

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO CHẾ PHẨM NHŨ TƯƠNG NANO TỪ TINH DẦU LÁ TRẦU KHÔNG (*Piper betle* L.) ỨNG DỤNG PHÒNG BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP TÍNH AHPND Ở TÔM

Mai Thị Minh Ngọc^{1*}, Nguyễn Thị Thu Hiền¹,
Vũ Thị Bích Huyền², Bùi Thị Hải Hòa¹, Lê Minh Hải³

TÓM TẮT

Lá trầu không với hoạt tính kháng khuẩn mạnh đã được sử dụng rộng rãi để phòng bệnh cho con người và động vật nuôi. Nghiên cứu này thực hiện chế tạo chế phẩm nhũ tương nano tinh dầu lá trầu không để phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease: AHPND) ở tôm do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây nên. Chế phẩm được tạo thành ở điều kiện tỷ lệ tinh dầu: chất hoạt động bề mặt: nước là 6: 12: 82, thời gian siêu âm 20 phút. Với lượng nhũ tương sử dụng hàng ngày là 150 ml/kg thức ăn, các chỉ tiêu miễn dịch tăng cao nhất, tương ứng là $62,91 \times 10^6$ tế bào/ml máu, 219,60 mg protein tổng số/ml huyết thanh, hiệu giá ngưng kết huyết thanh là 2^{10} . Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* bằng phương pháp khuếch tán trong thạch cho kết quả: nhũ tương nano tinh dầu lá trầu không tạo vùng ức chế có đường kính là 22,1-22,25 mm, tinh dầu tạo vùng ức chế là 17,6-18,1 mm. Thử nghiệm hiệu quả của nhũ tương nano cho thấy: Tỷ lệ sống sót của tôm gây nhiễm với các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* V.HOU.01, V.HOU.02, V.HOU.03 ở các bể sử dụng nhũ tương so với các bể đối chứng dương tăng tương ứng là 62-56%. Kết quả nghiên cứu bước đầu kết luận rằng nhũ tương nano tinh dầu lá trầu không không chỉ có tác dụng phòng bệnh do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây nên mà còn kích thích tăng trưởng, tăng cường hiệu quả sử dụng thức ăn.

Từ khóa: Lá trầu không, nhũ tương nano, bệnh hoại tử gan tụy cấp tính AHPND, *V. parahaemolyticus*, tôm.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây trầu không (*Piper betle* L.) thuộc họ hồ tiêu Piperaceae, tinh dầu tách chiết từ lá trầu không có chứa các thành phần chủ yếu là phenolic và terpenoid, trong đó các hợp chất quan trọng, có hoạt tính khử trùng và kháng khuẩn là hydroxychavicol, chavibetol, eugenol và allylpyrocatechol. Trong lịch sử y học, lá trầu không là bộ phận được sử dụng và nghiên cứu rộng rãi. Thói quen ăn trầu ở nhiều nước được cho là có tác dụng tránh hôi miệng, làm chắc nướu và kích thích hệ tiêu hóa [1, 2]. Trong thực hành y học cổ truyền, các ứng dụng của lá trầu không đều có liên quan đến hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm,... [3], làm nước súc miệng [4] và điều trị các vấn đề về răng miệng, đau đầu, viêm khớp và đau khớp [1], chữa bệnh ngoài da [5].

Ở Việt Nam, lá trầu không được biết đến như một loại thuốc thảo dược có tác dụng sát khuẩn, tiêu viêm, long đờm, hạ sốt, điều trị ho, nhức đầu, hen suyễn, sát khuẩn vết thương bên ngoài, bỏng, mụn nhọt, chàm [1, 5]. Gần đây, lá cây trầu không đã được chứng minh có khả năng ức chế hiệu quả các loài vi khuẩn gây bệnh ở động vật thủy sản [1, 3, 4].

Hiện nay, nhũ tương nano đang được nghiên cứu với vai trò là chất mang, kích thước của nhũ tương nano giúp tăng thời gian lưu giữ thuốc và sinh khả dụng vì vậy hạn chế được sự thất thoát của thuốc. Nghiên cứu của Swathy và cs (2018) đã đề cập đến hiệu quả của nhũ tương nano tinh dầu hạt tiêu đen để phòng ngừa bệnh trên tôm sú (*Penaeus monodon*) do vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* gây nên với giá trị MIC là 0,234 µl/ml [6]. Cũng tác giả này đã chứng minh nhũ tương nano của tinh dầu lá neem đã mang lại hiệu quả phòng bệnh tốt ở cá chép (*Cyprinus carpio*) đối với vi khuẩn gây bệnh *Aeromonas culicicola* với MIC là 0,93 µl/mL [7]. Ravi và cs (2019) đã thử nghiệm thành công khả năng phòng bệnh của nhũ tương nano tinh dầu lá neem ở

¹ Trường Đại học Mở Hà Nội

² Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

³ Trường Đại học Vinh

*Email: minhngocnsh@hou.edu.vn

cá chêm (*Lates calcarifer*) gây nhiễm vi khuẩn *Vibrio anguillarum* [8]. Một nghiên cứu khác của Fatemeh và cs. (2020) đã chứng minh được cơ chế phòng bệnh của nhũ tương nano tinh dầu oải hương (*Lavandula officinalis*) trên cá hồi vân là tăng cường sự hình thành các tế bào máu và các thông số miễn dịch [9].

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích tạo được chế phẩm nhũ tương nano từ tinh dầu lá trầu không và bước đầu thử nghiệm đánh giá hiệu quả điều trị bệnh hoại tử gan tụy cấp tính AHPND ở tôm.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

- Lá trầu không thu hái từ các tỉnh vùng đồng bằng sông Hồng được rửa sạch, phơi khô và nghiền để tách tinh dầu.

- 3 chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* V.HOU.01, V.HOU.02, V.HOU.03 được phân lập từ tôm mắc bệnh hoại tử gan tụy cấp tính AHPND.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phương pháp tạo hạt nhũ tương nano

Quy trình tạo hạt nhũ tương nano gồm 2 bước, cụ thể như sau:

Bước 1: Trộn tinh dầu, nước và tween 80 với các tỷ lệ tinh dầu và tween 80 là 1: 1, 1: 2 và 1: 3. Hỗn hợp được trộn bằng máy khuấy từ với tốc độ 500 vòng/phút trong 10 phút.

Bước 2: Hỗn dịch được tạo nhũ tương bằng thiết bị siêu âm siêu tốc. Mỗi nồng độ được kiểm tra trước khi và sau khi siêu âm 5, 10, 15 và 20 phút.

2.2.2. Các phương pháp xác định đặc tính vật lý của nhũ tương nano

- Xác định kích thước hạt nano bằng thiết bị Zetasizer Nano ZS (ZEN3600) với bước sóng He-Ne là 633 nm. Trước khi đo, mẫu nhũ tương nano được lọc qua lưới lọc PTFE có kích thước lỗ lọc là 0,45 μm (Millipore Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Phép đo được thực hiện 3 lần ở nhiệt độ 25°C.

- Xác định độ nhớt của nhũ tương nano bằng thiết bị đo độ nhớt Brookfield, mẫu đo được gia nhiệt trong bể ổn nhiệt ở 25°C. Phép đo được thực hiện 3 lần.

- Xác định độ ổn định bằng phương pháp đánh giá mức độ phân tách pha sau ly tâm, nhũ tương

nano được bảo quản theo chu trình luân phiên ở nhiệt độ 25°C và 4°C trong thời gian 12 giờ/1 chu trình, sau mỗi chu trình nhũ tương được ly tâm ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong 15 phút. Quá trình được thực hiện với 3 chu trình liên tiếp.

2.2.3. Các phương pháp xác định tính kháng khuẩn

Chuẩn bị vi khuẩn kiểm định: mẫu vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường Nutrient Broth có bổ sung 2% NaCl trong tủ ẩm lắc ở 37°C, tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 24 giờ. Mật độ vi khuẩn có trong sinh khối 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.

Phương pháp khuếch tán đĩa thạch: 100 μl sinh khối vi khuẩn *V. parahaemolyticus* có mật độ là 10^6 CFU/ml được cấy trải trên bề mặt đĩa thạch có chứa môi trường Muller Hilton rồi đục lỗ thạch với kích thước 6-8 mm. Tiếp tục bổ sung vào các lỗ thạch dung dịch nhũ tương nano tinh dầu lá trầu không, mỗi lỗ thạch 50 μl . Ủ đĩa thạch trong tủ ẩm ở 37°C và quan sát mức độ ức chế vi khuẩn sau 24 giờ nuôi cấy. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Phương pháp đánh giá hiệu quả phòng AHPND của nhũ tương nano tinh dầu lá trầu không: tôm sú thí nghiệm có khối lượng trung bình 5 g, mỗi bể thí nghiệm gồm 50 cá thể, dung tích bể thí nghiệm là 400 lít. Tôm được nuôi trong nước biển sạch trong 4 tuần trước khi thực hiện thí nghiệm. Tinh dầu và nhũ tương nano từ tinh dầu lá trầu không được trộn với thức ăn của tôm cùng với lecithin rồi sử dụng cho tôm ăn trong vòng 20 phút kể từ khi phối trộn, cho tôm ăn 4 lần/ngày, đồng thời gây nhiễm tôm thí nghiệm bằng cách tiêm vào xoang bụng của đốt đầu tiên với sinh khối vi khuẩn *V. parahaemolyticus* có mật độ tương ứng liều LD₅₀.

Thí nghiệm này được thực hiện với 2 nhóm nghiệm thức, mỗi nghiệm thức bố trí 2 bể nuôi cụ thể như sau: nhóm nghiệm thức 1 thử nghiệm tinh dầu lá trầu không trên 6 bể nuôi tôm gây nhiễm với 3 chủng *V. parahaemolyticus* V.HOU.01, V.HOU.02, V.HOU.03, nghiệm thức 2 thử nghiệm nhũ tương nano tinh dầu lá trầu không với 6 bể nuôi tôm được gây nhiễm với cùng 3 chủng *V. Parahaemolyticus* nêu trên. Theo dõi thí nghiệm trong vòng 42 ngày.

Phương pháp xác định tế bào máu tổng số và nồng độ protein huyết thanh: Máu tôm được lấy từ xoang bụng của tôm (ở 2 nhóm nghiệm thức, mỗi nghiệm thức 15 con tôm) và đưa vào dung dịch chống đông máu Alsever (27 mM sodium citrate, 9 mM EDTA, 115 mM glucose, 336 mM NaCl, pH 7,2) và dung dịch formaldehyde 4%. Tế bào máu được đếm trực tiếp trong buồng Neubauer; nồng độ protein huyết thanh được thực hiện trong đĩa 96 giếng đáy phẳng và được tính toán bằng phương pháp Bradford với chất chuẩn là albumin huyết thanh của bò.

Phương pháp xác định khả năng gây kết tủa huyết thanh: 50 μ l dung dịch of TBS-2 (50 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, pH 7,4) được nhỏ vào đĩa 96 giếng, đáy chữ U cùng với 50 μ l huyết thanh tôm pha loãng theo hệ số 10 và 50 μ l dung dịch chứa 2% hồng cầu chó. Trộn đều hỗn dịch và ủ 2 tiếng ở nhiệt độ phòng. Hiệu giá ngưng kết huyết thanh được định nghĩa là nghịch đảo của độ pha loãng cuối cùng có khả năng ngưng kết hồng cầu.

Công thức tính các thông số sinh trưởng: Tỷ lệ tăng trọng= (khối lượng trung bình sau khi thí

nghiệm – khối lượng trung bình trước khi thí nghiệm)/tổng số ngày theo dõi thí nghiệm x 7.

Tỷ lệ chuyển đổi thức ăn (FCR)= tổng lượng thức ăn tiêu thụ/tổng khối lượng sinh khối tôm thu được sau thí nghiệm.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tạo dịch nano nhũ tương từ tinh dầu lá trầu không

Tinh dầu lá trầu không được tách chiết bằng phương pháp lôi cuốn hơi nước. Lá trầu không được nghiền nhỏ, tỷ lệ nước và lá trầu là 1:3 (w/v), nồng độ muối NaCl là 15%, thời gian chưng cất là 5 giờ. Bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước, lượng tinh dầu lá trầu không thu được là 18,98 ml/g, các thành phần chính của tinh dầu gồm có phenol 77,59% và eugenol 22,41%.

Bằng phương pháp siêu âm siêu tốc, với các tỷ lệ tinh dầu, chất hoạt động bề mặt Tween 80 và nước, kết quả tạo nhũ tương nano tinh dầu lá trầu không được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Kết quả tạo nhũ tương nano tinh dầu lá trầu không

Công thức thí nghiệm	Tỷ lệ tinh dầu và Tween 80 (v/v)	Tỷ lệ tinh dầu: Tween 80: Nước (%)	Thời gian siêu âm (phút)	Kích thước giọt nhũ tương (nm)	Độ nhớt của dịch nhũ tương (cP)
A1.1	1:1	6:6:88	0	253,5	3,33
A1.2	1:1	6:6:88	5	183,2	3,85
A1.3	1:1	6:6:88	10	76,8	3,92
A1.4	1:1	6:6:88	15	53,1	4,07
A1.5	1:1	6:6:88	20	45,4	4,11
B1.1	1:2	6:12:82	0	281,6	3,41
B1.2	1:2	6:12:82	5	197,2	3,63
B1.3	1:2	6:12:82	10	44,7	3,98
B1.4	1:2	6:12:82	15	39,5	4,11
B1.5	1:2	6:12:82	20	34,2	4,27
C1.1	1:3	6:18:76	0	272,2	3,59
C1.2	1:3	6:18:76	5	176,4	3,74
C1.3	1:3	6:18:76	10	34,7	4,28
C1.4	1:3	6:18:76	15	33,5	4,32
C1.5	1:3	6:18:76	20	31,2	4,41

Kết quả trong bảng 1 chỉ ra rằng: kích thước hạt nhũ tương tỷ lệ nghịch với nồng độ chất hoạt động bề mặt và thời gian siêu âm. Cụ thể, thời gian siêu âm 20 phút, đường kính giọt ở các công thức thí nghiệm đạt kích thước nhỏ nhất là 55,4 nm, 33,2 nm và 31,2 nm, tương ứng với tỷ lệ dầu và chất hoạt động bề mặt là 1: 1, 1: 2 và 1: 3; đồng thời, nếu xét các công

thức tỷ lệ dầu và chất hoạt động bề mặt là 3:1 thì đường kính giọt nano đạt kích thước nhỏ nhất. Bên cạnh đó, theo D. Morwanti (2006) [10], vật liệu có độ nhớt càng cao thì càng ổn định do mật độ hạt trong vật liệu tương đối dày và sự chuyển động của các hạt này có xu hướng khó khăn hơn. Số liệu ở bảng 1 cho thấy, ở công thức thí nghiệm B1.5 (tỷ lệ tinh dầu:

chất hoạt động bề mặt: nước là 6: 12: 82) và C1.5 (tỷ lệ tinh dầu: chất hoạt động bề mặt: nước là 6: 18: 76), sau thời gian siêu âm 20 phút, nhũ tương nano tinh dầu có dạng trong suốt, không tạo hiện tượng tách lớp khi ly tâm ở tốc độ cao trong thời gian dài.

Theo Nirmala và cs (2020) [9], sự gia tăng thời gian siêu âm sẽ làm tăng năng lượng đầu vào và gây phá vỡ giọt tinh dầu thành các giọt nano có diện tích bề mặt lớn hơn, làm tăng tính thấm của các hợp chất hoạt tính qua màng mạch máu và mô. Cùng với độ nhớt, pH của dịch nhũ tương cũng là yếu tố ảnh hưởng trực tiếp tới cơ chế phân phối thuốc trong cơ thể động vật sử dụng, pH của các dịch nano tinh dầu lá trầu không được tạo thành từ 2 công thức nghiệm B1.5 và C1.5 tương ứng là 5,85 và 6,01. Kết quả thu được cho phép kết luận, nồng độ chất hoạt động bề mặt và thời gian siêu âm là những yếu tố quyết định sự ổn định của nhũ tương nano, điều kiện thích hợp để tạo nhũ tương nano tinh dầu lá trầu không là: tỷ lệ tinh dầu: chất hoạt động bề mặt: nước là 6: 12: 82, thời gian siêu âm 20 phút.

3.2. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nhũ tương nano tinh dầu lá trầu không đến các chỉ số miễn dịch của tôm

Hệ thống miễn dịch của giáp xác nói chung và của tôm nói riêng chủ yếu dựa vào đáp ứng miễn dịch tự nhiên, khả năng đề kháng với các tác nhân gây bệnh có liên quan chủ yếu tới các thành phần như tế bào máu, hàm lượng protein tổng số, khả năng gây ngưng kết huyết thanh, hoạt tính của phenoloxidase, khả năng tạo ra hợp chất kháng khuẩn superoxid [11]. Trong nghiên cứu này, hiệu quả tăng cường miễn dịch của nhũ tương nano tinh dầu lá trầu không đối với tôm sú được đánh giá thông qua các chỉ tiêu tế bào máu tổng số, hàm lượng protein tổng số, khả năng gây ngưng kết huyết thanh.

Nhìn chung nhũ tương nano tinh dầu lá trầu không có ảnh hưởng đến miễn dịch tự nhiên của tôm theo chiều hướng làm tăng tế bào máu tổng số, hàm lượng protein tổng số và hiệu quả ngưng kết huyết thanh (Bảng 2). Tôm được sử dụng lượng nhũ tương là 150 ml/kg có kết quả các chỉ tiêu miễn dịch theo dõi tăng cao nhất, tương ứng là $62,91 \times 10^6$ tế bào/ml máu, 219,60 mg protein tổng số/ml huyết thanh, hiệu giá ngưng kết huyết thanh là 2^{-10} . Kết quả này được lựa chọn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo

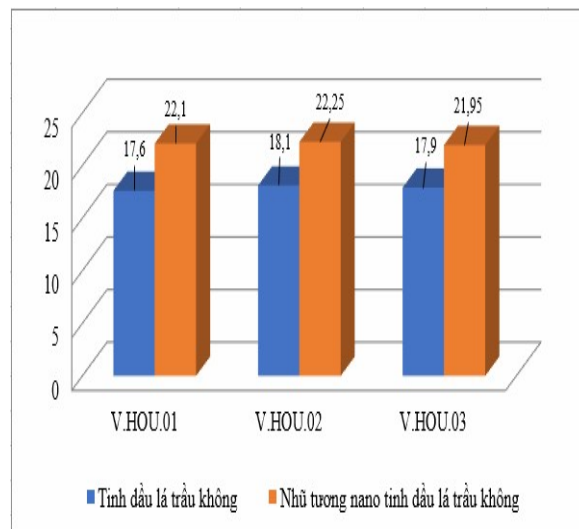
về khả năng phòng bệnh của nhũ tương đối với bệnh do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây nên.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nhũ tương nano tinh dầu lá trầu không đến một số chỉ số miễn dịch của tôm

STT	Tỷ lệ tinh dầu/kg thức ăn	Tế bào máu tổng số ($\times 10^6$ tế bào/ml máu)	Protein huyết thanh (mg/ml huyết thanh)	Hiệu giá ngưng kết huyết thanh (log 2)
1	50 ml/kg	49,95	208,23	9
2	100 ml/kg	56,13	212,75	10
3	150 ml/kg	62,91	219,50	10
4	200ml/kg	58,12	211,60	10
5	Đối chứng	50,26	205,15	9

3.3. Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của nhũ tương nano tinh dầu lá trầu không bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch

3 chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* ký hiệu là V.HOU.01, V.HOU.02, V.HOU.03 gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính ở tôm được sử dụng để đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn của nano tinh dầu lá trầu không bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch, mật độ vi khuẩn thử nghiệm là 10^8 CFU/ml, kết quả thử nghiệm được thể hiện trong hình 1.



Hình 1. Kết quả đánh giá mức độ ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của tinh dầu và nhũ tương nano tinh dầu lá trầu không

Nhìn chung, nhũ tương nano tinh dầu lá trầu không cho hiệu quả ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* mạnh hơn so với tinh dầu, cụ thể, tinh dầu lá trầu không tạo vùng ức chế trong khoảng

17,6-18,1 mm, trong khi đó nhũ tương nano tạo vùng ức chế có đường kính là 22,1-22,25 mm, mức độ gây ức chế vi khuẩn của tinh dầu và nhũ tương nano là tương tự nhau ở các chủng khác nhau. Nghiên cứu của Neves và cs (2004) [13], Gilles và cs (2010) [12] chỉ ra rằng, sự khuếch tán của tinh dầu chậm hơn so với nhũ tương nano dẫn tới hiệu quả ức chế vi khuẩn kém hơn, bên cạnh đó, ảnh hưởng của cấu trúc màng vi khuẩn có liên quan tới sự nhạy cảm với tinh dầu thực vật, các kết quả trên phù hợp với kết quả của nghiên cứu này.

Với kết quả thử nghiệm ức chế vi khuẩn *V. parahaemolyticus* của tinh dầu và nhũ tương nano tinh dầu lá trầu không có thể thấy, nhũ tương có tiềm năng tốt trong phòng và điều trị bệnh hoại tử gan tụy cấp tính ở tôm.

3.4. Đánh giá hiệu quả phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp tính ở tôm của nhũ tương nano tinh dầu lá trầu không

Bảng 3. Kết quả thử nghiệm nhũ tương nano tinh dầu lá trầu không ở tôm

Thí nghiệm		Tỷ lệ sống sót (%)	Tăng trưởng bình quân/tuần (g)	Hệ số chuyển đổi thức ăn
Đối chứng dương (tôm gây nhiễm, không sử dụng nhũ tương)	V.HOU.01	16,00	1,66	1,33
	V.HOU.02	22,00	1,67	1,33
	V.HOU.03	26,00	1,68	1,35
Thí nghiệm (tôm gây nhiễm, sử dụng nhũ tương hàng ngày)	V.HOU.01	78,00	1,87	1,39
	V.HOU.02	78,00	1,89	1,40
	V.HOU.03	82,00	1,87	1,39
Đối chứng nhũ tương (tôm không gây nhiễm)		100,00	1,94	1,45
Đối chứng âm (tôm không gây nhiễm, không sử dụng nhũ tương)		100,00	1,93	1,42

Kết quả trong bảng 3 cho thấy nhũ tương nano tinh dầu lá trầu không có hiệu quả phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp tính AHPND do chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây ra ở tôm sú, so sánh tỷ lệ sống sót ở các bể đối chứng dương gây nhiễm với các chủng vi khuẩn V.HOU.01, V.HOU.02, V.HOU.03 và các bể thí nghiệm tương ứng là 16, 22, 26% và 78, 78, 82%, tỷ lệ sống của tôm ở các bể thí nghiệm so với các bể đối chứng dương tăng tương ứng là 62-56%; cùng với đó, tỷ lệ tăng trọng bình quân theo tuần và hệ số sử dụng thức ăn ở các bể thí nghiệm tôm sử dụng nhũ tương nano tinh dầu lá trầu không hàng ngày cũng cao hơn đáng kể so với đối chứng dương. Số liệu thu được trong bảng 3 cho phép bước đầu kết luận rằng nhũ tương nano tinh dầu lá trầu không

Thí nghiệm đánh giá hiệu quả phòng bệnh của nhũ tương nano tinh dầu lá trầu không được thực hiện trên tôm sú có khối lượng trung bình 5 g/con, lượng nhũ tương tinh dầu lá trầu không bổ sung vào thức ăn hàng ngày là 150 ml/kg, tôm được gây bệnh với 3 chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* ký hiệu là V.HOU.01, V.HOU.02, V.HOU.03 có LD₅₀ tương ứng là 2,6x10⁸, 2,7x10⁶, 2,6x10⁵ CFU/ml. Bể đối chứng dương, tôm gây nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* mà không sử dụng nhũ tương; bể đối chứng âm, tôm không gây nhiễm với vi khuẩn và không sử dụng nhũ tương; bể đối chứng nhũ tương, tôm không gây nhiễm với vi khuẩn và sử dụng nhũ tương với hàm lượng 150 ml/kg thức ăn, cho ăn hàng ngày. Thí nghiệm được theo dõi trong 6 tuần, các giá trị theo dõi bao gồm: tỷ lệ sống sót, tỷ lệ tăng trọng và hệ số chuyển đổi thức ăn.

không chỉ có tác dụng phòng bệnh do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây nên mà còn kích thích tăng trưởng, tăng cường hiệu quả sử dụng thức ăn, kết quả này tương đương với nghiên cứu của Lemos và cs (2017) [14] đối với hiệu quả của xạ hương ở tôm sú.

4. KẾT LUẬN

Nhũ tương nano được tạo thành từ tinh dầu lá trầu không với kỹ thuật siêu âm siêu tốc có khả năng phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp tính AHPND do chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây nên. Tuy nhiên, để có thể ứng dụng trong nuôi tôm sú, chế phẩm cần được đánh giá thêm về độ bền, liều lượng sử dụng, các yếu tố môi trường ảnh hưởng đến hiệu quả phòng bệnh.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo, mã số B2019-MHN-03.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi (2003). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học.
2. Đỗ Thị Hòa, Bùi Quang Tề, Nguyễn Hữu Dũng và Nguyễn Thị Muội (2004). *Bệnh học thủy sản*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
3. Đặng Thị Lua, Nguyễn Thị Hạnh, Hoàng Hải Hà, Trương Thị Mỹ Hạnh, Phan Thị Vân (2015). Tác dụng diệt khuẩn *in vitro* của dịch chiết lá trầu không (*Piper betle* L.) và dịch chiết lá ổi (*Psidium guajava*) đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm nuôi nước lợ. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 11: 106-113.
4. Huỳnh Kim Diệu và Nguyễn Thành Văn (2011). Sự thuần chủng và hoạt tính kháng khuẩn của cây trầu không (*Piper betle*) và cây Lót (*Piper lolot*) ở đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 17b: 282-288.
5. Shameem P. M. D., Thirumal M. B. (2013). *A preliminary antimicrobial screening on leaves of Piper betle Linn*. Contemporary Investigations and Observations in Pharmacy, 2(1): 22-26.
6. Swathy J. S., Prabhakar, Mishra, Thomas, John, Amitava, Mukherjee, et al. (2018). Antimicrobial potency of high-energy emulsified black pepper oil nanoemulsion against aquaculture pathogen. *Aquaculture* 491, Issue: 2, Extent: 210-220.
7. Jalaja Somasekharan Swathy, Prabhakar Mishra, John Thomas, Amitava Mukherjee, Natarajan Chandrasekaran (2014). Nanometric neem oil emulsification through microfluidization and its therapeutic potential against *Aeromonas culicicola* infection in *Cyprinus carpio*. *Flavor and fragrance journal*.
8. Ravi M., Sudhakar T., Sudhakaran R., Parameswaran V. & Thyagarajan R. (2019). Antibacterial property of neem nanoemulsion against *Vibrio anguillarum* infection in Asian sea bass (*Lates calcarifer*). *Indian Journal of Geo Marine Sciences* Vol. 48 (08), pp. 1222-1226.
9. Joyce Nirmala M., Durai Latha, Gopakumar Vineet, Nagarajan Ramamurthy (2020). Preparation of Celery Essential Oil-Based Nanoemulsion by Ultrasonication and Evaluation of Its Potential Anticancer and Antibacterial Activity. *International Journal of Nanomedicine* 2020:15 7651-7666).
10. Dewi Sondari and Silvester Tursiloadi (2018). *The effect of surfactan on formulation and stability of nanoemulsion using extract of Centella Asiatica and Zingiber Officinale*. AIP Conference Proceedings, Volume 2049, Issue 1.
11. Söderhäll, K., L. Cerenius (1992). Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases*, pp. 3-23.
12. Gilles, M., Zhao, J., Na, M., Agboola, S. (2010). Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chemistry*, 119(2): 731-737.
13. Nevas, M., Korhonen, A. R., Lindström, M., Turkki, P., Korkeala, H. (2004). Antibacterial efficiency of Finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. *Journal of Food Protection*, 67(1): 199-202.
14. Lemos, M. F., Lemos, M. F., Pacheco, H. P., Guimarães, A. C., Fronza, M., Endringer, D. C., Scherer, R. (2017). Seasonal variation affects the composition and antibacterial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris*. *Industrial Crops and Products*, 95: 543-548).

RESEARCH ON PREPARATION OF NANO-EMULSIONS FROM ESSENTIAL OIL OF BETEL LEAF (*Piper betle* L.) FOR PREVENTION OF ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS SYNDROME EMS/AHPND IN SHRIMP**Mai Thi Minh Ngoc¹, Nguyen Thi Thu Hien¹,****Vu Thi Bích Huyền², Bui Thi Hai Hoa¹, Le Minh Hai³**¹*Hanoi Open University*²*Hanoi National University of Education*³*Vinh University***Summary**

Betel leaf with strong antibacterial activity has been widely used to prevent diseases for humans and domestic animals. In this study, nano-emulsion was prepared from essential oil of betel leaf for prevention of acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPND) in shrimp. The product is formed in the condition that the ratio of essential oil: surfactant: water is 6: 12: 82, ultrasonic time 20 minutes. With the daily use of the nano-emulsion 150ml/kg feed, the immunological parameters of shrimp increased the highest, respectively 62.91×10^6 haemocytes/ml blood, 219.60 mg total protein/ml serum, serum agglutination titer 2^{10} . By the diffusion in agar method, the inhibition of *V. parahaemolyticus* showed that, nano-emulsions of betel leaf essential oil created an inhibitory zone with a diameter of 22.1-22.25 mm, essential oil is 17.6-18.1 mm, respectively. The effectiveness of the nanoemulsion in shrimp showed that the survival rate of shrimp infected with *V. parahaemolyticus* strains V.HOU.01, V.HOU.02, V.HOU.03 using emulsion daily compared with positive control tanks increased by 62-56%. The results of the study initially concluded that nano-emulsion of betel leaf essential oil not only has the effect of preventing the acute hepatopancreatic necrosis syndrome caused by *V. parahaemolyticus* but also stimulates growth and enhances feed efficiency.

Keywords: *Piper betle* L., nanoemulsion, acute hepatopancreatic necrosis syndrome, *V. parahaemolyticus*, shrimp.

Người phản biện: TS. Lê Hồng Phước**Ngày nhận bài: 15/4/2022****Ngày thông qua phản biện: 17/5/2022****Ngày duyệt đăng: 24/5/2022**