

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG DIỆT KHUẨN *IN VITRO* CỦA SẢN PHẨM NANO POLYME - Ag - Fe₃O₄ - KHÁNG SINH ĐỐI VỚI VI KHUẨN GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP (AHPND) TRÊN TÔM NUÔI NƯỚC LỢ

Đặng Thị Lua^{1*}, Kim Văn Vạn², Hà Phương Thư³

¹*Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I*

²*Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

³*Viện Khoa học Dược liệu*

Email*: danglua@ria1.org

Ngày gửi bài: 13.07.2017

Ngày chấp nhận: 18.09.2017

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành nhằm đánh giá khả năng diệt khuẩn của các sản phẩm nano SP3 (Polyme_Ag_Fe₃O₄_Kháng sinh) đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) trên tôm nuôi nước lợ trong điều kiện *in vitro*. Chúng vi khuẩn được sử dụng để thử nghiệm là *Vibrio parahaemolyticus* KC12.020, nồng độ thử nghiệm 10⁸ cfu/ml. Kết quả thử nghiệm cho thấy đường kính vòng vô khuẩn của sản phẩm nano Polyme_Ag_Fe₃O₄_Doxycyclin đạt 17,25 mm khi liều lượng kháng sinh sử dụng bằng một nửa (1/2) hàm lượng kháng sinh Doxycyclin được khuyến cáo sử dụng. Sản phẩm nano Polyme_Ag_Fe₃O₄_Ciprofloxacin có khả năng tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh AHPND (đường kính vòng vô khuẩn đạt 16,25 mm) tương đương với khả năng diệt vi khuẩn của kháng sinh Ciprofloxacin sử dụng đơn lẻ khi liều lượng kháng sinh thử nghiệm chỉ bằng 1/5 hàm lượng kháng sinh Ciprofloxacin được khuyến cáo sử dụng. Tuy nhiên, sản phẩm nano Polyme_Ag_Fe₃O₄_Ciprofloxacin sẽ không được tiếp tục thử nghiệm ngoài thực địa do kháng sinh Ciprofloxacin mới bị cấm sử dụng trong nuôi trồng thủy sản. Kết quả thử nghiệm các sản phẩm nano khác, Polyme_Ag_Fe₃O₄_Oxytetracyclin, Polyme_Ag_Fe₃O₄_Florphenicol và Polyme_Ag_Fe₃O₄_Doxycyclin_Florphenicol, trong nghiên cứu này chưa thể hiện rõ tiềm năng diệt khuẩn, do vậy chúng cần được tiếp tục nghiên cứu để khẳng định rõ hơn vai trò diệt khuẩn. Kết quả nghiên cứu này bước đầu cho thấy tiềm năng ứng dụng sản phẩm nano kết hợp với kháng sinh trong điều trị bệnh AHPND trên tôm nuôi nước lợ.

Từ khóa: AHPND, kháng sinh, sản phẩm nano, tôm nước lợ, *Vibrio parahaemolyticus*.

In Vitro Anti - Bacterial Activity of Nanodrugs (Polyme - Ag - Fe₃O₄ - Antibiotics) on Bacterial Strains Caused Acute Hepatopancreas Necrosis Disease (Ahpnd) in Shrimp

ABSTRACT

The study was carried out to determine *in vitro* anti-bacterial effects of nanodrugs (Polyme_Ag_Fe₃O₄_Antibiotics) on bacterial strains caused acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. The *Vibrio parahaemolyticus* strain KC12.020 was used in this study at concentration of 10⁸ cfu/ml. Results showed that the inhibition zone against the AHPND-caused bacterial strain of the nanodrug, Polyme_Ag_Fe₃O₄_Doxycyclin, was about 17.25 mm when the tested antibiotic dose was equal to only one-half of the recommended dose of Doxycyclin. The effective anti-bacterial effect of the nanodrug, Polyme_Ag_Fe₃O₄_Ciprofloxacin, was similar to the antibacterial activity of the Ciprofloxacin used alone (the inhibitory diameter was 16.25 mm) when the tested antibiotic dose was equal to one-fifth (1/5) of the dose of Ciprofloxacin is recommended. However, the Polyme_Ag_Fe₃O₄_Ciprofloxacin product will not be used for trial at farm level because its usage has recently been banned in aquaculture. Other nanodrugs, Polyme_Ag_Fe₃O₄_Oxytetracyclin, Polyme_Ag_Fe₃O₄_Doxycyclin, and Polyme_Ag_Fe₃O₄_Doxycyclin_Florphenicol, are needed to further study because they did not show clearly the antibacterial activities against AHPND-caused bacterial strain in this study. These results indicated the potential use of nanodrugs (Polyme_Ag_Fe₃O₄_Antibiotics) in treatment of AHPND in shrimp.

Keywords: AHPND, antibiotic, nanodrug, shrimp, *Vibrio parahaemolyticus*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nghề nuôi tôm nước lợ đã và đang đóng vai trò quan trọng trong ngành nuôi trồng thủy sản ở nước ta. Theo Tổng cục Thủy sản năm 2016, sản lượng tôm nước lợ ở nước ta đạt 650 nghìn tấn, mang lại giá trị kim ngạch xuất khẩu 3,1 tỷ USD. Mặc dù vậy, sự xuất hiện của các loại dịch bệnh hàng năm vẫn gây ra những thiệt hại nhất định cho nghề nuôi. Từ năm 2009, dịch bệnh nguy hiểm trên tôm được ghi nhận tại các quốc gia sản xuất tôm ở khu vực Đông Nam Á, trong đó có bệnh hoại tử gan tụy cấp (Acute hepatopancreatic necrosis disease - AHPND) ở Việt Nam. Tác nhân gây bệnh AHPND được cho là do vi khuẩn mang plasmid có chứa gen độc lực gây hoại tử gan tụy cấp (Lightner, 2014; Sasiwipa *et al.*, 2014). Cho đến nay, tác nhân gây bệnh AHPND đã được xác nhận bao gồm *Vibrio parahaemolyticus* (Tran *et al.*, 2013), *V. harveyi* (Kondo *et al.*, 2015), *V. sinaloensis* (LinThong *et al.*, 2014) và *V. campbellii* (Dong *et al.*, 2017; Han, 2017).

Để ngăn ngừa dịch bệnh do tác nhân vi khuẩn gây ra, nhiều loại kháng sinh đã được sử dụng trong nuôi trồng thủy sản (NTTS). Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh không đúng qui định, không kiểm soát đã gây tác động xấu đến môi trường, hệ sinh thái, để lại dư lượng trong sản phẩm thủy sản và dẫn đến hiện tượng kháng kháng sinh (Sarter *et al.*, 2007).

Gần đây, công nghệ nano đã và đang có những bước phát triển mạnh mẽ với rất nhiều ứng dụng trong NTTS như trong nghiên cứu chẩn đoán bệnh, trong sản xuất vắc xin và thức ăn thủy sản, trong công nghệ lọc và xử lý nước ô nhiễm, đặc biệt là ứng dụng tiềm năng của công nghệ nano trong hệ vận chuyển thuốc thông minh làm tăng thời gian tồn tại của thuốc trong cơ thể động vật thủy sản, chống lại sự phân hủy của thuốc do các enzyme trong đường ruột của động vật thủy sản, giảm thiểu sự phân rã của thuốc trong môi trường nước, giảm thiểu lượng thuốc sử dụng nhưng vẫn đảm bảo được hiệu quả kháng khuẩn của thuốc, qua đó giảm thiểu đến mức tối đa dư lượng thuốc tồn dư trong sản phẩm thủy sản (Rather, 2011; Shaalan *et al.*, 2016).

Chính vì vậy nghiên cứu này của chúng tôi được tiến hành nhằm đánh giá khả năng diệt khuẩn của các sản phẩm nano SP3 (Polyme_Ag_Fe₃O₄_Kháng sinh) đối với chủng vi khuẩn gây bệnh AHPND, làm cơ sở phát triển chế phẩm nano ứng dụng trong phòng trị bệnh trên tôm nuôi nước lợ, góp phần phát triển nghề nuôi tôm nước lợ bền vững, đảm bảo an toàn thực phẩm và thân thiện với môi trường.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

06 sản phẩm nano SP3 (Polyme_Ag_Fe₃O₄_Kháng sinh) dạng dung dịch được sản xuất và cung cấp bởi Viện Khoa học Dược liệu, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, thuộc chương trình Dự án trọng điểm cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ nano trong nông nghiệp”. Các sản phẩm nano SP3 với các thành phần cấu tạo như sau:

+ Polyme_Ag_Fe₃O₄_Oxytetracyclin (Kí hiệu: SP3.1_Fe_OTC):

Alginate: 2 mg/ml + nano Fe₃O₄: 2 mg/ml + nano Ag: 100 ppp + Oxytetracyclin: 1 mg/ml

+ Polyme_Ag_Fe₃O₄_Oxytetracyclin (Kí hiệu: SP3.2_Fe_OTC):

Alginate: 1 mg/ml + nano Fe₃O₄: 2 mg/ml + nano Ag: 100 ppp + Oxytetracyclin: 2,5 mg/ml

+ Polyme_Ag_Fe₃O₄_Ciprofloxacin (Kí hiệu: SP3_Fe_Cipro):

Alginate: 1 mg/ml + nano Fe₃O₄: 4 mg/ml + nano Ag: 50 ppp + Ciprofloxacin: 1 mg/ml

+ Polyme_Doxycyclin (Kí hiệu: SP3_Fe_Doxy):

Alginate: 2 mg/ml + nano Fe₃O₄: 2 mg/ml + nano Ag: 100 ppp + Doxycyclin: 1 mg/ml

+ Polyme_Florphenicol (Kí hiệu: SP3_Fe_Flor):

Alginate: 2 mg/ml + nano Fe₃O₄: 2 mg/ml + nano Ag: 100 ppp + Florphenicol: 1 mg/ml

+ Polyme_Doxycyclin_Florphenicol (Kí hiệu: SP3_Fe_Doxy_Flor):

Alginate: 1 mg/ml + nano Fe_3O_4 : 2 mg/ml + nano Ag: 100 ppp + Kháng sinh mỗi loại: 1 mg/ml.

Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC12.020 gây bệnh AHPND (Phan Thị Vân và cs., 2014) hiện đang được lưu giữ tại Trung tâm quan trắc môi trường và bệnh thủy sản miền Bắc (CEDMA) thuộc Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I (RIA1).

Đĩa giấy thấm vô trùng do công ty TNHH Nam Khoa sản xuất.

Môi trường TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salt) chọn lọc cho vi khuẩn *Vibrio*. Môi trường Nutrient Broth (NB) bổ sung 2% NaCl để nuôi cấy tăng sinh, Mueller Hinton Agar (MHA) bổ sung 2% NaCl dùng để đánh giá khả năng tiêu diệt vi khuẩn của các sản phẩm nano.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chuẩn bị các sản phẩm nano SP3 (Polyme Ag- Fe_3O_4 -Kháng sinh) thử nghiệm

+ Các sản phẩm nano SP3 (SP3.1_Fe_OTC, SP3.2_Fe_OTC, SP3_Fe_Doxy, SP3_Fe_Flor và SP3_Fe_Doxy_Flor) được tính toán từ nồng độ kháng sinh ban đầu để đảm bảo hàm lượng kháng sinh được thử nghiệm là 15; 20; 30 và 40 μg . Các ĐC (30) và ĐC (40) là các kháng sinh tương ứng được sử dụng để sản xuất sản phẩm nano với hàm lượng thử nghiệm là 30 và 40 μg . ĐC (-) là DMSO.

+ Sản phẩm nano SP3_Fe_Cipro được tính toán từ nồng độ kháng sinh ban đầu để đảm bảo hàm lượng kháng sinh được thử nghiệm là 1; 2,5; 5 và 7,5 μg . ĐC (5) và ĐC (7) là đối chứng kháng sinh Ciprofloxacin với hàm lượng thử nghiệm là 5 và 7,5 μg .

2.2.2. Chuẩn bị vi khuẩn gây bệnh AHPND để thử nghiệm

Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC12.020 từ tủ - 80°C được cấy rìa trên đĩa thạch TCBS rồi ủ ở nhiệt độ 29 - 30°C trong tủ ẩm nuôi cấy vi sinh. Sau 24 giờ nuôi cấy, một khuẩn lạc đơn được lựa chọn để nuôi cấy tăng

sinh trong môi trường lỏng NB (nhiệt độ 29 - 30°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút) để thu dịch vi khuẩn. Mật độ vi khuẩn được xác định theo phương pháp đo mật độ quang (OD) ở bước sóng $\lambda = 600 \text{ nm}$, kiểm tra lại bằng phương pháp pha loãng và định lượng trên đĩa thạch. Mật độ vi khuẩn thử nghiệm là 10^8 cfu/ml .

2.2.3. Thử nghiệm đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của các sản phẩm nano SP3

Hoạt tính kháng khuẩn của sản phẩm nano SP3 được kiểm tra bằng phương pháp kháng sinh đồ khuếch tán trên đĩa thạch của Kirby-Bauer, sử dụng môi trường MHA. Chủng vi khuẩn dùng thử nghiệm (nồng độ 10^8 cfu/ml) được trang đều trên các đĩa thạch MHA. Các thể tích dung dịch của sản phẩm SP3 tương ứng với các hàm lượng kháng sinh lựa chọn thử nghiệm được nhỏ trên các đĩa giấy thấm vô trùng rồi đặt trên đĩa thạch đã được trang vi khuẩn. Tương tự, các kháng sinh đối chứng cũng được chuẩn bị ở hàm lượng thử nghiệm và nhỏ lên các đĩa giấy thấm vô trùng. Đĩa thạch sau đó được ủ trong tủ ẩm 29 - 30°C. Sau 24 giờ nuôi cấy, đĩa thạch được lấy ra để đo đường kính vòng vô khuẩn.

2.2.4. Đo đường kính vòng vô khuẩn (mm)

Dựa vào đường kính của vòng vô khuẩn theo tài liệu "The Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI, 2006) để đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của sản phẩm nano SP2 thử nghiệm. Nếu:

+ Đường kính vòng vô khuẩn $\leq 11 \text{ mm}$: Vi khuẩn kháng kháng sinh

+ Đường kính vòng vô khuẩn 12 - 15 mm: Trung bình

+ Đường kính vòng vô khuẩn $\geq 16 \text{ mm}$: Nhạy (Kháng sinh có độ nhạy với vi khuẩn). Đường kính vòng vô khuẩn càng lớn thì độ nhạy càng cao.

2.3. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên và được lặp lại 2 lần. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2011 và phân tích theo phương pháp thống kê mô tả.

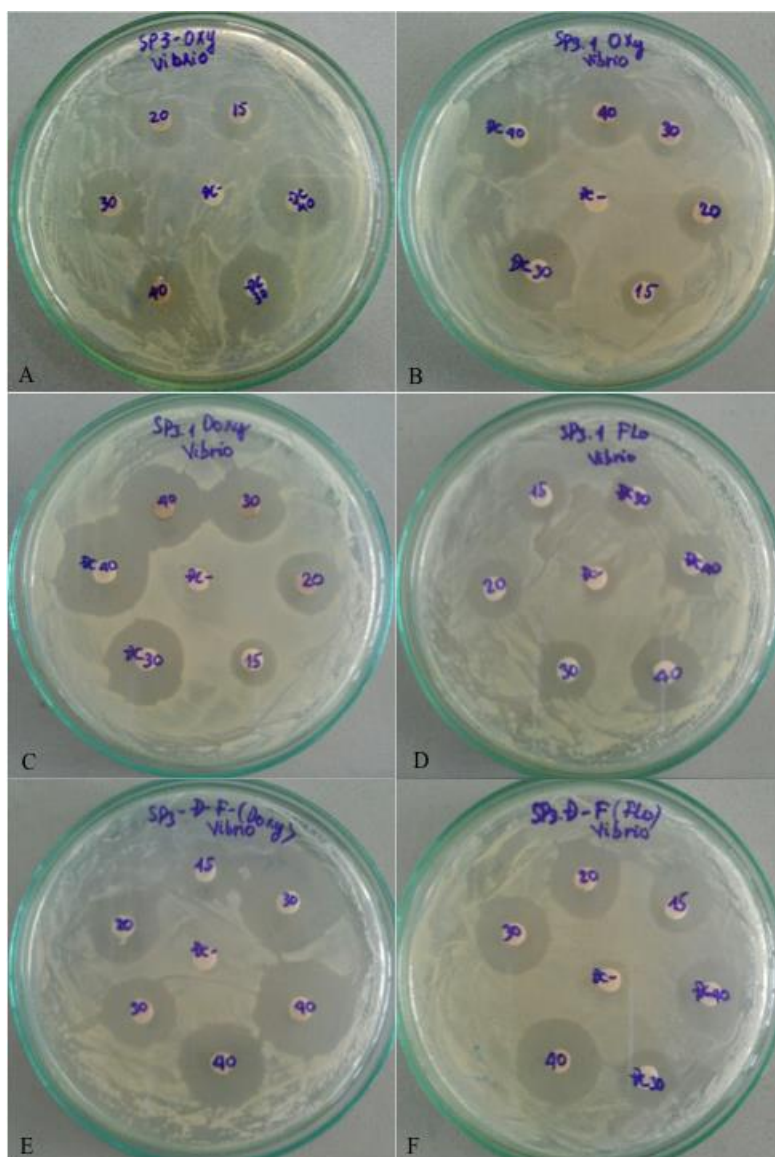
Đánh giá khả năng diệt khuẩn in vitro của sản phẩm nano polyme - Ag - Fe₃O₄ - kháng sinh đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) trên tôm nuôi nước lợ

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả

Kết quả thử nghiệm đánh giá khả năng diệt khuẩn của các sản phẩm nano (SP3.1_Fe_OTC, SP3.2_Fe_OTC, SP3_Fe_Doxy, SP3_Fe_Flor và SP3_Fe_Doxy_Flor) được trình bày ở bảng 1 và hình 1, trong khi đó kết quả diệt khuẩn của sản phẩm SP3_Fe_Cipro được trình bày ở bảng 2 và hình 2.

Các sản phẩm nano SP3 thử nghiệm đều có độ nhạy từ trung bình đến độ nhạy cao đối với chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC12.020 gây bệnh AHPND trên tôm nuôi nước lợ, thể hiện đường kính vòng vô khuẩn thấp nhất là 11,5 µg (ở hàm lượng kháng sinh 15 µg đối với sản phẩm SP3.1_Fe_OTC) và cao nhất là 20,5 µg (ở hàm lượng kháng sinh 30 µg đối với sản phẩm nano SP3_Fe_Doxy và ở hàm lượng kháng sinh 5 µg đối với sản phẩm nano SP3_Fe_Cipro).



Hình 1. Đường kính vòng vô khuẩn của các sản phẩm SP3 đối với vi khuẩn gây bệnh AHPND

Ghi chú: (A) SP3.1_Fe_OTC; (B) SP3.2_Fe_OTC; (C) SP3_Fe_Doxy; (D) SP3_Fe_Flor; (E) SP3_Fe_Doxy_Flor (đối chứng Doxycyclin) và (F) SP3_Fe_Doxy_Flor (đối chứng Florphenicol)

Bảng 1. Khả năng diệt khuẩn của 5 sản phẩm SP3 đối với vi khuẩn gây bệnh AHPND

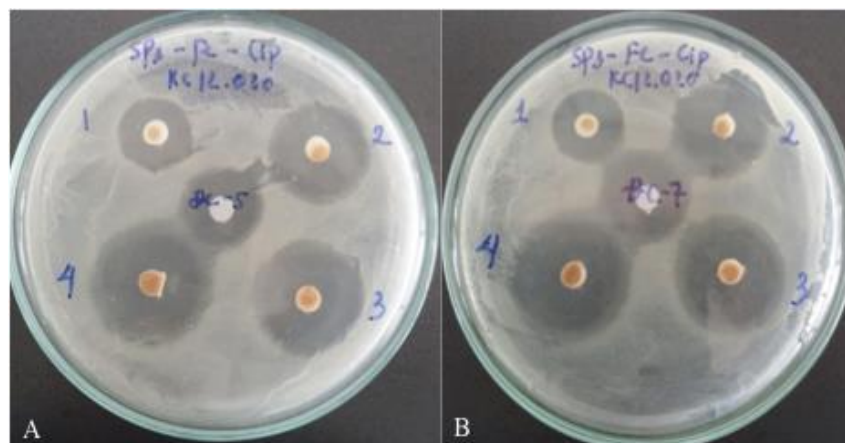
Loại kháng sinh thử nghiệm	Hàm lượng kháng sinh thử nghiệm (μg)	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)				
		SP3.1_Fe_OTC	SP3.2_Fe_OTC	SP3_Fe_Doxy	SP3_Fe_Flor	SP3_Fe_Doxy_Flor
Kháng sinh - nano SP3	15	$11,5 \pm 0,7$	$14,25 \pm 0,4$	$17,25 \pm 0,4$	$12,5 \pm 0,7$	$15,5 \pm 0,7$
	20	$14,25 \pm 0,4$	$15,5 \pm 0,7$	$18,5 \pm 0,7$	$14,25 \pm 0,4$	$16,5 \pm 0,7$
	30	$15,5 \pm 0,7$	$17,25 \pm 0,4$	$20,5 \pm 0,7$	$15,5 \pm 0,7$	$18,5 \pm 0,7$
	40	$16,15 \pm 0,4$	$18,25 \pm 0,4$	$21,5 \pm 0,7$	$16,5 \pm 0,7$	20 ± 0
Kháng sinh đối chứng *	30**	18 ± 0	19 ± 0	$21,5 \pm 0,7$	15 ± 0	$14,5 \pm 0,7^{***}$
	40	19 ± 0	$19,5 \pm 0,7$	$22,5 \pm 0,7$	16 ± 0	$16 \pm 0^{***}$

Ghi chú: (*) Kháng sinh đối chứng được sử dụng trong mỗi thử nghiệm là chính kháng sinh được sử dụng kết hợp với hạt nano tạo sản phẩm SP3; (**) Hàm lượng kháng sinh được sử dụng ở các đĩa kháng sinh đồ thương mại đối với kháng sinh Oxytetracyclin, Doxycyclin và Florphenicol; (***) Đường kính đối với kháng sinh Florphenicol

Bảng 2. Khả năng diệt khuẩn của sản phẩm SP3_Fe_Cipro đối với vi khuẩn gây bệnh AHPND

Hàm lượng kháng sinh thử nghiệm (μg)	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)
Kháng sinh - nano SP3	1
	2,5
	5
	7,5
Ciprofloxacin	5*
	7.5

Ghi chú: (*) Hàm lượng kháng sinh sử dụng ở đĩa kháng sinh đồ thương mại đối với kháng sinh Ciprofloxacin



Hình 2. Đường kính vòng vô khuẩn của SP3_Fe_Cipro đối với vi khuẩn gây bệnh AHPND

Ghi chú: (A) Ciprofloxacin sử dụng là $5 \mu\text{g}$ (ĐC-5) (B) Ciprofloxacin sử dụng là $7,5 \mu\text{g}$ (ĐC-7). Kết quả so sánh hiệu quả diệt khuẩn của các sản phẩm nano SP3 (Polyme_Ag_Fe₃O₄-Kháng sinh) đối với kháng sinh đối chứng cho thấy:

Đánh giá khả năng diệt khuẩn in vitro của sản phẩm nano polyme - Ag - Fe_3O_4 - kháng sinh đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) trên tôm nuôi nước lợ

Sản phẩm nano SP3.1_Fe_OTC có khả năng diệt vi khuẩn gây bệnh AHPND thấp hơn so với kháng sinh Oxytetracyclin và chỉ đạt ở mức trung bình ở tất cả các hàm lượng kháng sinh thử nghiệm (đường kính vòng vô khuẩn cao nhất là 16,25 mm) (Bảng 1, Hình 1A). Trong khi đó, khả năng diệt khuẩn của sản phẩm nano SP3.2_Fe_OTC tương đương với kháng sinh Oxytetracyclin khi được thử nghiệm ở hàm lượng kháng sinh 30 μg và 40 μg (đường kính vòng vô khuẩn dao động từ 17,25 - 18,25 mm). Tuy nhiên, kết quả thử nghiệm ở các hàm lượng kháng sinh ≤ 20 μg của sản phẩm nano này cho kết quả kháng khuẩn chỉ đạt ở mức trung bình (đường kính vòng vô khuẩn ≤ 16 mm) (Bảng 1, Hình 1B). Kết quả thử nghiệm này chưa thể hiện rõ hiệu quả diệt khuẩn của sản phẩm nano kết hợp giữa hạt nano Fe_3O_4 , hạt nano Ag và Oxytetracyclin.

Sản phẩm nano SP3_Fe_Doxy có khả năng tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh AHPND ở tất cả các hàm lượng kháng sinh thử nghiệm (đường kính vòng vô khuẩn thấp nhất đạt 17,25 mm). Mặc dù khả năng tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh AHPND của sản phẩm nano này chỉ tương đương với kháng sinh Doxycyclin khi được thử nghiệm ở hàm lượng kháng sinh 30 μg và 40 μg (đường kính vòng vô khuẩn dao động từ 20,5 - 21,5 mm) nhưng khi được thử nghiệm ở hàm lượng kháng sinh là 15 μg (liều lượng bằng liều lượng của kháng sinh Doxycyclin được khuyến cáo sử dụng), sản phẩm nano SP3_Fe_Doxy đã có kết quả tiêu diệt vi khuẩn (đường kính vòng vô khuẩn đạt 17,25 mm) (Bảng 1, Hình 1C). Kết quả thử nghiệm này cho thấy hiệu quả diệt khuẩn của sản phẩm nano SP3_Fe_Doxy so với kháng sinh Doxycyclin sử dụng đơn lẻ.

Sản phẩm nano SP3_Fe_Flor có khả năng kháng khuẩn chỉ đạt ở mức trung bình ở tất cả các hàm lượng kháng sinh thử nghiệm (Bảng 1, Hình 1D) thể hiện đường kính vòng vô khuẩn cao nhất dao động từ 15,5 - 16,5 mm ở hàm lượng kháng sinh thử nghiệm 30 μg và 40 μg . Kết quả thử nghiệm này chưa thể hiện rõ tiềm năng của sản phẩm nano SP3_Fe_Flor khi kết

hợp giữa hạt nano Ag và Fe_3O_4 với kháng sinh Florphenicol.

Sản phẩm nano SP3_Fe_Doxy_Flor kết hợp đồng thời với 02 kháng sinh Doxycyclin và Florphenicol thể hiện khả năng diệt vi khuẩn gây bệnh AHPND thấp hơn so với kháng sinh Doxycyclin nhưng cao hơn so với kháng sinh Florphenicol khi được thử nghiệm ở hàm lượng kháng sinh 30 μg và 40 μg (đường kính vòng vô khuẩn dao động từ 18,5 - 20 mm), trong khi đó kết quả thử nghiệm ở hàm lượng kháng sinh ≤ 20 μg , sản phẩm nano SP3_Fe_Doxy_Flor chỉ cho kết quả kháng khuẩn ở mức độ trung bình (đường kính vòng vô khuẩn dao động 15,5 mm - 16,5 mm) (Bảng 1, Hình 1E,F). Kết quả thử nghiệm này chưa thể hiện rõ tiềm năng diệt khuẩn của sản phẩm nano SP3_Fe_Doxy_Flor.

Sản phẩm nano SP3_Fe_Cipro (Bảng 2, Hình 2A, B) cho thấy tiềm năng diệt khuẩn rõ rệt khi hàm lượng kháng sinh đưa vào thử nghiệm chỉ bằng 1/5 hàm lượng kháng sinh Ciprofloxacin sử dụng đơn lẻ (đường kính vòng vô khuẩn của Polymer_Cipro đạt 16,25 mm khi thử nghiệm ở hàm lượng kháng sinh 1 μg trong khi đường kính vòng vô khuẩn của kháng sinh Ciprofloxacin đơn lẻ đối chứng sử dụng ở hàm lượng 5 μg đạt khoảng 16,5 mm).

3.2. Thảo luận

Cho đến nay, có ít nhất 3 chủng vi khuẩn *Vibrio* đã được xác định là tác nhân gây bệnh AHPND trên tôm nuôi nước lợ ở Việt Nam, đó là *V. parahaemolyticus* KC12.020, *V. parahaemolyticus* KC13.14.2 (Phan Thị Vân và cs., 2014) và *V. harveyi* KC13.17.5 (Kondo *et al.*, 2015). Trong nghiên cứu này, chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* KC12.020 được sử dụng làm vật liệu thử nghiệm đánh giá khả năng diệt khuẩn của các sản phẩm nano kết hợp với kháng sinh, Polyme_Ag_Fe₃O₄_Kháng sinh.

Việc lạm dụng sử dụng kháng sinh không đúng cách trong điều trị bệnh nói chung đã và đang dẫn tới hiện tượng kháng kháng sinh trên toàn cầu. Hiện tượng kháng kháng sinh không chỉ được ghi nhận ở con người, động vật trên cạn mà cả ở các động vật thủy sản (Hameed *et al.*,

2003; Sarter *et al.*, 2007). Chính vì vậy, việc nghiên cứu thử nghiệm các sản phẩm kháng sinh có nguồn gốc từ thảo dược cũng như việc nghiên cứu ứng dụng công nghệ nano trong việc nâng cao hiệu quả sử dụng thuốc kháng sinh, giảm liều lượng sử dụng nhưng vẫn mang lại hiệu quả trị bệnh cao là điều rất cần thiết, phù hợp với sự phát triển của xã hội theo hướng an toàn thực phẩm và thân thiện với môi trường (Mahesh & Satish, 2008; Solanki, 2010).

Gần đây, công nghệ nano cũng đã và đang được quan tâm ứng dụng trong lĩnh vực y học thủy sản bao gồm lĩnh vực chẩn đoán bệnh, sản xuất vắc xin phòng bệnh và là công cụ vận chuyển thuốc và gen thông minh (Shalan *et al.*, 2016). Hạt nano PLGA kết hợp với Rifampicin cho hiệu quả điều trị *Mycobacterium marinum* cao, nâng cao tỷ lệ sống của trứng cá ngựa vằn khi so sánh với thuốc Rifampicin sử dụng đơn lẻ (Fenaroli *et al.*, 2014). Hạt nano Chitosan và PLGA được sử dụng như chất bổ trợ trong nghiên cứu sản xuất ADN vắc xin cho cá (Li *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2008). Trong lĩnh vực chẩn đoán bệnh, hạt nano được ứng dụng trong sản xuất kit chẩn đoán bệnh do vi khuẩn, ký sinh trùng và vi rút như chẩn đoán bệnh Furunculosis ở cá (Saleh *et al.*, 2011), phát triển kit LAMP chẩn đoán vi rút gây bệnh đầu vàng trên tôm (Jaroenram *et al.*, 2012).

Ở nước ta, mặc dù công nghệ nano đã và đang được ứng dụng nhiều trong y sinh như ứng dụng trong việc dẫn truyền và phân phối thuốc hướng đích phục vụ việc chẩn đoán và hỗ trợ điều trị các bệnh ác tính như ung thư (Ha *et al.*, 2011; Ha *et al.*, 2016), song các ứng dụng của công nghệ nano trong NTTS còn rất khiêm tốn và mới mẻ. Nghiên cứu của Ha *et al.* (2011) đã cho thấy hệ vật liệu nano (gồm Fe_3O_4 /o-Carboxymethy Chitosan/Dịch chiết tinh của củ nghệ) đưa dẫn dịch chiết tinh củ nghệ vào trong tế bào ung thư HT29 hiệu quả hơn rất nhiều so với dịch chiết tinh củ nghệ khi sử dụng ở dạng đơn lẻ, đã góp phần nâng cao hiệu quả trong hỗ trợ điều trị bệnh ung thư. Nổi bật trong các nghiên cứu ứng dụng nano vào NTTS là kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả Trương Văn

Chương và cs. (Trường Đại học Khoa học Huế) kết hợp với công ty Huetronics Ltd. với 3 sản phẩm: Nano bạc (colpa nano feed) nâng sức đề kháng cho tôm và khử độc môi trường nước; Hỗn hợp than hoạt tính nano - nano sắt (colpa carbon) và nano TiO_2 kết hợp H_2O_2 làm sạch nước, diệt khuẩn và diệt tảo.

Trong nghiên cứu này, công nghệ nano đã được ứng dụng trong chế tạo sản phẩm kết hợp giữa hạt nano Ag, hạt nano Fe_3O_4 và kháng sinh với mục đích giảm lượng kháng sinh sử dụng để giảm thiểu lượng kháng sinh tồn dư trong môi trường và trong sản phẩm động vật thủy sản mà vẫn đảm bảo hiệu quả trong điều trị bệnh AHPND trên tôm. Kết quả nghiên cứu *in vitro* bước đầu cho thấy tiềm năng diệt vi khuẩn gây bệnh AHPND của sản phẩm SP3_Fe_Doxy và SP3_Fe_Cipro (Bảng 1 và 2). Ở hàm lượng kháng sinh thử nghiệm là 15 μg (bằng liều lượng kháng sinh Doxycyclin đơn lẻ được khuyến cáo sử dụng), sản phẩm nano SP3_Fe_Doxy đã cho hiệu quả tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh AHPND. Tương tự sản phẩm SP3_Fe_Cipro cho hiệu quả tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh AHPND ở hàm lượng kháng sinh thử nghiệm chỉ bằng 1/5 liều lượng kháng sinh Ciprofloxacin đơn lẻ được khuyến cáo sử dụng. Kháng sinh Doxycyclin đã và đang được khuyến cáo sử dụng do có hiệu quả diệt khuẩn tốt đối với vi khuẩn gây bệnh AHPND (Phan Thị Vân và cs., 2013), nhưng kháng sinh Ciprofloxacin lại mới bị cấm sử dụng trong NTTS theo thông tư 10/2016/TT-BNNPTNT. Như vậy, mặc dù sản phẩm SP3_Fe_Cipro cho kết quả kháng khuẩn cao trong điều kiện *in vitro* nhưng sản phẩm này sẽ không được tiếp tục đưa ra thử nghiệm ngoài thực địa.

Cũng trong nghiên cứu này, các sản phẩm nano SP3.1_Fe_OCT, SP3.2_Fe_OCT, SP3_Fe_Flor và SP3_Fe_Doxy_For đều chưa thể hiện rõ tiềm năng kháng vi khuẩn gây bệnh AHPND khi so sánh với kháng sinh đơn lẻ đối chứng (Bảng 1), do vậy cần phải tiếp tục nghiên cứu thay đổi trong công nghệ phối tạo giữa hạt nano và kháng sinh để nâng cao hiệu quả kháng khuẩn của sản phẩm nano này.

4. KẾT LUẬN

Trong các sản phẩm nano thử nghiệm, sản phẩm nano Polyme_Ag_Fe₃O₄_Doxycyclin và Polyme_Ag_Fe₃O₄_Ciprofloxacin bước đầu cho thấy hiệu quả diệt khuẩn cao đối với vi khuẩn gây bệnh AHPND trên tôm nuôi nước lợ. Đường kính vòng vô khuẩn của sản phẩm Polyme_Ag_Fe₃O₄_Doxycyclin đạt 17,25 mm khi hàm lượng kháng sinh thử nghiệm bằng một nửa (1/2) hàm lượng kháng sinh Doxycyclin được khuyến cáo sử dụng. Đường kính vòng vô khuẩn của sản phẩm Polyme_Ag_Fe₃O₄_Ciprofloxacin tương đương với đường kính vòng vô khuẩn của kháng sinh Ciprofloxacin đối chứng khi liều lượng kháng sinh thử nghiệm chỉ bằng một phần năm (1/5) hàm lượng kháng sinh Ciprofloxacin được khuyến cáo sử dụng. Tuy nhiên Ciprofloxacin đã bị cấm sử dụng trong NTTS (Thông tư 10/2016/TT-BNNPTNT), do vậy sản phẩm nano Polyme_Ag_Fe₃O₄_Ciprofloxacin sẽ không được tiếp tục thử nghiệm ngoài thực địa.

Các sản phẩm nano Polyme_Ag_Fe₃O₄_Oxytetracyclin, Polyme_Ag_Fe₃O₄_Florphenicol và Polyme_Ag_Fe₃O₄_Doxycyclin_Florphenicol cần tiếp tục được nghiên cứu để khẳng định rõ hơn tiềm năng ứng dụng công nghệ nano kết hợp với kháng sinh trong việc điều trị bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm nuôi nước lợ.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này là một phần kết quả nghiên cứu thuộc Hợp phần III, Dự án trọng điểm cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ nano trong nông nghiệp”, mã số VAST.TĐ.NANO-NN/15-18.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Dong, X., Wang H., Xie G., Zou P., Gou C., Liang Y., and Huang J. (2017). An isolate of *Vibrio campbellii* carrying the PirVP genes causes acute hepatopancreatic necrosis disease. *Emerging Microbes & Infections* 6, e2, doi: 10.1038/emi.2016.131.

Fenaroli, F., Westmoreland D., Benjaminsen J., Kolstad T., Skjeldal F.M., Meijer A.H. (2014).

Nanoparticles as drug delivery system against tuberculosis in zebra fish embryos: direct visualization and treatment. *ACS Nano*, 8(7): 7014-7026.

Ha, P.T., Le T.T.H, Hoang T.M.N, Nguyen T.T., Nguyen D.T., Ha T.M.T., Pham T.B.H., Tran T.M.N., Nguyen T.Q., Pham H.N., Tran D.L., Nguyen X.P. and Duong T.Q. (2011). Fe₃O₄/o-Carboxymethyl chitosan/Curcumin-based Nanofrug system for chemotherapy and fluorescence imaging in HT29 cancer cell line. *Chem. Lett*, 40:1264-1266.

Ha, P.T., Nguyen H.N., DDo H.D, Phan Q.T., Tran T.M.N., Nguyen X.P., Hoang T.M.N., Le M.H., Nguyen L.T., Bui T.Q., and Phan V.H. (2016). Targeted drug delivery nanosystems based on copolymer (poly-lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate for cancer treatment. *Adv. Nat.Sci: Nanosci. Nanotechnol.*, 7: 015001.

Han, J.E. (2017). Four AHPND strains identified on Latin American shrimp farms. <http://advocate.gaalliance.org/four-ahpnd-strains-identified-on-latin-american-shrimp-farms/>.

Hameed A.S., Rahaman, K.H., Alagan. A. and Yoganandhan, K. (2003). Antibiotic resistance in bacteria isolated from hatchery-reared larvae and post-larvae of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 217: 39-48.

Jaroenram W., Arunrut N., Kiatpathomchai W. (2012). Rapid and sensitive detection of shrimp yellow head virus using loop-mediated isothermal amplification and a colorogenic nanogold hybridization probe. *J Virol Methods*, 186(1): 36-42.

Kondo H, Van P.T, Dang L.T. and Hirono I. (2015). Draft genome sequence of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genome Announc.*, 3(5).

Li L., Lin S.L., Deng L., Liu Z.G. (2013). Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in black seabream *Acanthopagrus schlegelii* Bleeker to protect from *Vibrio parahaemolyticus*. *J Fish Dis.*, 36(12): 987-995.

Lightner, D. V. (2014). Documentation of a unique strain of *Vibrio parahaemolyticus* as the agent of Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) affecting Penaeid shrimp with note on the putative toxins. Paper presented at the The 9th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture (DAA9), Ho Chi Minh city, Vietnam.

LinThong, K., Ung E.H., Thong K.L., Ye S.M., Wee W.Y., Yap K.P. (2014). An AP1, 2 and 3 PCR positive non - *Vibrio parahaemolyticus* bacteria with AHPND histopathology. Paper presented at

- the 9th symposium on disease in Asian aquaculture (DAA9), Ho Chi Minh city, Vietnam, 24-28 November, 2014.
- Mahesh, B. and Satish S. (2008). Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. *World J Agric Sci.*, 4[S] 839-843.
- Phan Thị Vân, Đặng Thị Lựa, Nguyễn Việt Khuê, Bùi Ngọc Thanh, Phạm Thế Việt, Phạm Thị Yến, Đào Xuân Trường, Nguyễn Thị Mai Phương, Nguyễn Thị Thu Hương và Nguyễn Thị Hạnh (2014). Nghiên cứu xác định nguyên nhân gây bệnh hoại tử gan tụy trên tôm tại phía Bắc. Báo cáo tổng kết nhiệm vụ cấp Bộ năm 2014.
- Rajeshkumar S., Venkatesan C., Sarathi M., Sarathbabu V., Thomas J., Anver Basha K., Sahul Hameed A.S. (2009). Oral delivery of DNA construct using chitosan nanoparticles to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV), *Fish & Shellfish Immunology*, 26: 429-437.
- Rather M. (2011). Nanotechnology: A Novel Tool for Aquaculture and Fisheries Development. A Prospective Mini-Review. *Fisheries and Aquaculture Journal*.
- Saleh, M., Soliman H., Haenen O., El-Matbouli M. (2011). Antibody-coated gold nanoparticle immunoassay for direct detection of *Aeromonas salmonicida* in fish tissues. *J Fish Dis.*, 34(11): 845-852.
- Sarter, S., Kha, N.H.N., Hung, L.T., Lazard, J. and Didier M. (2007). Antibiotic Resistace in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. *Food Control*, 18: 1391-1396.
- Sasiwipa, T., Jumroensri T., Janejit K., Reko N., Hidehiro K. and Hirono, I. (2014). Characterization of viulence factor of AHPND *Vibrio parahaemolyticus*, which is the causative agent of shrimp disease. Paper presented at the The 9th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture (DAA9), Ho Chi Minh city, Vietnam.
- Solanki, R. (2010). Some medicinal plants with antibacterial activity. *Pharmacies Globate (IJCP)*, 4(10), ISSN 0976-8157.
- Shaalán, M., Saleh M., El-Mahhdy M., and El-Matbouli M. (2016). Progress in applications of nanoparticles in fish medicines: A review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12: 701-710.
- Tian J., Sun X., Chen X., Yu J., Qu L., and Wang L. (2008). The formulation and immunization of oral poly (DL-lactide-co-glycolide) microcapsules containing a plasmid vaccine against lymphocystis disease virus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Int Immunopharmacol.*, 8(6): 900-908.
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K. and Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Organ.*, 105: 45-55.