

**Khảo sát nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của cao thô chiết xuất từ một số thảo dược đối với *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium và *Staphylococcus aureus***

**Minimum inhibitory concentration (MIC) determination of herbal extracts against *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, and *Staphylococcus aureus***

Phạm Trọng Vũ, Nguyễn Trí Tuệ, Trần Thị Thúy Nga,  
Trần Vũ, Lê Bá Thị Hiền, Trần Thanh Tiến và Võ Thị Trà An  
Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

**THÔNG TIN BÀI BÁO**

Ngày nhận: 29/12/2017  
Ngày chấp nhận: 24/01/2018

**Từ khóa**

Chè xanh  
Cỏ mực  
Hoàn ngọc  
Ổi  
Sầu đâu (neem)

**Keywords**

*Azadirachta indica*  
*Camellia sinensis*  
*Eclipta prostrata* L.  
*Pseuderanthemum palatiferum*  
*Psidium guajava*

**Tác giả liên hệ**

Trần Thanh Tiến  
Email: tien.tranthanh@hcmuaf.edu.vn

**TÓM TẮT**

Mục tiêu của nghiên cứu là xác định nồng độ ức chế tối thiểu của cao thô chiết từ 5 loại thảo dược phổ biến ở Việt Nam (chè xanh, cỏ mực, hoàn ngọc, ổi, sầu đâu (neem)) đối với *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bằng phương pháp pha loãng tối hạn (Irith và ctv, 2008). Những kết quả này sẽ làm cơ sở để ứng dụng các loại dược liệu trên trong phòng và trị bệnh cho vật nuôi. Kết quả của nghiên cứu cho thấy, MIC của cao chiết từ lá chè xanh đối với *E.coli*, *S. Typhimurium* và *S. aureus* lần lượt là 8 - 16mg/ml, 8 - 16mg/ml, 0,5mg/ml; MIC của cao chiết từ lá cỏ mực đối với *E.coli*, *S. Typhimurium* và *S. aureus* lần lượt là 16mg/ml, 16mg/ml, 1 - 2mg/ml; MIC của cao chiết từ lá hoàn ngọc đối với *E.coli*, *S. Typhimurium* và *S. aureus* lần lượt là 8mg/ml, 4 - 8mg/ml, 2 - 4mg/ml, MIC của cao chiết từ lá ổi đối với *E.coli*, *S. Typhimurium* và *S. aureus* lần lượt là 16mg/ml, 16mg/ml, 0,125 - 0,25mg/ml; MIC của cao chiết từ lá chè xanh đối với *E.coli*, *S. Typhimurium* và *S. aureus* là lớn hơn 16mg/ml.

**ABSTRACT**

The objective of this study was to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of crude extract from five medical herbs in Vietnam (*Camellia sinensis*, *Eclipta prostrata* L., *Pseuderanthemum palatiferum*, *Psidium guajava*, *Azadirachta indica*) against *Escherichia coli* ATCC25922, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 by macro - dilution method (Irith et al., 2008). These results were the basis for the application of these herbs in the prevention and treatment of diseases in animals. The results showed that MICs of *Camellia sinensis* against *E.coli*, *S. Typhimurium*, and *S. aureus* were 8 - 16mg/ml, 8 - 16mg/ml, 0.5mg/ml respectively; MICs of *Eclipta prostrata* L. against *E.coli*, *S. Typhimurium*, and *S. aureus* were 16mg/ml, 16mg/ml, 1 - 2mg/ml respectively; MICs of *Pseuderanthemum palatiferum* against *E.coli*, *S. Typhimurium* and *S. aureus* were 8mg/ml, 4 - 8mg/ml, 2 - 4 mg/ml respectively; MICs of *Psidium guajava* against *E.coli*, *S. Typhimurium* and *S. aureus* were 16mg/ml, 16mg/ml, 0,125 - 0,25mg/ml respectively and MICs of *Azadirachta indica* against *E.coli*, *S. Typhimurium*, and *S. aureus* were more than 16mg/ml.

## 1. Đặt Vấn Đề

Trong một thời gian dài, việc sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi được xem mang lại nhiều hiệu quả trong phòng và điều trị bệnh. Ngoài ra, việc sử dụng các kháng sinh phổ rộng trong thức ăn với liều lượng thấp còn cho rằng có hiệu quả kích thích tăng trọng (Gustafson và ctv, 1997). Điều này dẫn đến tình trạng tồn dư kháng sinh trong các sản phẩm chăn nuôi (thịt, sữa, trứng...) và tạo ra những chủng vi khuẩn đề kháng kháng sinh (Madhab, 2014).

Chính vì vậy, nhiều giải pháp được đưa ra nhằm thay thế vai trò của kháng sinh trong phòng trị bệnh như vaccin, probiotic, chiết xuất thực vật... Các giải pháp này nhằm mục tiêu làm giảm tác dụng phụ do kháng sinh gây ra hoặc làm giảm hậu quả của tình trạng lạm dụng kháng sinh như tồn dư kháng sinh, sự đề kháng kháng sinh của vi khuẩn...nhưng vẫn đảm bảo sức khỏe và tăng trưởng cho vật nuôi. Trong đó, việc ứng dụng các hoạt chất có nguồn gốc thiên nhiên đang được xem là các giải pháp tốt nhằm nâng cao năng suất, chất lượng và sức khỏe vật nuôi (Nguyễn Thị Kim Loan, 2012; Đỗ Huy Bích và ctv, 2004).

Việt Nam có khí hậu nhiệt đới nên có nguồn dược liệu phong phú và đa dạng về chủng loại. Do đó, tiềm năng ứng dụng các loại thảo dược trong chăn nuôi thú y là rất lớn. Mục tiêu của nghiên cứu là xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của cao thô chiết từ 5 loại thảo dược phổ biến ở Việt Nam (sầu đâu, hoàn ngọc, chè, ổi, cỏ mực) trên một số vi khuẩn gây bệnh nhằm làm cơ sở cho việc ứng dụng các loại thảo dược này trong phòng và trị bệnh trên vật nuôi.

## 2. Vật Liệu Và Phương Pháp Nghiên Cứu

### 2.1. Cao chiết thô các loại thảo dược

Các thảo dược sau khi thu hái từ Bà Rịa – Vũng Tàu (hoàn ngọc, ổi, cỏ mực), Bình Thuận (sầu đâu), Lâm Đồng (chè) sẽ được làm sạch, để trong bóng râm, thoáng gió cho ráo nước sau đó xay nhuyễn. Cân 250 gam thảo dược cho vào 750ml nước cất, khuấy đều và đun cách thủy trong 3 giờ sau đó thu dịch lọc. Dịch lọc được làm cô đặc lại bằng hệ thống cô quay chân không (thu nhận cao thô). Cao thô được bảo quản trong lọ kín ở nhiệt độ 2-4°C.

### 2.2. Gốc vi khuẩn dùng trong nghiên cứu

Các chủng vi khuẩn được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Vo và ctv, 2010) và *Salmonella* Typhimurium phân lập từ đường ruột heo bệnh (Vo và ctv, 2007). Các gốc vi khuẩn này từ ống giữ gốc trong glycerol ở -20°C được tăng sinh trong môi trường Brain Heart Infusion (BHI), (Oxoid, CM1135, Anh) và ủ ở 37°C trong 24 giờ trước khi cấy trên các môi trường chuyên biệt.

- *E. coli* ATCC 25922: Vi khuẩn sau khi tăng sinh trong BHI được cấy trên thạch Eosin Methylene Blue (EMB), (CM0069, Oxoid, Anh) và ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó, những khuẩn lạc rời có màu tím ánh kim sẽ được chọn để cấy ria lên thạch Nutrient (NA), (CM0003, Oxoid, Anh) để thu lấy khuẩn lạc rời.

- *Salmonella* Typhimurium: Sau khi tăng sinh trong BHI, canh khuẩn tiếp tục được cấy ria lên thạch Xylose Lysine Deoxycholate (XLD), (CM0469, Oxoid, Anh) và ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó, những khuẩn lạc rời có màu đỏ, tâm đen sẽ được chọn để cấy ria lên thạch NA để thu lấy khuẩn lạc rời.

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923:

Vi khuẩn sau khi tăng sinh được cấy trên thạch máu (BA), (MI092AP, Nam Khoa, Việt Nam) và ủ ở 37°C trong 24 giờ. Chọn những khuẩn lạc rời, nhẵn, đục, màu vàng nhạt và có vòng dung huyết đôi để cấy ria lên thạch NA để thu lấy khuẩn lạc rời.

Khuẩn lạc rời của mỗi loại vi khuẩn thu trên bề mặt thạch NA được đánh tan vào nước muối sinh lý vô trùng để đạt nồng độ vi khuẩn khoảng 10<sup>8</sup> CFU/ml bằng cách so màu với độ đục chuẩn Mac Farland 0,5. Pha loãng dung dịch canh khuẩn này 100 lần để đạt nồng độ vi khuẩn khoảng 10<sup>6</sup> CFU/ml bằng môi trường MHB (Irith và ctv, 2008). Nồng độ vi khuẩn này sẽ được kiểm chứng sau đó bằng cách cấy trang lên môi trường thạch dinh dưỡng để đếm số lượng khuẩn lạc (Irith và ctv, 2008).

### 2.3. Kháng sinh chuẩn đối chứng

Các kháng sinh đối chứng đối chứng dùng trong thí nghiệm bao gồm amoxicillin (tinh khiết 99%) (UV, Việt Nam), colistin sulfate (tinh khiết

99%) (UV, Việt Nam), enrofloxacin (tinh khiết 99%) (UV, Việt Nam). Amoxicillin được hòa tan bằng dung dịch đệm phosphate pH 6.0; 0,1 mol/l; colistin sulfate được hòa tan bằng nước và enrofloxacin cũng được hòa tan trong nước nhưng phải được kiềm hóa bằng NaOH 0,1 mol/l (Victor, 2005). Các kháng sinh sau khi hòa tan trong dung môi tạo thành dung dịch gốc có nồng độ là 1mg/ml. Mỗi loại dung dịch kháng sinh gốc này sẽ tiếp tục được pha loãng 100 lần trước khi pha loãng thành dãy các nồng độ giảm dần theo cấp số 2 từ 10 $\mu$ g/ml đến 0,01  $\mu$ g/ml bằng Muller Hinton Broth (MHB), (CM0405, Oxoid, Anh) (Irith và ctv, 2008).

#### 2.4. Phương pháp xác định MIC

Cần chính xác 32mg mỗi loại cao thảo dược hòa tan vào 1ml nước cất, sau đó pha loãng các cao này bằng môi trường MHB (Muller Hinton Broth - Oxoid) tạo thành 1 dãy 11 ống chứa dung dịch cao thô (mỗi ống chứa 1ml) có nồng độ giảm dần theo cấp số 2 (Irith và ctv, 2008) với các nồng độ lần lượt là: 32mg/ml; 16mg/ml; 8mg/ml; 4mg/ml; 2mg/ml; 1 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,125 mg/ml; 0,0625 mg/ml; 0,03125 mg/ml. Các ống chứa cao pha loãng này sau đó được hấp tiệt trùng ở 121 $^{\circ}$ C trong 15 phút.

Giá trị MIC của 1 loại thảo dược đối với 1 loại vi khuẩn được xác định bằng phương pháp pha loãng tới hạn (Irith và ctv 2008). Cho 1ml vi khuẩn (khoảng 10 $^6$  CFU/ml) lần lượt vào các dãy ống có chứa 1ml loại thảo dược với nồng độ giảm dần. Đồng thời thêm 1ml môi trường MHB vô trùng thay cho vi khuẩn ở dãy ống đối chứng (Irith và ctv, 2008). Như vậy, sau khi thực hiện pha loãng, nồng độ thảo dược trong các ống giảm đi một nửa so với lúc đầu và nồng độ vi khuẩn cuối cùng trong ống vào khoảng 5x10 $^5$  CFU/ml. MIC của kháng sinh đối chứng đối chứng (amoxicillin, colistin, enrofloxacin) cũng được thực hiện tương tự như trên. Tất cả các ống sau đó được ủ ở 37 $^{\circ}$ C trong 16-24 giờ. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

Giá trị MIC được định nghĩa là nồng độ thấp nhất của chất có hoạt tính kháng khuẩn (trong 1ml) mà có khả năng ức chế sự phát triển của vi sinh vật trong điều kiện xác định (Irith và ctv, 2008).

### 3. Kết Quả Và Thảo Luận

#### 3.1. Nồng độ ức chế tối thiểu của các loại thảo dược

Thử nghiệm xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các 5 loại thảo dược được xác định bằng phương pháp pha loãng tới hạn. Kết quả nồng độ ức chế tối thiểu của 5 loại thảo dược và 3 loại kháng sinh đối với 3 chủng vi khuẩn được trình bày trong Bảng 1 và Bảng 2.

- Nồng độ ức chế tối thiểu của cao thô chè xanh:

Kết quả của nghiên cứu cho thấy nồng độ ức chế tối thiểu của cao chiết thô của chè xanh đối với hai chủng vi khuẩn *E. coli* và *Salmonella* dao động từ 8 – 16 mg/ml. Khả năng kháng khuẩn này tương đương với amoxicillin (2,5  $\mu$ g/ml), colistin (0,16  $\mu$ g/ml) và enrofloxacin (0,01  $\mu$ g/ml). Nghiên cứu khác của Amber và ctv (2015) xác định nồng độ ức chế tối thiểu của cao chiết bằng nước từ lá chè xanh đối với *E. coli* ATCC 25922 và *S. Typhi* ATCC 13311 là 3,12 mg/ml; trong khi cao chiết bằng methanol của loại thảo dược này có nồng độ ức chế tối thiểu đối với *E. coli* ATCC 25922 và *S. Typhi* ATCC 13311 lần lượt là 5 mg/ml và 2,5 mg/ml. MIC của cao chiết bằng methanol từ lá chè xanh đối với *E. coli* và *S. Typhi* lần lượt 40 $\mu$ g/ml và 60  $\mu$ g/ml là (Archana và ctv, 2011). Kết quả nghiên cứu của Tiwari và ctv (2005) cũng xác định được nồng độ ức chế tối thiểu của dịch chiết từ chè đối với *E. coli* là 88,3 mg/ml; đối với *S. Typhi* và *S. Typhimurium* 1402/84 lần lượt là 79,56 mg/ml và 94,61 mg/ml.

Kết quả ở Bảng 1 còn cho thấy nồng độ ức chế tối thiểu cao chiết từ chè xanh đối với *S. aureus* ATCC 25923 là 0,5mg/ml. Kết quả này khá tương đồng với nghiên cứu của Maksum và ctv (2013), nhóm tác giả cũng khẳng định giá trị MIC của dịch chiết chè xanh đối với *S. aureus* là 0,4mg/ml. Một nghiên cứu khác của Aboulmagd (2011) cũng ghi nhận được nồng độ ức chế tối thiểu đối với *S. aureus* ATCC 25923 là 0,78mg/ml.

- Nồng độ ức chế tối thiểu của cao thô hoàn ngọc:

Từ Bảng 1, cho thấy hoàn ngọc thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với *S. Typhimurium* tương đối mạnh hơn so với *E. coli*. Quang và ctv (2013)

**Bảng 1.** Nồng độ ức chế tối thiểu của các loại thảo dược

Tên thảo dược	Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) (mg/ml)		
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Chè	8 - 16	8 - 16	0,5
Cỏ mực	16	16	1 - 2
Hoàn ngọc	8	4 - 8	2 - 4
Ổi	16	16	0,125 - 0,25
Sầu đầu (neem)	>16	>16	>16

**Bảng 2.** Nồng độ ức chế tối thiểu của các kháng sinh đối chứng

Loại kháng sinh	Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) ( $\mu$ g/ml)		
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Amoxicillin	2,5	1,25	0,31
Colistin	0,16	0,16	5
Enrofloxacin	0,01	0,01	0,04

kháng định dịch chiết của từ cây hoàn ngọc có khả năng ức chế sự phát triển của *E. coli* ở nồng độ 1,25 mg/ml thấp hơn 6,4 lần so với kết quả của nghiên cứu này. Nghiên cứu khác của Bongkot và ctv (2009) cho thấy dịch chiết nước của hoàn ngọc có nồng độ ức chế tối thiểu đối với *Salmonella* phân lập từ heo và người là 0,78%. Kết quả ở Bảng 1 còn cho thấy, cao chiết thô từ lá hoàn ngọc có nồng độ ức chế tối thiểu đối với *S. aureus* ATCC 25923 dao động từ 2-4 mg/ml tương đương amoxicillin (0,31  $\mu$ g/ml), colistin (5  $\mu$ g/ml) và enrofloxacin (0,04  $\mu$ g/ml).

- Nồng độ ức chế tối thiểu của cao thô cỏ mực và lá ổi:

Ngoài ra, từ kết quả Bảng 1 thấy rằng, MIC của cao thô cỏ mực đối với *S. aureus* ATCC 25923 dao động từ 1- 2mg/ml; trong khi MIC của cao thô lá ổi đối với chủng vi khuẩn này là 0,125 – 0,25 mg/ml, kết quả này thấp hơn so với công bố của Neviton và ctv (2005). Nghiên cứu của Manoj và ctv (2011) cũng xác định được giá trị MIC của cao chiết từ cỏ mực đối với *S. aureus* lớn hơn 0,7 mg/ml.

- Nồng độ ức chế tối thiểu của cao thô sầu đầu (neem):

Dịch chiết lá sầu đầu (neem) cho thấy nồng độ ức chế tối thiểu đối với cả ba chủng vi khuẩn thử nghiệm là lớn hơn 16 mg/ml. Kết quả này cao hơn nồng độ ức chế tối thiểu của cao chiết bằng nước từ lá sầu đầu (neem) đối với *S. aureus* được công bố bởi Raja và ctv (2013) là 0,5mg/ml. Nghiên cứu của Maragathavalli và ctv (2012) không ghi

nhận được hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết từ lá sầu đầu (neem) đối với cả *E. coli* và *S. Typhimurium*.

#### 4. Kết Luận Và Đề Nghị

Nghiên cứu đã bước đầu xác định cao thô chiết từ lá chè, cỏ mực, hoàn ngọc và ổi có khả năng chống 3 vi khuẩn thử nghiệm với các giá trị MIC từ 0,125 – 16mg/ml. Đặc biệt, giá trị MIC của các cao thảo dược thấp nhất đối với *S. aureus* ATCC 25923. Các loại dược liệu này rất phổ biến, dễ tìm ở Việt Nam, do vậy tiềm năng ứng dụng các loại dược liệu này trong phòng và trị bệnh cho vật nuôi là rất lớn. Tuy nhiên cần nghiên cứu thêm hoạt tính kháng khuẩn của các loại dược liệu này trên các nhóm vi khuẩn khác nhằm làm tăng thêm cơ sở dữ liệu phục vụ cho nghiên cứu và ứng dụng. Ngoài ra, các nghiên cứu về độc tính của các loại dược liệu này cũng rất cần thiết.

#### Lời Cảm Ơn

Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn quý nghiên cứu Khoa học và Công nghệ, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh đã tài trợ cho nghiên cứu này.

#### Tài Liệu Tham Khảo

- [1] Aboulmagd, E., Al-Mohammed, H. I., and Al-Badry, S., 2011. *Synergism and*

- post antibiotic effect of green tea extract and imipenem against methicillin resistant Staphylococcus aureus.* Journal of Microbiology. 1, 89–96. DOI: 10.3923/mj.2011.89.96
- [2] Addison J.B., 1984. *Review: Antibiotic in sediment and run-off water from feedlots.* Residue 92: 1-28.
- [3] Amber Farooqui, Adnan Khan, Ilaria Borghetto, Shahana U. Kazmi, Salvatore Rubino, Bianca Paglietti, 2015. *Synergistic Antimicrobial Activity of Camellia sinensis and Juglans regia against Multidrug-Resistant Bacteria.* Plos One, 10.1371.
- [4] Bongkot Noppon, Sunpetch Angkititrakul, Natchaya Pocapanich, Wisarut Muangpurn, 2009. *Inhibitory and bactericidal effects of Pseuderanthemum palatiferum and Piper betle L. leaves extracts against Salmonella species.* KKV. Veterinary Journal. Vol. 19 No. 2, 171-179.
- [5] Đỗ Huy Bích, 2006. *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, Tập I.* Nhà Xuất Bản Khoa Học Kỹ Thuật, Hà Nội, 404 – 419.
- [6] Gustafson, R. H., and Bowen, R. E., 1997. *Antibiotic use in animal agriculture.* Journal of Applied Microbiology. 83, 531–541.
- [7] McEwen S.A., Fedorka - Cray P.J., 2002. *Antimicrobial use and resistance in animals.* Clinical infectious diseases. 34: S93–106.
- [8] Madhab K. Chattopadhyay, 2014. *Use of antibiotic as feed additives: a burning question,* Frontier Microbiology, 334.
- [9] Maksum Radji, Rafael Adi Agustama, Berna Elya, Conny Riana Tjampakasari, 2013. *Antimicrobial activity of green tea extract against isolates of methicillin resistant Staphylococcus aureus and multi-drug resistant Pseudomonas aeruginosa.* Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 3(8): 663-667.
- [10] Manoj Kumar Pandey, G.N. Singh, Rajeev Kr Sharma and Sneha Lata, 2011. *Antibacterial activity of Eclipta alba (L.) Hassk.* Journal of Applied Pharmaceutical Science 01 (07); 2011: 104-107.
- [11] Maragathavalli, S., Brindha, S., Kaviyarasi, N.S., B. Annadurai, B. and Gangwar, S.K., 2012. *Antimicrobial activity in leaf extract of neem (Azadirachta indica Linn.).* International Journal of Science and Nature. Vol 3(1), 110-113.
- [12] Neviton Rogério Sanches, Diógenes Aparício Garcia Cortez, Michelle Simone Schiavini, Celso Vataru Nakamura, Benedito Prado Dias Filho, 2005. *An Evaluation of Antibacterial Activities of Psidium guajava (L.).* Brazilian Archives of Biology and Technology, Vol.48, n. 3, 429-436.
- [13] Nguyễn Thị Kim Loan, 2012. *Ảnh hưởng của tỏi, nghệ lên khả năng kháng bệnh và sức tăng trưởng của heo 30-90 ngày tuổi và heo thịt.* Luận án tiến sĩ nông nghiệp, Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh. Trang 64-113.
- [14] Quang-Vinh Nguyen, Jong-Bang Eun, 2013. *Antimicrobial activity of some Vietnamese medicinal plants extracts.* Journal of Medicinal Plants Research, Vol. 7(35), 2597-2605.
- [15] Raja Ratna Reddy Y, Krishna Kumari C, Lokanatha O, Mamatha S, Damodar Reddy C, 2013. *Antimicrobial activity of Azadirachta Indica (neem) leaf, bark and seed extracts.* International Journal of Research in Pharmacology and Phytochemistry. 3(1), 1-4.
- [16] R.P. Tiwari, S.K. Bharti, H.D. Kaur, R.P. Dikshit & G.S. Hoondal, 2005. *Synergistic antimicrobial activity of tea & antibiotic.* Indian Journal of Medical Research. 122, 80-84.
- [17] Sarmah A.K., Meyer M.T., Boxall A.B., 2006. *A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotic (VAs) in the environment.* Chemosphere. 65:725–59.
- [18] S. Archana and Jayanthi Abraham, 2011. *Comparative analysis of antimicrobial activity of leaf extracts from fresh green tea, commercial green tea and black tea on pathogens.* Journal of Applied Pharmaceutical Science. 01 (08): 149-152.

- [19] Stephen Karori Mbutia, Francis Nyamu Wachira, Robert Kipyegon Koech, 2014. *In-vitro – antimicrobial and synergistic properties of water solution green and black tea extracts*. African Journal of Microbiology Research. Vol. 8(14), pp. 1527-1534.
- [20] Victor L., 2005. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Williams & Wilkins, pp. 14-16.
- [21] Vo A.T., van Duijkeren E., Fluit A.C., Heck M.E., Verbruggen A., Maas H.M., Gaastra W., 2006. *Distribution of Salmonella enterica serovars from humans, livestock and meat in Vietnam and the dominance of Salmonella Typhimurium phage type 90*. Veterinary Microbiology. 113(1-2):153-8.
- [22] Vo A.T, Marshall B. M., Levy S., Ochieng D., Gur D., Nanuashvili A., Kim Y.S., Byarugabe D.K., Okoh A., Kashyap S.K., Endtz H., Sosa A., 2010. *Surveillance of antibiotic resistance determinants in commensal and environmental bacteria from international sources*. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Boston.