

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ CỦA NANO BẠC PLASMA ĐỐI VỚI *Streptococcus agalactiae* GÂY BỆNH TRÊN CÁ RÔ PHI VÀ HIỆU QUẢ KHỬ TRÙNG TRONG PHÁC ĐỒ ĐIỀU TRỊ THỰC NGHIỆM

Trương Đình Hoài^{1*}, Đặng Thị Hoá¹, Trần Thị Trinh¹, Nguyễn Đức Chính¹,
Đặng Hữu Anh², Nguyễn Thị Hương Giang², Vũ Thị Hảo³, Lê Thị Hậu⁴, Đỗ Hoàng Tùng⁴

¹Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³Viện nghiên cứu Công nghệ Plasma

⁴Viện Vật lý - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

*Tác giả liên hệ: tdhoai@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 22.05.2024

Ngày chấp nhận đăng: 15.09.2024

TÓM TẮT

Nano bạc plasma là vật liệu mới, được tạo ra nhờ phương pháp plasma điện hoá bạc, có chất lượng, an toàn và hiệu quả khử trùng vượt trội hơn so với nano bạc thông thường, tuy nhiên chưa được nghiên cứu để ứng dụng trong lĩnh vực thủy sản. Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá khả năng diệt khuẩn *Streptococcus agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi bằng dung dịch nano bạc plasma làm tiền đề ứng dụng vào thực tiễn phòng trị bệnh trên thủy sản. Nano bạc plasma được đánh giá có khả năng ức chế vi khuẩn trong điều kiện *in vitro*, kiểm tra độ an toàn trên cá thí nghiệm và khả năng khử trùng trong các phác đồ điều trị cho cá được gây nhiễm thực nghiệm. Kết quả nghiên cứu cho thấy nano bạc plasma ở các nồng độ 0,25; 0,5 và 1ppm có khả năng ức chế 97,8; 99,9 và 100% vi khuẩn *S. agalactiae* trong điều kiện *in vitro* và an toàn với rô phi khi được ngâm khử trùng. Sử dụng nano bạc plasma (0,5ppm) có khả năng sát trùng tương đương BKC (0,5ppm) và Glutandehyl 0,05ppm trong các phác đồ điều trị bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá rô phi bằng kháng sinh amoxiciline (40 mg/kg cá) trong điều kiện thực nghiệm.

Từ khoá: Nano bạc plasma, *Streptococcus agalactiae*, khử trùng, thực nghiệm điều trị.

Evaluation of the Inhibitory Effect of Plasma Silver Nanoparticles on *Streptococcus agalactiae* Caused Disease in Tilapia and the Disinfection Efficiency in Experimental Treatment Protocols

ABSTRACT

Nanosilver plasma, a new material created through the electrochemical silver plasma method, is believed for its higher potent antimicrobial activity against different types of bacteria. However, its application in aquaculture has yet to be extensively researched. This study evaluated the efficacy of nanosilver plasma in eliminating pathogenic bacteria *Streptococcus agalactiae* in tilapia, aiming to lay the groundwork for its practical use in disease prevention and treatment in aquaculture. Nanosilver plasma was examined for its capacity to inhibit bacterial growth under *in vitro* conditions, its safety on fish and its disinfection capability in experimental treatments. The research results demonstrate that nanosilver plasma at concentrations of 0.25, 0.5, and 1 ppm inhibited 97.8%, 99.9%, and 100% of *S. agalactiae*, respectively, under *in vitro* conditions and was entirely safe for tilapia when used for soaking and sterilization. Nanosilver plasma at 0.5ppm exhibits antiseptic capabilities comparable to BKC (0.5ppm) and Glutandehyl (0.05ppm) in treating diseases caused by *S. agalactiae* in tilapia, alongside the antibiotic amoxicillin (40 mg/kg fish) under experimental conditions.

Keywords: Nanosilver plasma, *Streptococcus agalactiae*, disinfection, experimental treatment.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá rô phi sinh trưởng nhanh, chống chịu môi trường tốt, thịt trắng, thơm ngon, không có xương dăm, phù hợp chế biến phục vụ xuất khẩu và được thị trường ưa chuộng. Để đạt được sản lượng và lợi nhuận cao nhất, nhiều phương thức nuôi thâm canh, nuôi cao sản đang áp dụng. Tuy nhiên, ảnh hưởng của ô nhiễm môi trường và dịch bệnh ngày càng lớn dẫn đến giảm tỉ lệ sống, năng suất và hiệu quả nuôi trồng. Trong số các bệnh của cá rô phi thì nguyên nhân chủ yếu là do vi khuẩn gây ra (Haenen & cs., 2023). Theo báo cáo của Abdel-Latif & cs. (2020), hiện nay các nhóm vi khuẩn chính đã và đang gây bệnh trên cá rô phi nuôi gồm bệnh xuất huyết *Streptococcosis* do liên cầu khuẩn, bệnh do vi khuẩn dạng sợi *Columnaris*, bệnh hoại tử nội tạng *Francisellosis* và *Edwardsiellosis*, bệnh xuất huyết do *Aeromonas* sp., bệnh trứng đỏ *Hahellosis* và bệnh bào nang do *Epitheliocystis*. Trong đó, mức độ thiệt hại lớn nhất và ảnh hưởng nhiều nhất là bệnh do vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* gây ra.

Bạc được biết đến là nguyên tố hóa học có khả năng kháng khuẩn mạnh, đặc biệt khi vật liệu có kích thước ở mức nano, cụ thể là dưới dạng hạt nano bạc (Thuy & cs., 2022). Hạt nano bạc được sử dụng rộng rãi trong y tế, nông nghiệp để sát trùng vết thương hoặc khử trùng nước nuôi (Márquez & cs., 2018; Thuy & cs., 2022). Tuy nhiên, nano bạc thông thường có thể ảnh hưởng đến môi trường, sức khỏe của động vật và con người nếu liều lượng sử dụng không được nghiên cứu kỹ lưỡng, hoặc kích cỡ của hạt nano bạc quá lớn (Khan & cs., 2015; Rezvani & cs., 2019). Do vậy, việc tiếp cận với các sản phẩm hạt nano bạc chất lượng cao, kích thước nhỏ, đồng đều và an toàn là một thách thức do cần áp dụng các công nghệ và kéo theo giá thành cao hơn so với các chất khử trùng khác. Nano bạc có thể được chế tạo bằng nhiều phương pháp khác nhau, tuy nhiên phương pháp plasma điện hoá là phương pháp dễ sản xuất và tạo ra sản phẩm với chi phí thấp hơn

so với các phương pháp thông thường. Hiện nay, công nghệ chế tạo nano bạc sử dụng kỹ thuật tương tác plasma đã được nghiên cứu, sản xuất. Nano bạc plasma có chất lượng, an toàn và hiệu quả khử trùng vượt trội hơn so với nano bạc thông thường (Kondeti & cs., 2017). Trong phương pháp plasma điện hoá, kích thước hạt nano có thể được điều khiển, được tích điện âm trong môi trường plasma nên bền và phân tán tốt hơn nano bạc thông thường và làm tăng khả năng khử trùng so với nano bạc thông thường (Weerasinghe & cs., 2020). Trong lĩnh vực thủy sản, nano bạc plasma là vật liệu mới chưa được nghiên cứu thử nghiệm và đánh giá khả năng ứng dụng trong khử trùng nước ao nuôi.

Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá bước đầu khả năng diệt khuẩn của nano bạc plasma lên vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi trong điều kiện thực nghiệm để cung cấp thông tin cho các nghiên cứu ứng dụng vào thực tiễn phòng trị bệnh trên cá rô phi nói riêng và trong nuôi trồng thủy sản nói chung.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Nghiên cứu sử dụng các vật liệu gồm: dung dịch nano bạc plasma (500ppm) được điều chế tại Viện Nghiên cứu Công nghệ Plasma bằng phương pháp plasma hóa bạc trong môi trường nước khử ion bổ sung chất hoạt động bề mặt Polyvinylpyrrolidone theo mô tả của Đỗ Hoàng Tùng (2023). Vi khuẩn *S. agalactiae* (ký hiệu ST-RP-HN-5-22) phân lập được từ cá rô phi nhiễm bệnh năm 2022 tại Hà Nội, chủng vi khuẩn được lưu giữ trong glyceron ở điều kiện -80°C . Vi khuẩn được nuôi cấy phục hồi và giám định lại bằng phương pháp sinh hóa và PCR trước khi sử dụng cho các thí nghiệm. Cá rô phi khoẻ mạnh được nhập từ trại giống và nuôi thuần trước khi tiến hành thí nghiệm. Các dụng cụ và thiết bị trong phòng thí nghiệm để đánh giá khả năng diệt khuẩn của nano bạc plasma.

Đánh giá khả năng ức chế của nano bạc plasma đối với *Streptococcus agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi và hiệu quả khử trùng trong phác đồ điều trị thực nghiệm

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đánh giá khả năng diệt khuẩn *S. agalactiae* của nano bạc plasma

Khả năng diệt vi khuẩn *S. agalactiae* của nano bạc plasma được thực hiện dựa theo phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của Wiegand & cs. (2008) với một số thay đổi nhỏ. Tiến hành pha loãng nano bạc plasma theo dãy nồng độ: 0ppm; 0,125ppm; 0,25ppm; 0,5ppm; 1ppm; 2ppm; 4ppm; 8ppm. Vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường TSB ở 28°C trong 36h, sau đó tiến hành đo mật độ bằng máy so màu quang phổ (UV vis) ở bước sóng 600 nm (OD_{600}) và được điều chỉnh về 10^8 CFU/ml kết hợp với nuôi cấy, đếm mật độ trên đĩa thạch. Tiến hành hút 1ml vi khuẩn có nồng độ 10^6 CFU/ml cho vào 9ml nano bạc plasma ở dãy nồng độ khác nhau đã chuẩn bị. Hỗn hợp được ngâm ở 28°C trong các khoảng thời gian khác nhau gồm: 3h, 6h, 12h, 24h, 48h và 72h. Sau mỗi khoảng thời gian ủ, tiến hành hút 100 μ l và cấy trên các đĩa thạch Mueller Hinton Agar (MHA). Sau 36h cấy, kiểm tra số lượng khuẩn lạc trên từng đĩa thạch và xác định khả năng diệt khuẩn của nano bạc plasma ở các nồng độ khác nhau và ở các khoảng thời gian ủ khác nhau. Thí nghiệm được lặp lại ba lần.

2.2.2. Đánh giá mức độ an toàn của nano bạc plasma

Để ứng dụng được vào thực tiễn khử trùng ao nuôi, các chất khử trùng cần có tác dụng diệt khuẩn cao nhưng vừa cần an toàn cho động vật thủy sản. Tiến hành bố trí thí nghiệm với cá nuôi trong các bể 100l, mỗi bể chứa 15 cá (kích cỡ 30-35g), tiến hành khử trùng nước hai lần, mỗi lần cách nhau 3 ngày. Nồng độ thử nghiệm lần lượt từ nồng độ thấp nhất 0,125ppm đến nồng độ ức chế tối thiểu 100% vi khuẩn thử nghiệm từ kết quả thí nghiệm trước đó. Tiến hành theo dõi cá thí nghiệm, kiểm tra và ghi chép các triệu chứng bất thường, đánh giá tỉ lệ sống sau 7 ngày thí nghiệm, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Nồng độ an toàn được xác định là nồng độ không gây chết cá, không gây ra các

dấu hiệu bất thường, cá khỏe mạnh sau 7 ngày theo dõi.

2.2.3. Đánh giá hiệu quả phối hợp điều trị của các phác đồ sử dụng nano bạc plasma với các chất khử trùng khác (BKC, Glutataldehyte)

Để đánh giá hiệu quả phối hợp trong điều trị bệnh do *S. agalactiae* gây ra bằng nano bạc plasma và so sánh với các chất khử trùng thường dùng trong nuôi trồng thủy sản gồm BKC, Glutaraldehyde, cá được gây nhiễm thực nghiệm và áp dụng các phác đồ điều trị ở quy mô phòng thí nghiệm. Chủng vi khuẩn *S. agalactiae* ST-RP-HN-3-22 đã được phân lập, định danh và đánh giá liều gây chết 50% $LD_{50} = 3,2 \times 10^3$ CFU/ml đã được nghiên cứu và công bố trước đó được sử dụng để tiến hành gây nhiễm thực nghiệm (Trương Đình Hoài & cs., 2024). Vi khuẩn được nuôi cấy thuần, giám định và định lượng liều LD_{50} để sử dụng gây nhiễm theo phương pháp tiêm vào xoang bụng. Tiến hành theo dõi sức khỏe 2 lần/ngày để phát hiện các triệu chứng khi cá nhiễm bệnh như đen thân, bơi tách đàn, bơi bất thường. Khi cá bắt đầu có dấu hiệu bệnh và > 30% cá trong bể có dấu hiệu bệnh thì tiến hành các phác đồ điều trị. Tổng số 15 bể thí nghiệm chứa 100l nước, mỗi bể nuôi 15 cá rô phi (kích cỡ 35-40 g/con). Thí nghiệm được bố trí gồm 5 lô: Lô TN1: đối chứng (-) chỉ tiêm PBS, không khử trùng; Lô TN2 đối chứng (+) cảm nhiễm liều LD_{50} và không điều trị; Lô TN3: cảm nhiễm liều LD_{50} , khử trùng bằng nano bạc plasma với nồng độ 0,5ppm và cho cá ăn amoxicillin; Lô TN4: cảm nhiễm liều LD_{50} , khử trùng bằng BKC 800 với nồng độ 0,5ppm và cho cá ăn amoxicillin; Lô TN5: cảm nhiễm vi khuẩn liều LD_{50} , khử trùng bằng glutaraldehyde 0,5ppm và cho cá ăn amoxicillin. Kháng sinh amoxicillin được sử dụng với liều lượng 40 mg/kg cá/ngày, đây là kháng sinh nhạy với chủng vi khuẩn ST-RP-HN-3-22 (Trương Đình Hoài & cs., 2024), kháng sinh được trộn vào thức ăn và cho cá ăn 5 ngày liên tục. Mẫu nước được lấy ở các bể thí nghiệm ở các thời điểm trước thời điểm khử trùng (0h), 24, 48 và 72h sau khi khử trùng để đánh giá mật độ vi khuẩn tổng số.

Hàng ngày tiến hành kiểm tra, ghi chép số lượng cá chết ở các lô thí nghiệm, các thông số môi trường (nhiệt độ, pH, DO, NH₃) bằng các máy DO meter (Japan) và YSI (USA). Với các mẫu cá mới chết, hoặc sắp chết, tiến hành giải phẫu quan sát triệu chứng bệnh tích và phân lập, giám định lại bằng kỹ thuật PCR để khẳng định tác nhân theo mô tả của Trương Đình Hoài & cs. (2024). Sau 14 ngày từ khi bắt đầu thí nghiệm, hiệu quả điều trị được đánh giá thông qua tỉ lệ sống của cá rô phi ở các lô.

2.2.4. Xử lý số liệu

Tỷ lệ diệt khuẩn *S. agalactiae* trong thí nghiệm *in vitro* được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ diệt khuẩn} = \frac{\text{Mật độ khuẩn lạc sau khi ngâm khử trùng}}{\text{Mật độ khuẩn lạc vi khuẩn trước khi ngâm khử trùng}} \times 100$$

Tỉ lệ sống của cá ở các lô thí nghiệm được tính theo công thức:

$$\text{Tỉ lệ sống} = \frac{\text{Số cá còn sống khi kết thúc thí nghiệm}}{\text{Số cá khi bắt đầu thí nghiệm}} \times 100$$

Mật độ vi khuẩn được trình bày ở giá trị trung bình của ba lần lặp, tỉ lệ sống được so sánh và phân tích thống kê với phép thử Chi-square trên phần mềm SPSS 2020.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả kiểm tra sản phẩm nano bạc plasma sau chế tạo

Sau khi nano bạc plasma được điều chế bằng cách plasma hóa bạc trong môi trường nước khử ion bổ sung chất hoạt động bề mặt Polyvinylpyrrolidone (PVP) với lượng 2 g/l, trong đó điện cực âm là thanh molybden đầu nhọn được cho tiếp xúc gần với điện cực dương bạc trong khoảng từ 1,5 đến 2mm, cường độ dòng điện xung DC cao áp 6kV, tần số 25Hz để tạo ra dòng plasma cực đại 1,4A trên điện cực

dương đã tạo nên các hạt nano bạc plasma hình cầu kích thước khoảng từ 5 đến 10nm, nồng độ 500ppm trước khi đưa vào sử dụng. Kết quả kiểm tra chất lượng dung dịch Nano bạc plasma trước khi đưa vào sử dụng được thể hiện ở hình 1. Dung dịch chứa các hạt nano bạc plasma có kích cỡ khá đồng đều, đường kính dao động từ 4-10nm. Đảm bảo yêu cầu của sản phẩm trước khi đưa vào thử nghiệm.

3.2. Kết quả đánh giá khả năng diệt khuẩn *S. agalactiae* của nano bạc plasma

Nồng độ ức chế tối thiểu của nano bạc plasma với vi khuẩn *S. agalactiae* được thể hiện ở bảng 1.

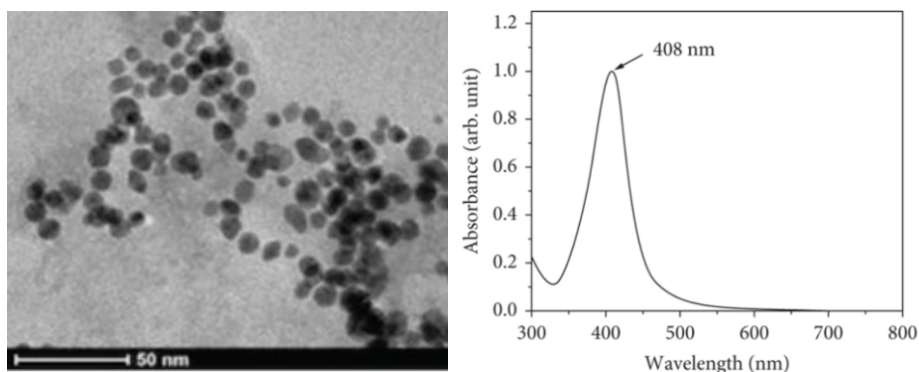
Kết quả thử nghiệm nồng độ nano bạc plasma từ 0,125ppm trở lên cho thấy hiệu quả ức chế vi khuẩn *S. agalactiae* đạt 55,9% chỉ sau 3 giờ, cao nhất ở 6 giờ với 61,0% và sau đó giảm xuống 9,4% sau 72 giờ theo dõi. Ở nồng độ 0,25ppm, hiệu quả khử trùng rất rõ rệt, kết quả kiểm tra ở 3h đến 72h sau khi khử trùng, hơn 97% vi khuẩn đã bị ức chế. Ở nồng độ 0,5ppm, khả năng ức chế vi khuẩn đạt mức 98,4% sau 3 giờ và tăng lên 99,9% ở thời điểm 24-72 giờ. Khi nồng độ tăng lên 1ppm, khả năng đối kháng lên tới 100% sau 24 giờ và duy trì đến 72 giờ. Ở nồng độ 2, 4, 8ppm, nano bạc plasma có khả năng diệt khuẩn mạnh, 100% vi khuẩn bị ức chế trong 3h đầu và kéo dài trong 72 giờ theo dõi (Bảng 1, Hình 2). Như vậy nồng độ ức chế tối thiểu MIC của nano bạc plasma với vi khuẩn *S. agalactiae* là 1ppm. Tuy nhiên, liều 0,25 và 0,5ppm có thể sử dụng để ứng dụng trong khử trùng nước nuôi trong thực tế do tỉ lệ diệt khuẩn rất cao 97,9-99,9% lượng vi khuẩn *S. agalactiae* trong 72h.

Nghiên cứu về các hạt nano đã tập trung vào việc phát triển cả phương pháp tổng hợp và ứng dụng, đặc biệt là trong lĩnh vực y sinh học. Các hạt nano bạc đã được sử dụng rộng rãi nhờ hoạt tính diệt khuẩn đặc biệt của chúng (Chen & Schluesener, 2008). Trong y học, nano bạc đã được công nhận là chất kháng khuẩn và được sử dụng làm vật liệu phủ trên các thiết bị y tế (Haleem & cs., 2023). Tuy nhiên, một số hóa chất độc hại được sử dụng trong quá trình tổng

Đánh giá khả năng ức chế của nano bạc plasma đối với *Streptococcus agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi và hiệu quả khử trùng trong phác đồ điều trị thực nghiệm

hợp nano bạc, ngoài ra nano bạc khó phân huỷ trong môi trường dễ gây tồn dư, là một trong những nhược điểm khi sử dụng sản phẩm nano bạc (Davoodbasha & cs., 2016). Nano bạc plasma có nhiều ưu điểm vượt trội như hạt nano bạc được tạo ra do plasma khử ion Ag^+ giải phóng từ điện cực trong quá trình ăn mòn điện hóa. Plasma còn giải phóng các electron tích điện âm khiến các hạt nano bạc đẩy nhau, không kết đám. Quá trình plasma hoá này không cần dùng chất khử, không dùng muối bạc và không cần chất bảo vệ hạt nano. Do vậy, chúng sạch tuyệt đối, tương đương nguyên liệu hóa được, có kích thước nhỏ, đồng đều nên tối ưu hiệu quả diệt khuẩn. Ngoài ra nano bạc plasma không kén nước, hoạt tính có tính bền cao nhưng lại an toàn với người và vật nuôi so với nano bạc thông thường (Davoodbasha & cs., 2016). Nano bạc plasma có phổ kháng khuẩn rộng trên cả chủng Gram (-) và Gram (+), ngoài ra hoạt chất này còn có khả năng kháng nấm (Ko & cs., 2023; Shuaib & cs., 2020;

Weerasinghe & cs., 2020). Ion Ag^+ chính là yếu tố có khả năng kháng khuẩn được giải phóng từ các hạt nano bạc, kích thước hạt càng nhỏ thì tốc độ giải phóng Ag^+ càng tăng dẫn đến khả năng kháng khuẩn càng mạnh (Kang & cs., 2023) Khả năng diệt vi khuẩn *E. coli*, *Bacillus subtilis* và nấm *Aspergillus niger* bằng nano bạc plasma được thử nghiệm và cho kết quả tốt trong điều kiện thí nghiệm (Kang & cs., 2023; Shuaib & cs., 2020). Đối với nấm, nano bạc tổng hợp bằng biện pháp vật lý có nồng độ ức chế tối thiểu là 2,71ppm (Davoodbasha & cs., 2016). Với nano bạc thông thường khả năng ức chế tối thiểu với *Aeromonas veronii* gây bệnh trên cá rô phi là 3,125ppm (Elgendy & cs., 2022). Như vậy, có thể thấy nano bạc plasma có khả năng diệt khuẩn với nồng độ ức chế tối thiểu với *S. agalactiae* ở mức 1ppm là khá vượt trội. Tuy nhiên, để đánh giá chính xác cần có thêm các thử nghiệm trên cùng một tác nhân gây bệnh để đánh giá toàn diện khả năng khử trùng của nano bạc plasma so với nano bạc thông thường.

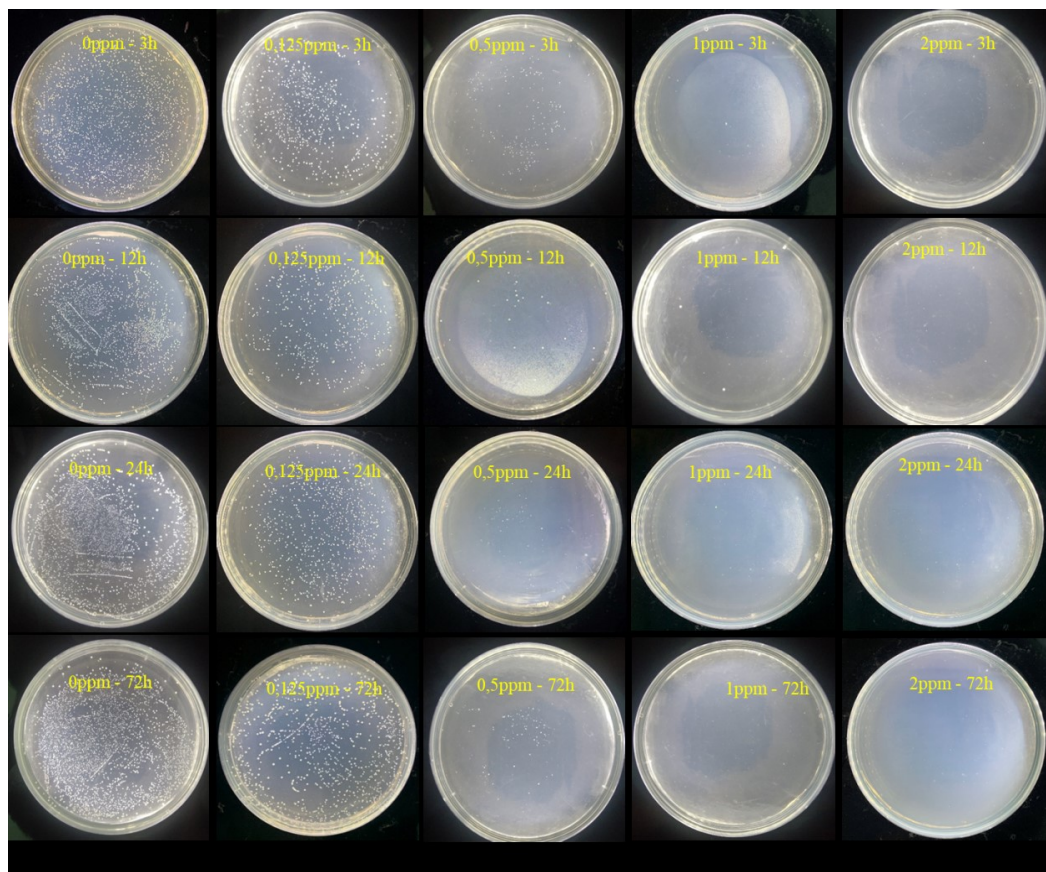


Hình 1. Ảnh chụp mẫu nano bạc plasma thu được trên kính hiển vi điện tử (TEM) và phổ cộng hưởng plasmon đánh giá mức độ phân bố kích thước của mẫu hạt nano bạc plasma

Bảng 1. Tỷ lệ ức chế vi khuẩn (%) của nano bạc plasma ở các nồng độ khác nhau

Thời gian (giờ)	Nồng độ nano bạc plasma sử dụng (ppm)*							
	0	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
3	0	55,9	97,8	98,4	99,5	100	100	100
6	0	61,0	98,0	99,0	99,9	100	100	100
12	0	36,2	97,3	99,6	99,9	100	100	100
24	0	31,3	97,1	99,9	100,0	100	100	100
48	0	13,5	97,7	99,9	100,0	100	100	100
72	0	9,4	97,8	99,9	100,0	100	100	100

Ghi chú: *: Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.



Ghi chú : A : Đối chứng; B: 0,125ppm; C: 0,5ppm; D: 1ppm; E: 2ppm.

Hình 2. Kết quả kiểm tra khả năng ức chế *S. agalactiae* trong 72h thử nghiệm

Bảng 2. Tỷ lệ chết của cá rô phi khi khử trùng bằng nano bạc plasma ở các nồng độ khác nhau sau 96h theo dõi

Nồng độ Nano bạc plasma (ppm)	Số cá thí nghiệm*	Số cá chết trung bình*	Tỷ lệ chết (%)
0	15	0	0
0,25	15	0	0
0,50	15	0	0
1,00	15	0	0

Ghi chú: *: Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

3.3. Kết quả xác định mức độ an toàn

Theo hướng dẫn của OECD 201 (2006), thông số LC_{50-96h} là một trong những thông tin quan trọng để đánh giá độc tính của hóa chất sử dụng. Từ kết quả đánh giá các nồng độ và khả năng ức chế, với các liều lượng tiềm năng ứng dụng, chúng tôi thử nghiệm khả năng gây độc cho cá bằng cách khử trùng nước nuôi các nồng độ 0,25; 0,5 và 1ppm với lô đối chứng không khử

trùng. Kết quả thử nghiệm đánh giá độc tính của nano bạc plasma trên cá rô phi theo đường ngâm được thể hiện ở bảng 2.

Đối với Nano bạc thông thường, LC_{50-96h} của nano bạc hóa học trên cá vượt là 1,569 mg/l (Bita & cs., 2021), trên cá hồi vân 0,25; 0,71 và 2,16ppm cho cá bột, cá hương và cá giống (Khan & cs., 2015). Như vậy có thể nói, nano bạc có độc độ khác nhau tùy loài nuôi và giai đoạn phát triển của các loài thủy sản.

Đánh giá khả năng ức chế của nano bạc plasma đối với *Streptococcus agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi và hiệu quả khử trùng trong phác đồ điều trị thực nghiệm

Đối với nano bạc plasma, ở các lô thí nghiệm với nồng độ nano bạc plasma 0ppm; 0,25ppm; 0,5ppm và 1ppm không có cá chết sau 96 giờ theo dõi và an toàn cho cá rô phi nếu sử dụng với liều lượng dưới 1ppm. Như vậy, nồng độ nano bạc plasma trong khoảng 0,25-1ppm, an toàn với cá rô phi cỡ (30-35 g/con) và có thể diệt 97-100% vi khuẩn *S. agalactiae* trong nước nuôi. Tuy nhiên, những nghiên cứu tiếp theo cần thử nghiệm mức độ an toàn ở các kích cỡ cá nhỏ hơn, thực hiện đánh giá tổn thương mô học để đánh giá đầy đủ về mức độ an toàn, trước khi ứng dụng nano bạc plasma trong thực tiễn phòng bệnh ở cá rô phi.

3.4. Kết quả đánh giá hiệu quả phối hợp của nano bạc plasma trong phác đồ điều trị bệnh do *S. agalactiae* trên cá rô phi

Sau khi kết thúc các thí nghiệm về khả năng ức chế và mức độ an toàn, chúng tôi lựa chọn nồng độ khử trùng cho nano bạc plasma trong nghiên cứu phối hợp phòng trị là 0,5ppm dựa trên mức độ diệt khuẩn, sự an toàn, hiệu quả kinh tế để áp dụng vào thực tế sản xuất. Trong quá trình thử nghiệm phối hợp điều trị,

các thông số môi trường được kiểm tra định kỳ và ghi chép vào nhật ký thí nghiệm, oxy được cung cấp liên tục nhằm đảm bảo sức khỏe của cá trong quá trình thử nghiệm. Kết quả theo dõi môi trường trong thí nghiệm được thể hiện ở bảng 3.

Yếu tố nhiệt độ nước thí nghiệm dao động từ 28-30°C, đây là khoảng nhiệt phù hợp trong môi trường ao nuôi cá rô phi, đồng thời thuận lợi cho vi khuẩn gây bệnh (Devi & cs., 2017). Bên cạnh đó, pH cũng dao động trong khoảng 7-8. DO duy trì trên 4,3 mg/l, nồng độ NH₃ và nằm NO₂ luôn nằm trong ngưỡng an toàn cho cá. Các thông số môi trường đều nằm trong khoảng thích hợp cho cá rô phi (Boyd, 1982) và không có sự khác biệt giữa các lô thí nghiệm.

Phác đồ điều trị được áp dụng trong ngày thứ 3 sau cảm nhiễm, ở thời điểm > 30% cá rô phi ở các nghiệm thức tiêm cảm nhiễm đều được ghi nhận biểu hiện đen thân, tách đàn, vận động chậm. Kết quả kiểm tra mật độ vi khuẩn tổng số trung bình của nước nuôi ở các bể cảm nhiễm trước thời điểm điều trị dao động trong khoảng 4,4-5,4 × 10⁴ CFU/ml, trong bể đối chứng âm (cá không cảm nhiễm) là 6,8 × 10² CFU/ml.

Bảng 3. Kết quả một số yếu tố môi trường trong quá trình điều trị

Chỉ tiêu	Lô thí nghiệm				
	ĐC (-)	ĐC (+)	Nano bạc plasma	BKC	Glutaraldehyde
Nhiệt độ (°C)	28-30	28-30	28-30	28-30	28-30
pH	7-8	7-8	7-8	7-8	7-8
DO (mg/l)	4,3-5,5	4,3-5,5	4,3-5,5	4,3-5,5	4,3-5,5
NH ₃ (mg/l)	0-0,25	0-0,25	0-0,25	0-0,25	0-0,25
NO ₂ ⁻ (mg/l)	0-0,5	0-0,5	0-0,5	0-0,5	0-0,5

Bảng 4. Kết quả đánh giá khả năng khử khuẩn của nano bạc plasma trong nước nuôi cá rô phi trong điều kiện thực nghiệm

Lô thí nghiệm	Mật độ vi khuẩn tổng số (CFU/ml)*			
	Trước thời điểm khử trùng	24 giờ	48 giờ	72 giờ
ĐC (-)	(6,9 ^a ± 0,1) × 10 ²	(1,3 ^b ± 0,1) × 10 ³	(3,8 ^c ± 0,2) × 10 ³	(8,0 ^d ± 0,3) × 10 ³
ĐC (+)	(4,3 ^a ± 0,3) × 10 ⁴	(4,8 ^b ± 0,1) × 10 ⁵	(2,4 ^c ± 0,1) × 10 ⁶	(6,8 ^d ± 0,1) × 10 ⁶
Nano bạc plasma (0,5ppm)	(5,1 ^a ± 0,1) × 10 ⁴	(4,7 ^b ± 1,2) × 10 ¹	(3,0 ^c ± 1,0) × 10 ¹	(6,7 ^d ± 1,2) × 10 ¹
BKC (0,5 ppm)	(5,5 ^a ± 0,1) × 10 ⁴	(4,3 ^b ± 0,6) × 10 ¹	(1,7 ^c ± 0,6) × 10 ¹	(6,0 ^d ± 1,0) × 10 ¹
Glutaraldehyde (0,5 ppm)	(4,9 ^a ± 0,1) × 10 ^{4a}	(6,0 ^b ± 1,0) × 10 ¹	(3,3 ^c ± 1,2) × 10 ^{1c}	(5,7 ^d ± 1,5) × 10 ¹

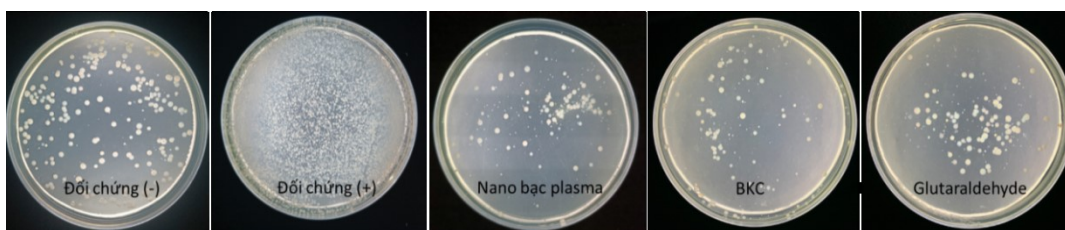
Ghi chú: Trên cùng một hàng, các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt thống kê (P < 0,05).

Sau khi khử trùng bằng các chất sát trùng BKC, Glutaraldehyde và nano bạc plasma, kết quả đánh giá hiệu quả khử trùng sau 24, 48 và 72 giờ được trình bày ở bảng 4.

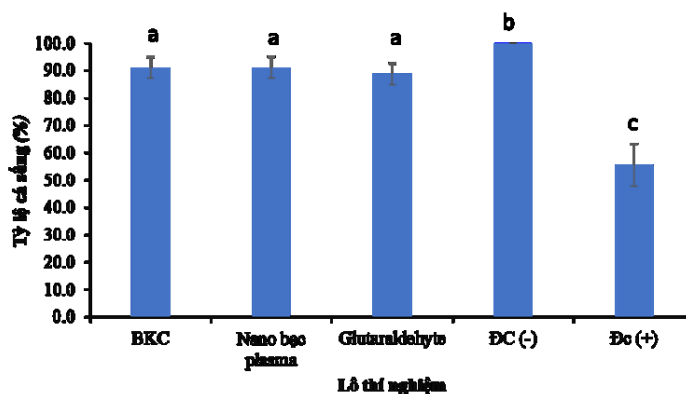
Từ kết quả trên cho thấy mật độ vi khuẩn tổng số ở lô ĐC(-) tăng lên từ $6,9 \times 10^2$ CFU/ml tới $8,0 \times 10^3$ CFU/ml với sau 72h theo dõi. Trong khi các lô được tiêm cảm nhiễm, mật độ vi khuẩn tăng nhanh chóng so với lô ĐC(-), dao động trong khoảng $4,3-5,5 \times 10^4$ CFU/ml. Sau quá trình khử trùng nano bạc plasma, BKC và Glutaraldehyde ở cùng nồng độ 0,5ppm, mật độ vi khuẩn trong các bể giảm

nhau sau 24 giờ và tiếp tục giảm sau 48 giờ và xu hướng tăng nhẹ trở lại sau 72h theo dõi (Hình 3). Các chất khử trùng nước thường có tác dụng mạnh trong 48h đầu, vì sinh vật trong nước sẽ phát triển trở lại, do vậy mật độ vi khuẩn tổng số sẽ có xu hướng tăng lên sau 72h là quy luật bình thường.

Kết quả phân tích thống kê cho thấy không có sự khác biệt giữa khả năng diệt khuẩn của Nano bạc plasma, BKC và Glutaraldehyde. Như vậy, có thể thấy nano bạc plasma có khả năng diệt vi khuẩn tương đương với hai chất sát trùng phổ biến hiện nay.

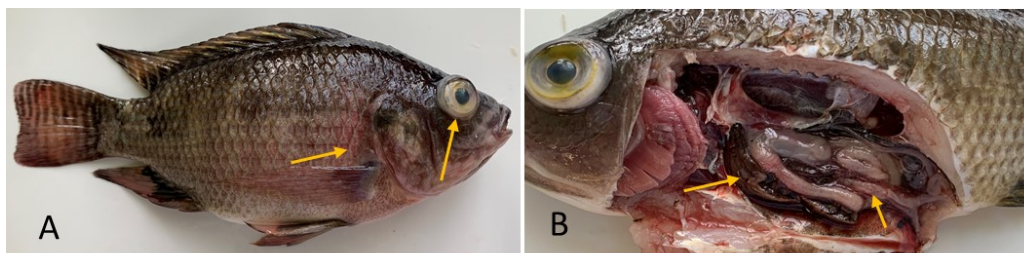


Hình 3. Vi khuẩn sau 72 giờ khử trùng ở các lô thí nghiệm



Ghi chú : Chữ số khác nhau thể hiện sự sai khác về tỉ lệ sống ở các nghiệm thức có ý nghĩa thống kê ở mức 95% ($P < 0,05$).

Hình 4. Biểu đồ thể hiện tỉ lệ sống của cá tại các phác đồ điều trị



Ghi chú : A: Biểu hiện đen thân, mắt lồi, xuất huyết; B: Nội quan xuất huyết và tụ huyết.

Hình 5. Kết quả kiểm tra tác nhân gây chết cá trong thí nghiệm

Đánh giá khả năng ức chế của nano bạc plasma đối với *Streptococcus agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi và hiệu quả khử trùng trong phác đồ điều trị thực nghiệm

Hiệu quả hỗ trợ điều trị bệnh trên cá rô phi của nano bạc plasma được đánh giá bằng tỉ lệ chết cộng dồn, số cá sống và tỉ lệ sống sau điều trị. Kết quả theo dõi số cá chết ở các nghiệm thức và tỉ lệ chết được thể hiện ở hình 4.

Từ kết quả thu được ở hình 4 có thể thấy rằng tỉ lệ sống ở lô thí nghiệm ĐC (-) là 100%, trong khi, tỉ lệ sống ở lô ĐC (+) trung bình ở mức 55,6%. Ở nghiệm thức sát trùng bằng Glutaraldehyde cũng cho hiệu quả điều trị cao, tỉ lệ sống sau 14 ngày theo dõi ở các lần lặp đều trên 85% tổng số cá thí nghiệm, trung bình đạt 88,9%. Hai phác đồ có sử dụng BKC và nano bạc plasma với tỉ lệ sống của cá ở mức trên 91,1%. Kết quả so sánh thống kê cho thấy ba lô được điều trị bằng kháng sinh kết hợp khử trùng có tỉ lệ sống cao hơn so với lô đối chứng dương ($P < 0,05$), tuy nhiên kết quả so sánh thống kê cho thấy tỉ lệ sống của 3 lô được điều trị kết hợp và khử trùng không có sự khác biệt thống kê ($P > 0,05$). Điều này cho thấy nano bạc plasma có khả năng khử trùng tương đương với các loại chất khử trùng thông thường như BKC và Glutaraldehyde.

Kết quả kiểm tra các mẫu cá chết ở các lô thí nghiệm, đặc biệt là lô ĐC (+) thể hiện triệu chứng đen thân, mắt lồi, nội quan sưng, xuất huyết và tụ huyết (Hình 5), các đặc điểm lâm sàng tương đồng với mô tả của Trương Đình Hoài & cs. (2014; 2024). Kết quả phân lập và giám định tác nhân gây chết trong thí nghiệm bằng kỹ thuật PCR theo mô tả của Trương Đình Hoài & cs. (2024a) xác nhận lại cá nhiễm bệnh vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra. Cá khỏi bệnh sau điều trị hoạt động mạnh, linh hoạt và có trạng thái sức khỏe bình thường sau 14 ngày theo dõi.

Nano bạc có thể gây độc cho cá và tồn dư trong môi trường. Kết quả nghiên cứu của Lazim & cs. (2023) cho thấy khi kiểm tra mẫu nước, trầm tích và cá ở sông Skudai, Malaysia cho thấy một lượng lớn mẫu có chứa các hạt nano bạc, đặt biệt kết quả phân tích bằng kỹ thuật TEM-EDX cho thấy các hạt tồn dư dao động từ 20-25nm. Như vậy có thể nói, chất lượng nano bạc, kích cỡ hạt nano ảnh hưởng rất lớn đến khả năng diệt khuẩn và sự tồn dư trong môi trường. Kích thước của nano bạc plasma với công nghệ mới tạo ra hạt nano bạc bằng plasma

hoá với kích cỡ giao động 4-10nm có thể giúp giảm thiểu nguy cơ tồn dư trong môi trường. Tuy nhiên cần có các nghiên cứu chuyên sâu để đánh giá trong thời gian tới.

Trong nghiên cứu này, nano bạc plasma được thử nghiệm lần đầu tiên trên vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá rô phi, tuy nhiên hiện nay các mô hình nuôi ghép nhiều loài cá khác nhau đang khá phổ biến, mặt khác vi khuẩn này đang bùng phát và gây bệnh cho nhiều loài cá nước ngọt khác như cá trắm đen, rô đồng, ếch (Kim Văn Vạn & Trương Đình Hoài, 2021; Đặng Thị Hoà & cs., 2023; Trương Đình Hoài & cs., 2024b) do vậy cần thêm các thử nghiệm đánh giá an toàn và hiệu quả khử trùng trên nhiều đối tượng để việc ứng dụng nano bạc plasma trong các phác đồ phòng, điều trị có hiệu quả ở nhiều mô hình và đa dạng các đối tượng nuôi khác nhau.

4. KẾT LUẬN

Nano bạc plasma ở nồng độ 0,25-1ppm có khả năng ức chế 97,8-100% vi khuẩn *S. agalactiae* trong 72h theo dõi và an toàn với cá rô phi. Nano bạc plasma ở nồng độ 0,5ppm có khả năng sát trùng tương đương BKC và Glutaraldehyde ở cùng nồng độ khi áp dụng vào các phác đồ điều trị bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá rô phi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdel-Latif H.M., Dawood M.A., Menanteau-Ledouble S. & El-Matbouli M. (2020). The nature and consequences of co-infections in tilapia: A review. *Journal of Fish Diseases*. 43(6): 651-664.
- Bitá S., Balouch A. & Mohammadian T. (2021). Determination of lethal concentration (LC50) of silver nanoparticles produced by biological and chemical methods in Asian seabass fish. *International Journal of Aquatic Research and Environmental Studies*. 1(2): 7-12.
- Boyd C.E. (1982). *Water quality management for pond fish culture*. Elsevier Scientific Publishing Co.
- Chen X. & Schluesener H. (2008). Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicology letters*. 176(1): 1-12.
- Đặng Thị Hóa, Vũ Đức Mạnh, Tô Thị Ngọc Anh, Trần Thị Trinh, Đoàn Thị Ninh, Kim Văn Vạn, Trương Đình Hoài (2023). Phân lập và đánh giá tình trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* gây bệnh mù mắt trên ếch Thái Lan

- (*Rana tigerina*) nuôi tại một số tỉnh phía Bắc. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 21(3): 309-319.
- Davoodbasha M., Kim S.-C., Lee S.-Y. & Kim J.-W. (2016). The facile synthesis of chitosan-based silver nano-biocomposites via a solution plasma process and their potential antimicrobial efficacy. Archives of biochemistry and biophysics. 605: 49-58.
- Đỗ Hoàng Tùng (2023). Quy trình sản xuất dung dịch khử trùng trên cơ sở phức hợp nano bạc plasma và đồng chelat-chitosan, Công báo, Cục Sở hữu trí tuệ mã số VN 1-2023-01915. Cục Sở hữu trí tuệ.
- Elgendy M.Y., Shaalan M., Abdelsalam M., Eissa A.E., El-Adawy M.M., & Seida A.A. (2022). Antibacterial activity of silver nanoparticles against antibiotic-resistant *Aeromonas veronii* infections in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.): *in vitro* and *in vivo* assay. Aquaculture Research. 53(3): 901-920.
- Haenen O.L., Dong H.T., Hoai T.D., Crumlish M., Karunasagar I., Barkham, Swaine L. Chen, Ruth Zadoks, Andreas Kiermeier, Bing Wang, Esther Garrido Gamarro, Masami Takeuchi, Mohammad Noor Amal Azmai, Belén Fouz, Rolando Pakingking Jr., Zeng Wei Wei & Melba G. Bondad-Reantaso (2023). Bacterial diseases of tilapia, their zoonotic potential and risk of antimicrobial resistance. Reviews in Aquaculture. 15: 154-185.
- Haleem A., Javaid M., Singh R.P., Rab S. & Suman R. (2023). Applications of nanotechnology in medical field: a brief review. Global Health Journal. 7(2): 70-77.
- Kang S.J., MubarakAli D., Lee S.-Y. & Kim J.-W. (2023). Synthesis of pure alginate-nano silver biocomposites via solution plasma process and their potentials as antimicrobial agents. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 53: 102867.
- Khan M.S., Jabeen F., Qureshi N.A., Asghar M.S., Shakeel M. & Noureen A. (2015). Toxicity of silver nanoparticles in fish: a critical review. J Bio Environ Sci. 6(5): 211-227.
- Kim Văn Vạn & Trương Đình Hoài (2021). Tác nhân gây bệnh đỏ mắt ở cá trắm đen (*Mylopharyngodon piceus*) và kết quả điều trị. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y. (18) 6: 52-58.
- Ko Y.-B., Park Y.-H., MubarakAli D., Lee S.-Y. & Kim J.-W. (2023). Synthesis of antibacterial hydroxypropyl methylcellulose and silver nanoparticle biocomposites via solution plasma using silver electrodes. Carbohydrate Polymers. 302: 120341.
- Kondeti V., Gangal U., Yatom S. & Bruggeman P.J. (2017). Ag⁺ reduction and silver nanoparticle synthesis at the plasma-liquid interface by an RF driven atmospheric pressure plasma jet: Mechanisms and the effect of surfactant. Journal of Vacuum Science & Technology A. 35(6).
- Márquez J.C.M., Partida A.H., del Carmen M., Dosta M., Mejía J.C., & Martínez J.A.B. (2018). Silver nanoparticles applications (AgNPS) in aquaculture. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies. 6(2): 5-11.
- Mat Lazim Z., Salmiati S., Marpongahtun M., Arman N.Z., Mohd Haniffah M.R., Azman S., Yong E.L. & Salim M.R. (2023). Distribution of silver (Ag) and silver nanoparticles (AgNPs) in aquatic environment. Water. 15(7): 1349.
- OECD (2006). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- Rezvani E., Rafferty A., McGuinness C. & Kennedy J. (2019). Adverse effects of nanosilver on human health and the environment. Acta biomaterialia. 94: 145-159.
- Shuaib U., Hussain T., Ahmad R., Zakaullah M., Mubarik F.E., Muntaha S.T. & Ashraf, S. (2020). Plasma-liquid synthesis of silver nanoparticles and their antibacterial and antifungal applications. Materials Research Express. 7(3): 035015.
- Thuy N.T.T., Bao N.T.T. & Tung D.H. (2022). Green Plasma Electrochemical Synthesized Colloidal Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Activity. Journal of Nanomaterials.
- Trương Đình Hoài, Nguyễn Vũ Sơn, Nguyễn Thị Hoài, Nguyễn Thị Mai Phương & Nguyễn Thị Hậu (2014). Đặc điểm mô bệnh học của cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) nhiễm *Streptococcus* sp. nuôi tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam. Tạp chí Khoa học và Phát triển. 12(3): 360-371.
- Trương Đình Hoài, Trần Thị Diễm Quỳnh, Đặng Thị Hoá, Đỗ Đình Hùng, Võ Văn Việt, Nguyễn Đức Chính, Nguyễn Thị Hương Giang, Đoàn Thị Ninh, Ngô Phú Thoá & Kim Văn Vạn (2024). Đánh giá khả năng diệt khuẩn và hiệu quả điều trị của amoxicillin và amoxicillin kết hợp clavulanic acid với vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 22(1): 25-36
- Trương Đình Hoài, Xa Đức Bình, Mai Văn Thương, Nguyễn Văn Phúc, Nguyễn Hữu Vinh, Phạm Thị Lam Hồng & Đoàn Thị Ninh (2024b). Phân lập và đánh giá tình trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* gây bệnh trên cá rô đồng (*Anabas testudineus*). Tạp chí Khoa học Đại học Hạ Long. 12: 123-128
- Weerasinghe J., Li W., Zhou R., Zhou R., Gissibl A., Sonar P., Ostrikov K. (2020). Bactericidal silver nanoparticles by atmospheric pressure solution plasma processing. Nanomaterials. 10(5): 874.
- Wiegand I., Hilpert K. & Hancock R.E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature protocols. 3(2): 163-175.