



ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN CỦA HỆ VẬT LIỆU NANO TỔ HỢP MANG KHÁNG SINH ĐỐI VỚI VI KHUẨN *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TUY TỤY CẤP (AHPNS) TRÊN TÔM CHÂN TRẮNG *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931)

Mạc Như Bình^{1*}, Lê Thị Kim Anh¹, Trần Nguyên Thảo¹, Nguyễn Hữu Thịnh¹,
Nguyễn Thị Thanh Thủy¹, Hoàng Thị Yến Nhi¹, Hà Phương Thu², Đặng Đình Kim³

¹ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

² Viện Khoa học Vật Liệu, Viện Hàn lâm Khoa Học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt,
Cầu Giấy, Hà Nội

³ Viện Công nghệ Môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt,
Cầu Giấy, Hà Nội

Tóm tắt: Nghiên cứu này đánh giá khả năng kháng khuẩn của hệ vật liệu nano tổ hợp mang kháng sinh Ag-TiO₂-Doxycycline-Alginate (TiO₂-Ag/DO/Alg) đối với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* – tác nhân chính gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm Chân trắng. Trong nghiên cứu này, hệ vật liệu nano TiO₂-Ag/DO/Alg được tổng hợp tại Viện Khoa học Vật liệu – Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chúng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* được phân lập từ 60 mẫu tôm bệnh trên cơ sở triệu chứng bệnh, đặc điểm hình thái và đặc điểm sinh thái. Kết quả thử nghiệm cho thấy hệ nano TiO₂-Ag/DO/Alg có hiệu lực diệt khuẩn *V. parahaemolyticus* tốt và vượt trội hơn kháng sinh DO thông thường ($p < 0,05$). Hệ nano với nồng độ 50 ppm cho đường kính vòng kháng khuẩn lớn hơn so với kháng sinh DO ở nồng độ 1000 ppm ($p < 0,05$).

Từ khóa: TiO₂-Ag/DO/Alg, *Vibrio parahaemolyticus*, AHPNS

1 Đặt vấn đề

Hiện nay, nuôi trồng thủy sản (NTTS) được coi là ngành kinh tế mũi nhọn của nhiều quốc gia, trong đó có Việt Nam. Tôm Chân trắng (TCT) có nguồn gốc từ Nam Mỹ được nhập nội vào Việt Nam năm 2001 và đã được nuôi rộng rãi tại các tỉnh ven biển nước ta trong giai đoạn từ năm 2007 đến 2009. Diện tích nuôi TCT đặc biệt phát triển nhanh trên phạm vi cả nước, từ 4.002 ha tăng lên 16.611 ha [1].

Tuy nhiên, trong những năm gần đây, TCT Việt Nam đang phải đối mặt với nhiều khó khăn: diện tích nuôi mở rộng nhưng thiếu quy hoạch, con giống kém, ô nhiễm môi trường và dịch bệnh khá nhiều. Có nhiều nguyên nhân gây nên bệnh trên tôm Chân trắng như virus, nấm, ký sinh trùng, bệnh dinh dưỡng và đặc biệt là do vi khuẩn [2]. Điển hình là Hội chứng hoại tử

* Liên hệ: macnhubinh@hvae.edu.vn

gan tụy cấp (Acute haepatopancreatic necrosis syndrome – AHPNS) làm cho cả tôm sú và tôm Chân trắng chết hàng loạt. Đối với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* – tác nhân chính gây Hội chứng hoại tử gan tụy cấp vẫn chưa có thuốc đặc trị do vi khuẩn này có khả năng tạo ra một màng sinh học chống lại thuốc diệt khuẩn và kháng sinh [3].

Mặc khác, kháng sinh để điều trị các bệnh nhiễm khuẩn trên động vật thủy sản không còn hiệu quả cao do các dòng vi khuẩn kháng thuốc ngày càng tăng; danh mục kháng sinh bị cấm sử dụng trong NTTS theo qui định ngày càng nhiều... Do vậy, một trong những giải pháp điều trị bệnh này chính là sử dụng những hệ dẫn thuốc hiệu quả nhằm nâng cao khả năng thẩm thấu của kháng sinh qua lớp màng sinh học bảo vệ của vi khuẩn gây bệnh. Một trong những xu hướng được đánh giá cao là ứng dụng công nghệ nano [4]. Việc sử dụng vật liệu nano mang lại những ưu điểm vượt trội như hạn chế việc sử dụng chế phẩm sinh học, kháng sinh có hại cho môi trường, tăng tính hướng đích, tăng hiệu quả tác động lên tế bào tác nhân gây bệnh dẫn đến giảm dư lượng kháng sinh trên tôm, đồng thời xử lý ô nhiễm môi trường nước NTTS. Các sản phẩm có tính chất và mục đích sử dụng như trên cho tới nay chưa được thử nghiệm rộng rãi ở Việt Nam. Chính vì vậy, việc nghiên cứu và “Đánh giá khả năng kháng khuẩn của hệ vật liệu nano tổ hợp mang kháng sinh đối với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* – gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPNS) trên tôm Chân trắng” có ý nghĩa rất quan trọng nhằm khẳng định tính năng diệt khuẩn của sản phẩm nano này và ứng dụng nó trong thực tế nuôi tôm hiện nay.

2 Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu đánh giá khả năng kháng khuẩn của hệ vật liệu nano tổ hợp mang kháng sinh (Ag - TiO₂ - Doxycycline -Alginate) đối với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm thẻ Chân trắng được thực hiện tại Khoa Thủy Sản, Trường Đại học Nông Lâm, Đại Học Huế. Nghiên cứu được thực hiện bởi hai nội dung chính sau đây: Nghiên cứu phân lập và định danh loài vi khuẩn gây bệnh AHPNS trên tôm Chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) ở giai đoạn tôm từ 30–40 ngày tuổi; và Đánh giá khả năng kháng khuẩn của hệ vật liệu nano TiO₂-Ag/DO/Alg đối với vi khuẩn gây bệnh AHPNS trên tôm thẻ chân trắng.

2.1 Phương pháp

Phương pháp thu mẫu

Mẫu tôm bệnh còn sống được thu tại hai ao nuôi thuộc xã Điền Hương, huyện Phong Điền, tỉnh Thừa Thiên Huế được cho vào túi vô trùng và bảo quản trong nước đá trước khi chuyển về phòng thí nghiệm. Thu mẫu chọn lọc đối với những tôm có xuất hiện dấu hiệu bệnh lý: bỏ ăn, hoạt động chậm chạp, bơi lơ đãng, gầy mòn, vỏ mềm, thân nhũn, mang sậm hoặc đen, teo gan tụy. Số lượng mẫu thu: 2 đợt × 30 = 60 mẫu. Kích thước, khối lượng tôm thu được ở mỗi

mẫu là tương đương nhau. Mẫu thu về được phân tích tại Phòng Thí nghiệm Khoa Thủy Sản, Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

Phương pháp nuôi cấy, phân lập vi khuẩn

Phân lập và định danh tên loài vi khuẩn gây bệnh được tiến hành theo Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự và Nguyễn Trọng Nghĩa và cộng sự [6], [7].

Mẫu tôm được nghiền nhỏ, sau đó hòa trong nước muối sinh lý để tạo dung dịch huyền phù. Lọc dung dịch huyền phù qua giấy lọc để loại bỏ cặn. Dùng micropipet lấy 100 μ L dung dịch thu được nhỏ lên môi trường Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS), dùng que cấy tam giác vô trùng dàn đều lên bề mặt thạch. Lật ngược đĩa thạch, nuôi cấy ở nhiệt độ phòng. Sau 24–48 giờ, quan sát sự phát triển của khuẩn lạc trên các đĩa môi trường. Chọn những khuẩn lạc rời, chiếm ưu thế; tiếp tục dùng que cấy vô trùng cấy ria sang môi trường TCBS cho đến lúc chọn được khuẩn lạc thuần. Tiến hành nhuộm vi khuẩn theo phương pháp của Christian Gram, 1884. Sau đó, thử test sinh hóa bằng kit thử Microgen GNA+B ID (Anh) để định danh vi khuẩn. Thí nghiệm được lặp lại ba lần.

Hiệu lực diệt khuẩn của hệ vật liệu nano $\text{TiO}_2\text{-Ag/DO/Alg}$ đối với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

Thử hoạt tính ức chế vi khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch: Phương pháp thử hoạt tính ức chế vi khuẩn là phương pháp của Tsai et al. [8] có điều chỉnh phù hợp với điều kiện của phòng thí nghiệm tại Khoa Thủy sản, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

Khuẩn lạc vi khuẩn được cấy chuyển sang 5 mL môi trường Luria-Bertani (LB) lỏng và lắc qua đêm ở 37 °C. Đĩa thử hoạt tính được chuẩn bị bằng cách cấy trải 200 μ L dịch khuẩn *V. parahaemolyticus*, nồng độ tương đương 10^6 CFU/mL dàn đều lên bề mặt đĩa petri chứa môi trường ChromoGel™ *Vibrio* agar, để khô.

Các khoanh giấy thấm đường kính khoảng 7,8 mm được ngâm bão hòa trong dung dịch nano $\text{TiO}_2\text{-Ag/DO/Alg}$ với các nồng độ khác nhau: 35 ppm, 40 ppm, 45 ppm và 50 ppm và trong dung dịch DO nồng độ 1000 ppm sau đó đặt lên đĩa thạch nuôi ở 37 °C. Sau 24 giờ, hoạt tính ức chế khuẩn được đánh giá bằng cách đo bán kính (BK) vòng ức chế vi sinh vật bằng công thức: $BK \text{ (mm)} = D - d$; trong đó D là đường kính vòng vô khuẩn và $d = 7,8$ mm là đường kính khoanh giấy thấm. Ở nghiệm thức đối chứng, thay dung dịch nano $\text{TiO}_2\text{-Ag/DO/Alg}$ bằng nước cất. Thí nghiệm được lặp lại ba lần và lấy giá trị bán kính trung bình.

2.2 Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh vật học trên phần mềm Microsoft Excel 2017 và SPSS 16.0 để phân tích thống kê ANOVA ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Đặc điểm tôm Chân trắng bị bệnh hoại tử gan tụy

Khối lượng và chiều dài của mẫu tôm giống ở giai đoạn P₃₀₋₄₀ được trình bày ở Bảng 1. Trong quá trình thu mẫu, chúng tôi nhận thấy tôm bỏ ăn, hoạt động chậm chạp, bơi lơ đãng, gầy mòn, vỏ mềm, thân nhũn, mang sậm hoặc đen, teo gan tụy.

Bảng 1. Chiều dài, khối lượng mẫu tôm bệnh

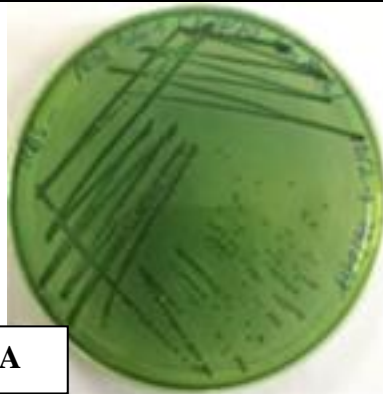
Địa điểm	Ngày tuổi	Số lượng (con)	Chiều dài trung bình \pm SD (cm)	Khối lượng trung bình \pm SD (gram)
Xã Điền Hương	18	30	5,6 \pm 0,90	1,1 \pm 0,5
Huyện Phong Điền	24	30	5,8 \pm 0,70	1,3 \pm 0,4

3.2 Phân lập vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

Sau 2 đợt thu mẫu, 30 con/đợt, chúng tôi tiến hành nuôi cấy, phân lập trên môi trường TCBS, chọn khuẩn lạc ưu thế để cấy chuyển. Quan sát kết quả phân lập sau 24–48 giờ đã xác định được một loại khuẩn lạc với đặc điểm được trình bày ở Bảng 2 và Hình 2.

Bảng 2. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc vi khuẩn gây bệnh AHPNS trên tôm Chân trắng tại Tỉnh Thừa Thiên Huế

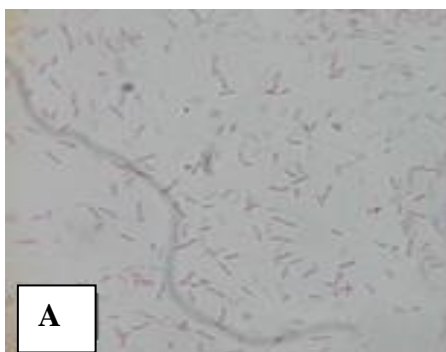
Hình thái	Loại A
Hình dạng khuẩn lạc	Tròn to, không đều, dạng đĩa, nhẵn bóng, có viền
Màu sắc khuẩn lạc	Màu xanh đậm
Kích thước khuẩn lạc (mm)	2,25 \pm 0,15
Đặc điểm khuếch tán	Không làm biến đổi môi trường TCBS



Hình 2. Khuẩn lạc vi khuẩn phân lập trên tôm Chân trắng bị bệnh AHPNS

3.3 Nhuộm Gram vi khuẩn gây bệnh

Tiến hành nhuộm Gram loài vi khuẩn phân lập được và quan sát dưới kính hiển vi 100×, chúng tôi nhận thấy loại vi khuẩn này có dạng que ngắn, hơi cong và bắt màu hồng. Điều đó chứng tỏ đây là chủng vi khuẩn thuộc nhóm vi khuẩn Gram (-).



Hình 3. Kết quả nhuộm Gram loài A

3.4 Thử test sinh hóa vi khuẩn gây bệnh

Trên cơ sở đặc điểm hình thái (Bảng 2), kết quả nhuộm Gram (Hình 3), kết quả thử test sinh - hóa (Bảng 3): Loài này là vi khuẩn Gram (-), tế bào có dạng hình que ngắn, hơi cong, có khả năng di động, phát triển trên môi trường TCBS, cho khuẩn lạc màu rõ rệt, không có khả năng lên men đường. Căn cứ vào phân loại của Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự và Nguyễn Trọng Nghĩa và cộng sự, chúng tôi bước đầu kết luận vi khuẩn phân lập được là *Vibrio parahaemolyticus* [6] [7]. Theo nghiên cứu của Loc Tran et al. *Vibrio parahaemolyticus* là tác nhân chính gây bệnh AHPNS trên tôm Chân trắng [5].

Bảng 3. Đặc điểm sinh - hóa các chủng vi khuẩn phân lập được trên TTCT

STT	Phản ứng	Loài A
1	Lysine	+
2	Ornithine	+
3	Sinh H ₂ S	-
4	Glucose	+
5	Mannitol	+
6	Xylose	-
7	O.N.P.G	-
8	Indole	+
9	Urease	-
10	V.P.	-
11	Citrate	-

STT	Phản ứng	Loài A
12	T.D.A	-
13	Gelatin	+
14	Malonate	-
15	Inositol	-
16	Sorbitol	-
17	Rhamnose	-
18	Sucrose	-
19	Lactose	-
20	Arabinose	+
21	Adonitol	-
22	Raffinose	-
23	Salicin	-
24	Arginine	-
25	Nitrate	+
26	Gram	-
Kết luận		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>

Ghi chú: (+) là dương tính, (-) là âm tính

Đánh giá hiệu lực diệt khuẩn của hệ vật liệu nano $\text{TiO}_2\text{-Ag/DO/Alg}$ đối với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*

Kết quả đánh giá hiệu lực diệt khuẩn của hệ nano $\text{TiO}_2\text{-Ag/DO/Alg}$ và kháng sinh DO đối với *Vibrio parahaemolyticus* (Bảng 4) cho thấy cả kháng sinh DO và hệ nano $\text{TiO}_2\text{-Ag/DO/Alg}$ đều có khả năng kháng chủng vi khuẩn nói trên. Tuy nhiên, hệ nano cho đường kính vòng tròn kháng khuẩn lớn hơn so với kháng sinh DO. Hệ nano $\text{TiO}_2\text{-Ag/DO/Alg}$ có khả năng kháng khuẩn tốt nhất ở nồng độ 50 ppm và kém nhất ở nồng độ 35 ppm. Điều này chứng tỏ hệ vật liệu nano tổ hợp mang kháng sinh $\text{TiO}_2\text{-Ag/DO/Alg}$ có hoạt tính kháng khuẩn tốt hơn so với kháng sinh DO thông thường. Việc sử dụng kháng sinh để điều trị bệnh do vi khuẩn thường gây ra hiện tượng nhờn thuốc, kháng thuốc [2]. Bên cạnh đó, việc sử dụng kháng sinh dễ gây hại cho sức khỏe của người tiêu dùng do việc tồn dư kháng sinh trong cơ thể động vật thủy sản. Vì vậy, việc sử dụng hệ vật liệu nano mang thuốc đem đến hiệu quả tích cực: giảm dư lượng kháng sinh, tăng hiệu quả tác động lên tế bào tác nhân gây bệnh. Đây là một giải pháp hữu ích và bảo đảm an toàn sản phẩm thủy sản.

Bảng 4. Khả năng kháng khuẩn của kháng sinh DO và hệ nano đối với vi khuẩn *Vibrio* spp.

Hoạt chất	Nồng độ (ppm)	Đường kính vòng kháng khuẩn \pm SD (mm)	
		<i>V. parahaemolyticus</i>	
Nano	35	18,3 ^b \pm 1,04	
Nano	40	19,0 ^c \pm 0,49	
Nano	45	20,1 ^d \pm 0,46	
Nano	50	24,1 ^e \pm 0,54	
Kháng sinh DO	10 ³	17,1 ^a \pm 0,52	

M \pm SD: trung bình mẫu \pm độ lệch chuẩn; Các ký tự a, b, c, d, e thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm trong cùng một cột ($p < 0,05$).

4 Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu lực diệt khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* của hệ nano TiO₂-Ag/DO/Alg với nồng độ 50 ppm mạnh nhất và yếu nhất ở nồng độ 35 ppm. Ngoài ra, hệ nano thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh hơn so với kháng sinh thông thường DO. Tuy nhiên, nghiên cứu hiệu lực diệt khuẩn của hệ nano đối với vi khuẩn *Vibrio* spp. chỉ mới được tiến hành trong điều kiện in vitro. Do đó, cần triển khai cần thử nghiệm hoạt tính diệt khuẩn của hệ nano đối với vi khuẩn *Vibrio* spp. trên mô hình in-vivo (bể cảm nhiễm) và ex-vivo (ao nuôi tôm).

Lời cảm ơn

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Viện Khoa học Vật Liệu, Viện Hàn Lâm Khoa Học và Công nghệ Việt Nam đã cung cấp hệ vật liệu nano. Chân thành cảm ơn dự án “Ứng dụng công nghệ nano trong nuôi tôm tại Việt Nam” thuộc dự án trọng điểm cấp Viện hàn lâm “Ứng dụng công nghệ nano trong nông nghiệp” do Viện Công Nghệ Môi Trường, Viện Hàn Lâm Khoa học Và Công Nghệ Việt Nam chủ trì đã hỗ trợ kinh phí để hoàn thành nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

1. Báo cáo tổng kết nhiệm vụ năm 2014 và triển khai kế hoạch năm 2015 (2014), Tổng cục thủy sản.
2. Đỗ Thị Hoà, Bùi Quang Tề, Nguyễn Hữu Dũng, Nguyễn Thị Muội (2004), *Bệnh học Thủy sản*, Nxb. Nông nghiệp, Thành phố Hồ Chí Minh.
3. Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương (2012), Các bệnh nguy hiểm trên tôm nuôi ở Đồng bằng sông Cửu Long, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 22c, 106–118.
4. Mạc Như Bình, Hà Phương Thư, Trần Nguyên Thảo, Lê Thị Kim Anh, Nguyễn Thị Thanh Thủy, Đặng Đình Kim (2017), Tổng hợp hệ vật liệu nano tổ hợp mang kháng sinh (Ag-TiO₂-Doxycycline-Alginate) và đánh giá hiệu lực diệt khuẩn *Vibrio alginolyticus* gây bệnh trên tôm, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp*, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 1(2), 237–246.
5. Loc Tran., N. Linda., R.M. Redman., L.L. Mohney., R.P. Carlos., F. Kevin and D.V. Lightner, (2013), Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp, *Diseases of aquatic organisms*, 105(45–55), 2013.
6. Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Thị Trân Châu, (1972), *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học*, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
7. Nguyễn Trọng Nghĩa , Đặng Thị Hoàng Oanh, Trương Quốc Phú¹ và Phạm Anh Tuấn, (2015), Phân lập và xác định khả năng gây hoại tử gan tụy của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* phân lập từ tôm nuôi ở Bạc Liêu, *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 39(15), 99–107.
8. Tsai C. E. & Kondo F. (2001), Improved agar diffusion method for detecting residual antimicrobial agents, *Journal of food protection*, 64(3), 361–366.

**EVALUATION OF ANTIBACTERIAL ABILITY OF
NANOCOMPOSITE MATERIAL CONTAINING ANTIBIOTIC
AGAINST *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* CAUSING ACUTE
HAEPATOPANCREATIC NECROSIS SYNDROME (AHPNS)
ON WHITE LEG SHRIMP *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)**

Mac Nhu Binh^{1*}, Le Thi Kim Anh¹, Tran Nguyen Thao¹, Nguyen Huu Thinh¹, Nguyen Thi Thanh Thuy¹, Hoang Thi Yen Nhi¹, Ha Phuong Thu², Dang Dinh Kim³

¹ University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

² Institute Materials Sciences, Vietnam Academy of Science and Technology,

18 Hoang Quoc Viet St., Cau Giay, Hanoi, Vietnam

³ Institute of Environmental Technology, Vietnam Academy of Science and Technology,

18 Hoang Quoc Viet St., Cau Giay, Hanoi, Vietnam

Abstract: The antibacterial activity of the Ag-TiO₂-Doxycycline-Alginate (TiO₂-Ag/DO/Alg) nanocomposite material against *Vibrio parahaemolyticus*, causing acute haepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS) in white leg shrimp is evaluated in this study. The TiO₂-Ag/DO/Alg nanomaterial was synthesized at the Institute Materials Sciences – Vietnam Academy of Science and Technology. *Vibrio parahaemolyticus* was isolated from 60 shrimp samples on the basis of disease symptoms, morphological characteristics and ecological characteristics. The results show that the TiO₂-Ag/DO/Alg nanosystem is more effective than the conventional doxycycline antibiotic ($p < 0.05$). The inhibition zone diameter of the nanomaterial at the concentration of 50 ppm is larger than that of doxycycline at the concentration of 1000 ppm ($p < 0.05$).

Keywords: TiO₂-Ag/DO/Alg, *Vibrio parahaemolyticus*, AHPNS