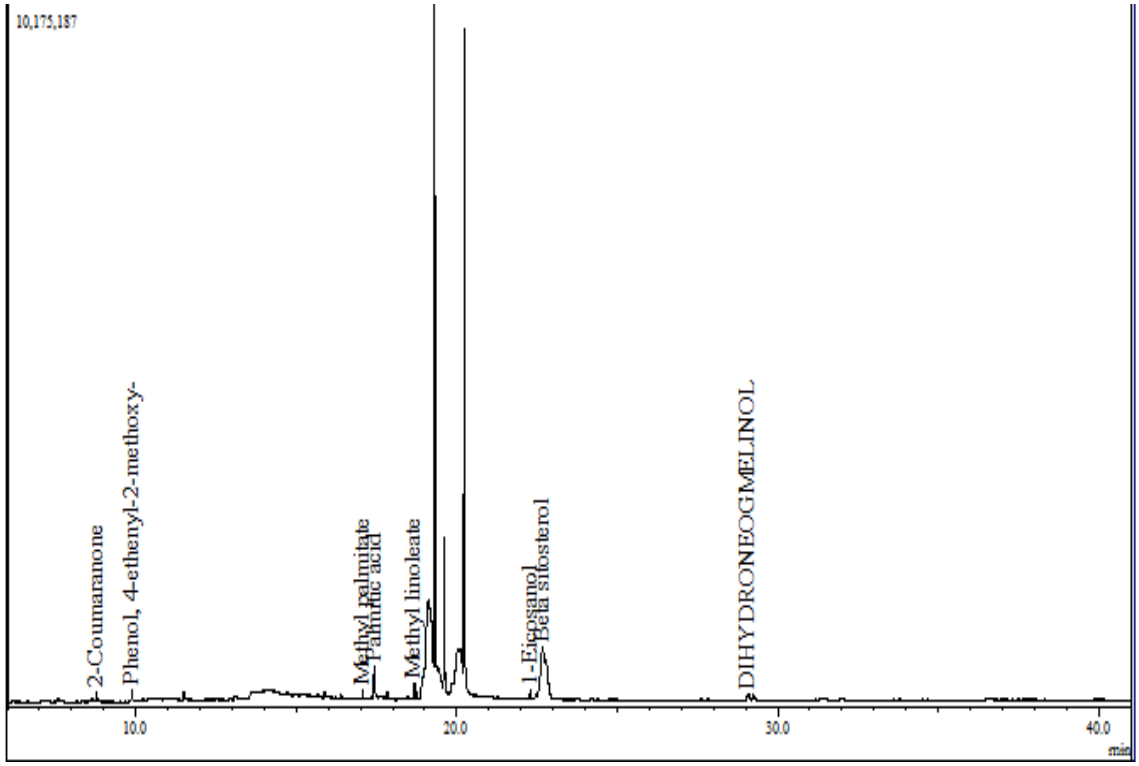
Ghi chú: Các ký tự ^{a,b} khác nhau trên cùng một cột thể hiện sai khác có ý nghĩa thống kê, (p < 0,05); (+) *Vi khuẩn bắt đầu phát*

pISSN 1859–1388
eISSN 2615–9678

có thể hoạt chất được chiết xuất ra nhiều hơn so với những nghiệm thức có tỷ lệ dung môi thấp cho dù nồng độ vi khuẩn có trong chế phẩm EM_5 không thay đổi. Immanuel [5], khi chỉ thử khả năng kháng khuẩn đơn lẻ từ dịch chiết cây *Phyllanthus niruri* ở nồng độ 100 mg/mL, cho thấy vòng kháng khuẩn đối với *V. parahaemolyticus, V. hareyi, V. alginolyticus, V. mimics* và *V. vulnificus* lần lượt là 10,33, 12,66, 10,00, 13,83 và 17,00 mm. Kết quả nay thấp hơn so với kết quả nghiên cứu của chúng tôi khi sử dụng kết hợp giữa dịch chiết cây chó đẻ thân xanh kết hợp vi sinh vật có lợi có trong EM_5 với tỷ lệ phối hợp tối ưu là 1:2 (NT4). Từ đó có thể thấy rằng ngoài khả năng kháng khuẩn của hoạt chất sinh học có trong dịch chiết cây chó đẻ thân xanh, các vi sinh vật có lợi trong chế phẩm là những vi sinh vật đối kháng với vi khuẩn gây bệnh được thử nghiệm. Theo Đỗ Thị Thanh Dung [6], *Lactobacillus plantarum* được xác định là chủng vi sinh đối kháng mạnh với chủng *V. parahaemolitycus* gây bệnh AHPND/EMS trên tôm. Thời gian diệt khuẩn của chúng tôi ở các nghiệm thức kéo dài sau 72 giờ là nhanh hơn so với chế phẩm Bokashi trầu ở nồng độ 7,5 mg/mL với khả năng kháng *Aeromonas hydrophyla* lên đến 7 ngày theo dõi [2].

3.2 Phân tích thành phần hoạt chất thiên nhiên có trong sản phẩm

Sau khi chọn được tỷ lệ phối hợp tối ưu giữa cây chó đẻ thân xanh tươi và EM_5, chúng tôi tiến hành lấy 1 g cao chiết để phân tích thành phần hoạt chất có trong chế phẩm. Tám hoạt chất đã được phát hiện trong thành phần của cao chiết. Các thành phần này được xác định bằng phổ GC-MS (Hình 2).



Hình 2. Phổ GC-MS của cao chiết

Tám hợp chất thiên nhiên tồn tại trong cao chiết chế phẩm gồm: 2-coumaranone (5,64%), 4-ethenyl-2-methoxy-phenol (7,37%), methyl palmitate (4,23%), palmitic acid (20,90%), methyl linoleate (6,75%), 1-eicosanol (4,87%), beta sitosterol (41,08%) và dihydroneogmelinol (9,15%). Trong đó, beta sitosterol chiếm tỷ lệ cao nhất (41,08%); tiếp đến là palmitic acid chiếm 20,9%; methyl palmitate chiếm tỷ lệ nhỏ nhất với 4,23%. Khi chiết xuất cây *P. amarus* bằng acetone, Arun [7] phát hiện 9 hợp chất nhưng khi chiết xuất bằng ethanol chỉ phát hiện 7 hoạt chất sinh học.

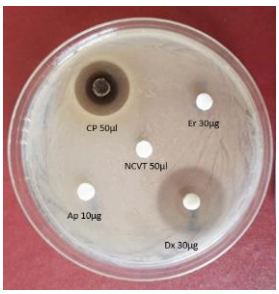
3.3 So sánh khả năng kháng khuẩn của chế phẩm với kháng sinh

Tiến hành đánh giá khả năng kháng khuẩn của chế phẩm (CP) tạo ra ở tỷ lệ phối hợp tối ưu 1:2 với các loại kháng sinh phổ biến như doxycyclin (30 µg), ampicillin (10 µg) và erythromycin (30 µg) trên chủng *V. parahaemolyticus*.

Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* nhạy với cả dịch chiết chế phẩm và kháng sinh doxycyclin, thể hiện ở đường kính vòng kháng khuẩn ≥19 mm (Bảng 3). Doxycyclin (30 µg) có đường kính vòng kháng khuẩn đạt 20,20 ± 0,96 mm, tương đương với CP đạt 19,60 ± 1,14 mm ($p > 0,05$); trong khi đó ampicillin và erythromycin lại không có khả năng kháng *V. parahaemolyticus* (Hình 3). Tương tự như kết quả nghiên cứu của Đặng Thị Lụa [8], khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus KC12.02.0* và *V. parahaemolyticus KC13.14.2* của doxycyclin (30 µg) lần lượt đạt 23,00 ± 1,73 và 23,33 ± 1,53 mm, đồng thời cũng trong nghiên cứu này ampicillin (10 µg) cũng không có khả năng kháng khuẩn. Như vậy, CP có khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* tương đương với doxycyclin (30 µg) nhưng cao hơn nhiều so với ampicillin và erythromycin. Theo Senjobi [9], dịch chiết từ cây *P. amarus* đều có khả năng kháng khuẩn thấp hơn erythromycin (EER) và bacitracin (EB) có kết hợp dịch chiết trên tất cả 12 chủng vi sinh vật được thử nghiệm.

Bảng 3. So sánh khả năng kháng *V. parahaemolyticus* của CP với đối chứng kháng sinh

Dung dịch kháng khuẩn	Mật độ vi khuẩn (CFU/mL)	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
CP (50 µL)	10^6	$19,60^a \pm 1,14$
Doxycyclin (30 µg)		$20,20^a \pm 0,96$
Ampicillin (10 µg)		0
Erythromycin (30 µg)		0
Nước cất vô trùng (Đối chứng âm)		0



Hình 3. So sánh khả năng kháng *V. parahaemolyticus* của CP và kháng sinh
Ghi chú: CP (chế phẩm); Er (Erythromycin); Dx (Doxycylin); Ap (Ampicilin); NCVT (Nước cất vô trùng)

pISSN 1859–1388
eISSN 2615–9678

4 Kết luận

Kết quả nghiệm thức 4 (tỷ lệ phối hợp 1:2) tức là 1 kg cây chó đẻ thân xanh ủ trong 2 lít EM_5 có khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* cao nhất so với các nghiệm thức được thử nghiệm.

Có 8 hợp chất thiên nhiên trong cao chiết chế phẩm, trong đó hoạt chất beta sitosterol có tỷ lệ cao nhất: 41,08%, thấp nhất là methyl palmitate: chỉ có 4,23%.

Chế phẩm được sản xuất từ dịch chiết cây chó đẻ thân xanh kết hợp vi sinh vật có lợi trong EM_5 bước đầu cho thấy có khả năng kháng khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND trên tôm tốt hơn so với ampicilin (10 μg) và erythromycin (30 μg) nhưng không có ý nghĩa thống kê với doxycylin (30 μg). Điều này cho thấy các hoạt chất thiên nhiên chiết xuất từ cây chó đẻ thân xanh và vi sinh vật có lợi trong EM_5 đều là những thành phần có khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolitycus* gây bệnh. Vì vậy, chế phẩm hoàn toàn có khả năng thay thế việc sử dụng kháng sinh để kháng lại vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh gan tụy cấp trên tôm.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được Bộ Giáo dục và Đào tạo tài trợ thông qua đề tài thuộc Chương trình khoa học và công nghệ cấp Bộ mã số CT-2018-DHH-07.

Tài liệu tham khảo

1. Tề BQ. Bệnh học thủy sản. Viện nghiên cứu nuôi trồng thủy sản 1; 2006.400 p.
2. Linh NQ. Ứng dụng chế phẩm sinh học Bokashi Trầu cho vùng nuôi tôm an toàn và vai trò của cộng đồng ở đầm phá Tam Giang – Cầu Hai, tỉnh Thừa Thiên Huế. Nhà xuất bản Đại học Huế; 2010.119 p.
3. Hai TN, Lua TD, Hanh TN, Hai HH, Ha TNL, Ha TTN. Screening antibacterial effects of Vietnamese plant extracts against pathogens caused acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimps. Asian journal of pharmaceutical and Clinical Research. 2018 May;11(5):77-83. https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i5.23618.
4. Vân TQK. Thành phần, số lượng, tốc độ sinh trưởng và phát triển của các loài vi sinh vật trong chế phẩm sinh học EM và Bokashi Trầu. Nhà xuất bản Đại học Huế; 2010:64-6.
5. Immanuel G. Antimicrobial activity of various solvent based extracts of medicinal herb *Phyllanthus niruri* against shrimp *vibrio* pathogens (Abstract). Conference: National seminar on Marine Resources. 2016 Mar. https://www.researchgate.net/publication/320346684_ANTIMICROBIAL_ACTIVITY_OF_VARIOUS_SOLVENT_BASED_EXTRACTS_OF_MEDICINAL_HERB_PHYLLANTHUS_NIRURI_AGAINST_SHRIMP_VIBRIO_PATHOGENS
6. Dung DTT, Quang VD, Trang PTP. Phân lập tuyển chọn chủng *Lactobacillus* spp. kháng *Vibrio parahaemolyticus* gây hội chứng chết sớm trên tôm tại Sóc Trăng. Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ. 2017 7 26;20(T3):5-15. http://www.vjol.info/index.php/JSTD/article/view/31929/27125
7. Arun T, Senthikumar B, Purushothaman K, A A. GC-MS determination of bioactive components of *Phyllanthus amarus* (L.) and antibacterial activity. Journal of Pharmacy Research. 2012 Sep;5(9):4767-71. https://www.researchgate.net/publication/279512222_GCMS_Determination_of_Bioactive_Components_of_Phyllanthus_amarus_L_and_its_Antibacterial_Activity

8. Lụa DT, Hà LTN, Hải NT. Tác dụng diệt khuẩn của dịch chiết lá sim và hạt sim (*Rhodomyrtus tomentosa*) đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm nuôi nước lợ. Tạp chí Khoa học và Phát triển. 2015;13(7):1101-8. http://www.vjol.info/index.php/hvnn/article/viewFile/31567/26800
9. Senjobi C. T, Ettu AO, O OC. Antibacterial and antifungal activities of leaf extracts of *Phyllanthus amarus* Schum and Thonn. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy. 2017 Jan;9(1):6-10. https://doi.org/10.5897/JPP2013.0261