

# THỬ NGHIỆM KẾT HỢP NANO BẠC VÀ FLORFENICOL TRONG ĐIỀU TRỊ BỆNH DO VI KHUẨN *Aeromonas veronii* TRÊN CÁ NHEO MỸ (*Ictalurus punctatus*)

Nguyễn Thị Dung, Lê Việt Dũng, Kim Văn Vạn, Trương Đình Hoài\*

Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

\*Tác giả liên hệ: tdhoai@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 17.12.2020

Ngày chấp nhận đăng: 01.03.2022

## TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm mục đích đánh giá khả năng kháng khuẩn khi sử dụng kết hợp florfenicol và nano bạc và điều trị bệnh nhiễm khuẩn do *Aeromonas veronii* gây ra trên cá nheo Mỹ ở quy mô phòng thí nghiệm. Tính nhạy của vi khuẩn *A. veronii* với nano bạc và kháng sinh florfenicol đánh giá ở điều kiện *in vitro* thông qua kiểm tra vòng vô khuẩn dựa trên sự khuếch tán của kháng sinh trên thạch. Thí nghiệm điều trị thực nghiệm *in vivo* trong phòng thí nghiệm được thực hiện bằng cách cảm nhiễm cá nheo Mỹ khỏe với liều nhiễm LD50 và cho cá ăn thức ăn có trộn thuốc với các tỉ lệ phối trộn khác nhau giữa florfenicol và nano bạc. Kết quả thí nghiệm *in vitro* cho thấy khi kết hợp kháng sinh florfenicol 10ppm và nano bạc 5ppm có tác dụng diệt khuẩn tốt tương đương như khi sử dụng kháng sinh florfenicol (15ppm). Sau 7 ngày điều trị cá cảm nhiễm bệnh cho thấy sự kết hợp kháng sinh florfenicol và nano bạc có tác dụng điều trị tốt tương đương so với chỉ sử dụng kháng sinh.

Từ khóa: Nano bạc, florfenicol, *A. veronii*, cá nheo Mỹ,

## Experimental Study on Combining Nanosilver and Florfenicol in the Treatment of *Aeromonas veronii* Disease on Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*)

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the antibacterial potential of florfenicol and nanosilver combination for the treatment of bacterial infection caused by *Aeromonas veronii* in channel catfish. The susceptibility of *A. veronii* to nanosilver and the antibiotic florfenicol was evaluated *in vitro* via measurement of inhibited zone based on the diffusion methods. The *in vivo* experimental treatment was performed by challenging healthy Channel catfish at LD50 and by feeding with the supplement with different formulations of florfenicol and nanosilver. The results of *in vitro* experiments showed that the combination of 10ppm florfenicol and 5ppm nanosilver resulted in the inhibited zone comparable to that of conventional use of antibiotic florfenicol (15ppm). After 7 days of treatment, the combination of florfenicol and nanosilver antibiotics had a similar therapeutic effect compared to those using antibiotics alone.

Keywords: Nano-silver, florfenicol, *A. veronii*, Channel catfish.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá nheo Mỹ là một loài bản địa của châu Mỹ, được di nhập vào Việt Nam từ năm 2010. Đây là một loài cá có giá trị dinh dưỡng cao, thịt thơm ngon, bổ dưỡng. Đặc biệt, loài này có thể chủ động trong sản xuất giống và nuôi thương phẩm dưới nhiều hình thức như nuôi ghép, nuôi lồng hay nuôi trong các hệ thống ao đất (Kim Văn Vạn, 2017). Cá có giá trị cao hơn so với các loài cá truyền thống khác nên được người nuôi

lựa chọn để tăng thu nhập và phát triển kinh tế. Sau nhiều năm, phong trào nuôi cá phát triển nhanh chóng, diện tích nuôi ngày càng được mở rộng, tuy nhiên mặt trái là dịch bệnh phát sinh nhiều và diễn biến phức tạp và gây thiệt hại đáng kể cho người nuôi (Trương Đình Hoài & cs., 2020). Từ năm 2017, cá nheo Mỹ nuôi tại các tỉnh miền Bắc thường xuyên xảy ra dịch bệnh gây chết hàng loạt, nhiều nơi tỉ lệ chết rất cao từ 40-60% với cá thương phẩm có khối lượng 1-2kg (Trương Đình Hoài & cs., 2019), thậm chí

với cá giống có thể lên đến 100% đối với cả hệ thống nuôi lồng và ao đất, gây thiệt hại kinh tế lớn cho người nuôi nó riêng và ngành hàng cá da trơn ở miền Bắc nói chung. Một trong những tác nhân gây bệnh chủ yếu được phát hiện là vi khuẩn *Aeromonas veronii* (Truong Dinh Hoai & cs., 2019).

Việc sử dụng các loại vacxin còn gặp nhiều khó khăn khi áp dụng với các hệ thống nuôi tại Việt Nam, do vậy cho đến nay kháng sinh vẫn được dùng phổ biến để điều trị các bệnh nhiễm khuẩn ở động vật thuỷ sản. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh thường xuyên gây ra nhiều hệ lụy như tồn dư kháng sinh trong sản phẩm thuỷ sản, môi trường và tình trạng kháng kháng sinh ngày càng phổ biến. Florfenicol là một trong những kháng sinh có tác dụng tốt nhất trong việc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn do *Aeromonas* spp. gây ra (Nhin & cs., 2021). Tuy nhiên, sản phẩm thuỷ sản lại là một trong những mặt hàng xuất khẩu quan trọng của nước ta, một trong những tiêu chí bắt buộc với sản phẩm là không tồn dư kháng sinh trong sản phẩm. Do vậy, cần tìm ra một lựa chọn thay thế hoặc kết hợp làm giảm liều lượng kháng sinh mà vẫn đảm bảo hiệu quả điều trị là một trong những quan tâm hàng đầu. Gần đây, công nghệ nano đang có bước phát triển mạnh mẽ với nhiều ứng dụng trong nuôi trồng thuỷ sản như nghiên cứu chẩn đoán bệnh, sản xuất vacxin, thức ăn... 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 thuỷ sản, chống lại sự phân huỷ của thuốc bởi enzyme trong đường ruột, giảm thiểu phân rã của thuốc trong môi trường nước, giảm hàm lượng kháng sinh nhưng vẫn đảm bảo hiệu quả khi sử dụng thuốc (Camacho-Jiménez & cs., 2020; Li & cs., 2005; Miller & cs., 2013). Áp dụng công nghệ nano trong nuôi trồng thuỷ sản ở Việt Nam hiện mới ở giai đoạn áp dụng thử nghiệm ở một số địa phương như thành phố Hồ Chí Minh, Bến Tre và chưa có nhiều báo cáo nghiên cứu về vấn đề này. Một số hiệu quả của vật liệu nano khi kết hợp với kháng sinh được thử nghiệm có thể kể đến như Ag - Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> - Doxycyclin - Alginate, Ag - TiO<sub>2</sub> - Doxycyclin - Alginate, tuy nhiên hệ

vật liệu này hiện được sử dụng trong nuôi tôm thẻ chân trắng, chưa được áp dụng cho các loài cá nuôi (Mạc Như Bình & cs., 2020).

Do vậy, việc tìm ra phương pháp điều trị mang lại hiệu quả tốt nhất và bền vững trong tương lai đặc biệt đối với các loài cá nuôi có giá trị kinh tế hiện nay là điều vô cùng cần thiết. Nghiên cứu này được thực hiện để thử nghiệm và đánh giá khả năng kết hợp nano bạc và florfenicol trong điều trị bệnh do vi khuẩn *A. veronii* trên cá nheo Mỹ ở quy mô phòng thí nghiệm để làm cơ sở ứng dụng vào thực tiễn điều trị bệnh ở đối tượng nuôi này.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Cá nheo Mỹ được chọn làm thí nghiệm có trọng lượng  $14,1 \pm 0,3$  g/con, màu sắc tươi sáng, phản ứng linh hoạt cá được nuôi thuần hoá trong 7 ngày. Trước khi gây cảm nhiễm, chọn ngẫu nhiên 10 cá và kiểm tra các tác nhân gây bệnh, đảm bảo cá khỏe mạnh trước khi đưa vào bố trí thí nghiệm.

Vi khuẩn *A. veronii* gốc được phân lập từ cá nheo Mỹ bị bệnh, được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Bộ môn Môi trường và Bệnh thuỷ sản, Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Chủng vi khuẩn đã được định danh và giám định bằng phương pháp PCR (Truong Dinh Hoai & cs., 2019).

Kháng sinh florfenicol nguyên liệu có nguồn gốc từ công ty VMC Việt Nam cung cấp và sử dụng tại Phòng thí nghiệm Bộ môn Môi trường và Bệnh thuỷ sản. Kháng sinh đã được định lượng và xác định hàm lượng bằng hệ thống HPLC trước khi sử dụng trong thí nghiệm.

- Nano bạc 10.000ppm có nguồn gốc từ công ty CO-ACTION CORP.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Tính nhạy của vi khuẩn *A. veronii* với kháng sinh florfenicol và nano bạc

Thí nghiệm gồm 5 công thức (CT), mỗi CT được bố trí lặp lại ba lần, liều lượng sử dụng như sau: CT1: florfenicol 15ppm, CT2: florfenicol

10ppm + nano bạc 5ppm, CT3: florfenicol 5ppm + nano bạc 10ppm, CT4: nano bạc 15ppm, CT5: đối chứng florfenicol 0ppm + nano bạc 0ppm. Tính nhạy của vi khuẩn *A. veronii* với nano bạc và kháng sinh florfenicol được xác định bằng phương pháp khuếch tán của kháng sinh trên thạch đĩa của Kirby-Bauer trên môi trường thạch TSA. Đường kính vòng vô khuẩn (mm) được xác định và mức độ nhạy, nhạy trung bình và kháng được xác định dựa vào chuẩn đường kính vòng vô khuẩn theo tiêu chuẩn của Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018).

### 2.2.2. Điều trị bệnh do vi khuẩn *A. veronii* trong phòng thí nghiệm

#### \* Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Hệ thống bể thí nghiệm (96l) được khử trùng bằng chlorine, rửa lại bằng nước sạch. Sau đó cho nước vào bể và lắp hệ thống sục khí liên tục vài ngày để loại hết chlorine, các chỉ tiêu môi trường nước được kiểm tra trước khi tiến hành thí nghiệm gồm nhiệt độ, pH, DO, NO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, sử dụng dụng cụ đo nhiệt độ và oxy chuyên dụng DO Meter (Nhật Bản) và các test sera (Đức).

#### \* Thí nghiệm cảm nhiễm xác định LD<sub>50</sub>

Cá nheo Mỹ được nuôi thuần hoá trong 7 ngày sau đó cá được bắt ngẫu nhiên vào 21 bể nuôi có thể tích 96l, mỗi bể thí nghiệm bố trí 10 con cá. Các yếu tố môi trường trong suốt quá trình thí nghiệm được kiểm soát với nhiệt độ dao động từ 25-28°C, pH 6,5-8,5. Cá được gây cảm nhiễm bằng cách tiêm vi khuẩn trong màng bụng (0,1ml vi khuẩn/cá với dãy nồng độ 10<sup>8</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup> CFU/ml), bể đối chứng được tiêm bằng nước muối sinh lý, ở mỗi nồng độ vi khuẩn được bố trí lặp lại 3 lần. Sau khi cảm nhiễm, biểu hiện của cá được theo dõi liên tục trong 14 ngày. Cá chết được thu ngay và tiến hành giải phẫu quan sát dấu hiệu bệnh và tái phân lập vi khuẩn từ thận. Mật độ vi khuẩn gây nhiễm 50% cá thí nghiệm (LD<sub>50</sub>) xác định được từ thí nghiệm thăm dò sẽ được sử dụng để gây cảm nhiễm cá bố trí ở thí nghiệm điều trị bệnh bằng florfenicol và nano bạc. Công thức tính liều LD<sub>50</sub>:

Liều gây chết 50% cá thí nghiệm (LD<sub>50</sub>, lethal dose) được xác định theo công thức của Reed and Muench (1938) như sau:  $LD_{50} = 10^{(a-x)}$

Trong đó:

a: Nồng độ tại đó số lượng cá sống và cá chết sau thí nghiệm là 50%.

$$x = (Pa - 50)/(Pa - Pu).$$

Pa, Pu là tỉ lệ cận trên và cận dưới của nồng độ gây chết 50%.

\* Thí nghiệm điều trị bằng các phác đồ phối trộn nano và kháng sinh

Cá được gây cảm nhiễm với liều LD<sub>50</sub> và theo dõi các biểu hiện bệnh lý lâm sàng. Khi cá bắt đầu có các biểu hiện bệnh, cá sẽ được tiến hành điều trị bằng các công thức thuốc CT1, CT2, CT3, CT4 và cho ăn liên tục trong 7 ngày. CT5 đối chứng: Cá được gây cảm nhiễm và được cho ăn thức ăn không trộn thuốc. Thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần.

Trong quá trình thí nghiệm pH và nhiệt độ được ghi nhận hàng ngày lúc 6 giờ và 14 giờ. Số lượng và tỉ lệ cá chết cũng được ghi nhận mỗi ngày. Tất cả cá còn sống sau thí nghiệm cũng được phân lập vi khuẩn xác nhận tình trạng nhiễm khuẩn. Thời gian thí nghiệm là 14 ngày. Hiệu quả điều trị bệnh trong phòng thí nghiệm được đánh giá bằng tỉ lệ sống ở các lô điều trị và lô đối chứng không điều trị.

### 2.2.3. Phương pháp giám định lại vi khuẩn gây cảm nhiễm bằng kỹ thuật PCR

Cá chết ở các lô thí nghiệm được giải phẫu, lấy mẫu cấy trên môi trường TSA đặc trưng và xem hình thái khuẩn lạc, nhuộm Gram, phân lập và giám định lại bằng phương pháp Duplex PCR.

Kỹ thuật Duplex PCR giám định và khẳng định cá chết ở các lô thí nghiệm là do chủng vi khuẩn *A. veronii* được thực hiện với hai cặp môi xác định đoạn gen 16S rRNA gen với kích thước 461bp của họ *Aeromonas* và cặp môi xác định đoạn gen *rpoB* với kích thước 224bp để xác định loài *A. veronii* theo mô tả của Persson & cs. (2015). Chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 95°C trong 4 phút, lặp lại 30 chu kỳ với 94°C trong 30 giây, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 2 phút, và kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel 1% agarose.

Thử nghiệm kết hợp nano bạc và florfenicol trong điều trị bệnh do vi khuẩn *Aeromonas veronii* trên cá nheo Mỹ (*Ictalurus punctatus*)

#### 2.2.4. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý trên SPSS 18, so sánh phương sai 1 nhân tố, kiểm định sai khác theo LSD với mức ý nghĩa  $P < 0,05$ .

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Tính nhạy của vi khuẩn *A. veronii* với kháng sinh florfenicol và nano bạc

Tác dụng diệt khuẩn của florfenicol và nano bạc đối với vi khuẩn *A. veronii* phân lập từ cá nheo Mỹ thông qua đánh giá đường kính vòng vô khuẩn được thể hiện ở bảng 1.

Kết quả bảng 1 cho thấy kháng sinh florfenicol có tác dụng diệt khuẩn rất tốt với *A. veronii*, đường kính vòng vô khuẩn lớn (33mm). Tuy kết quả so sánh sự sai khác về đường kính vòng vô khuẩn trung bình cho thấy đã có sự sai khác có ý nghĩa ( $P < 0,05$ ) khi so sánh giữa nghiệm thức, nhưng sự kết hợp kháng sinh với nano bạc đều có khả năng diệt khuẩn khá cao. Cụ thể, nếu vòng vô khuẩn đạt  $33 \pm 0,5$ mm khi sử dụng nồng độ 15ppm Florfenicol thì vòng vô khuẩn chỉ giảm xuống  $31,8 \pm 0,76$ mm khi dùng kết hợp 10ppm florfenicol + 5ppm nano bạc và  $25,3 \pm 0,57$ mm khi kết hợp 5ppm Florfenicol + 10ppm nano bạc. Điều này chứng tỏ khi kết hợp kháng sinh florfenicol 10ppm và nano bạc 5ppm có tác dụng diệt khuẩn tốt và đảm bảo kết quả về mức độ nhạy để điều trị như khi sử dụng kháng sinh

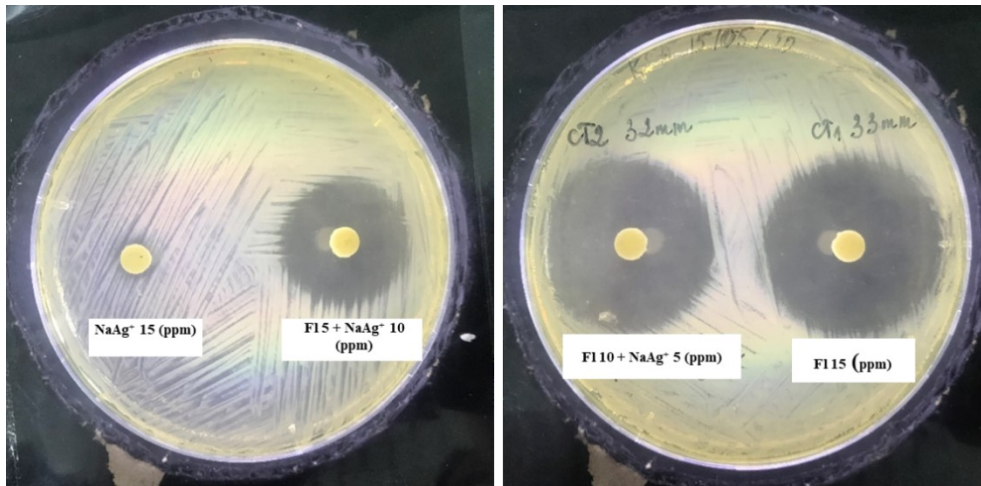
đơn thông thường ( $> 18$ mm). Khi chỉ sử dụng nano bạc, khả năng diệt khuẩn chỉ xuất hiện trong thời gian 4 giờ đầu (vòng vô khuẩn đạt 12mm), sau 24 giờ nano bạc mất tác dụng, không thấy xuất hiện vòng vô khuẩn (Hình 1). Điều này có thể được giải thích rằng do nano bạc hoạt động theo cơ chế ion hoá nên giai đoạn này vi khuẩn bị ức chế do tác dụng của các ion bạc được giải phóng từ hạt nano bạc. Tuy nhiên cấu trúc tế bào của vi khuẩn vẫn chưa bị phá huỷ do chưa đủ lượng, nên lúc hết ion bạc vi khuẩn lại phát triển bình thường.

Việc sử dụng kháng sinh để điều trị bệnh do vi khuẩn thường gây ra hiện tượng nhờn thuốc, kháng thuốc (Ninh & cs., 2021; Dang & cs., 2021). Bên cạnh đó, việc sử dụng kháng sinh dễ gây hại cho sức khoẻ của người tiêu dùng do việc tồn dư kháng sinh trong cơ thể động vật thuỷ sản. Vi khuẩn *A. veronii* là tác nhân gây bệnh phổ biến trên các loài cá nheo Mỹ và nhiều loài cá nước ngọt khác như cá rô phi, các loài cá da trơn, vi khuẩn này có thể gây chết 100% cá nheo Mỹ giai đoạn giống và đặc biệt là kháng với nhiều loại kháng sinh (Truong Dinh Hoai, 2019; Ran & cs., 2018; Rahman & cs., 2002; Dong & cs., 2017). Do vậy, kết quả chứng minh tính kháng khuẩn của nano bạc ở các nghiên cứu trước và việc phối trộn kháng sinh và nano bạc đã vạch ra hướng mới trong ứng dụng các loại vật liệu trong phòng điều trị bệnh nhiễm khuẩn do vi khuẩn gây ra.

**Bảng 1. Đường kính vòng vô khuẩn của kháng sinh florfenicol và nano bạc đối với vi khuẩn *A. veronii***

Công thức	Đường kính vòng vô khuẩn lớn nhất (mm)	Đường kính vòng vô khuẩn nhỏ nhất (mm)	Đường kính vòng vô khuẩn (TB $\pm$ SD (mm) n = 3)
			<i>Aeromonas veronii</i>
CT1	33,5	32,5	33,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,5
CT2	32,5	31,0	31,8 <sup>a</sup> $\pm$ 0,8
CT3	26,0	25,0	25,3 <sup>b</sup> $\pm$ 0,6
CT4	13,0	12,0	12,3 <sup>c</sup> $\pm$ 0,6
ĐC	-	-	-

Chú thích: CT1: Florfenicol 15ppm; CT2: Florfenicol 10ppm + nano bạc 5ppm; CT3: Florfenicol 5ppm + nano bạc 10ppm, CT4: Nano bạc 15ppm, CT5: Đối chứng Florfenicol 0ppm + Nano bạc 0ppm; M  $\pm$  SD: Trung bình mẫu  $\pm$  độ lệch chuẩn; các ký tự a, b thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm trong cùng một cột ( $P < 0,05$ ). (-) Không xuất hiện vòng vô khuẩn.



Hình 1. Kháng sinh đồ Florfenicol và Nano bạc

### 3.2. Kết quả thử nghiệm điều trị bệnh do vi khuẩn *A. veronii* quy mô phòng thí nghiệm

#### 3.2.1. Biến động các yếu tố môi trường

Trong quá trình thí nghiệm các thông số môi trường được kiểm soát trong các giới hạn cho phép của đối tượng thí nghiệm. Giá trị nhiệt độ trong thời gian thí nghiệm là 27,8-29,8°C. Biên độ pH dao động từ 6,7-7,8. Hệ thống nuôi luôn đảm bảo sục khí 24/24, sục khí ổn định đảm bảo cung cấp đủ oxy cho các bể nuôi. DO luôn dao động trong khoảng từ 6,1-6,8 mg/l. Phân và chất thải trong các bể thí nghiệm được làm sạch và siphon định kỳ do vậy hàm lượng  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3^-$  dao động trong khoảng 0-0,05 mg/l,  $\text{NO}_2$  dao động trong khoảng 0-0,25 mg/l. Như vậy, các yếu tố môi trường được kiểm tra luôn nằm trong ngưỡng thích hợp đối với cá Nheo Mỹ (Kim Văn Vạn, 2017).

#### 3.2.3. Kết quả xác định liều $\text{LD}_{50}$

Cá nheo Mỹ sau quá trình cảm nhiễm vi khuẩn *A. veronii* ở các độ pha loãng từ  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  CFU/ml và theo dõi trong 14 ngày cho kết quả diễn biến tỉ lệ chết cộng dồn thể hiện ở hình 2.

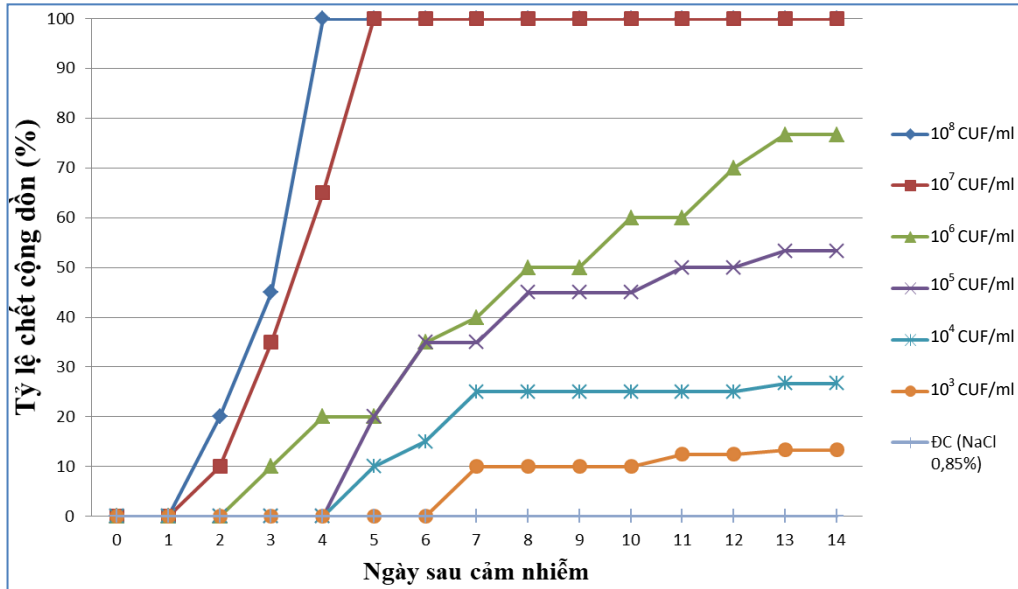
Kết quả hình 2 cho thấy không có cá chết ở nghiệm thức đối chứng tiêm nước muối sinh lý, cá ở trạng thái sinh lý bình thường trong suốt thời gian thí nghiệm (tỉ lệ sống của cá là 100%). Đối với các lô cảm nhiễm vi khuẩn, cá cảm

nhiễm và bắt đầu chết là 2 ngày ở nghiệm thức tiêm vi khuẩn với liều  $10^8$  CFU/ml và tỉ lệ cá chết tăng lên 100% sau 3 ngày. Ở nghiệm thức tiêm vi khuẩn với độ pha loãng  $10^7$  CFU/ml thì cá bắt đầu chết sau 2 ngày cảm nhiễm và đạt 100% sau 5 ngày. Các nghiệm thức tiêm vi khuẩn với độ pha loãng  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  và  $10^3$  CFU/ml có tỉ lệ chết cộng dồn lần lượt từ 76,67%; 53,33; 26,67 và 13,33% (Hình 2). Cá chết ở các nghiệm thức cảm nhiễm có dấu hiệu bệnh lý là mất nhớt, xuất huyết da, gốc vây, quanh miệng, hậu môn, các vây xơ rách, bụng chướng to và xuất huyết nội quan. Kết quả phân lập giám định lại đều khẳng định vi khuẩn *A. veronii* là tác nhân gây chết cá thí nghiệm. Từ kết quả thí nghiệm gây cảm nhiễm xác định được giá trị  $\text{LD}_{50}$  của chủng vi khuẩn *A. veronii* ở cá nheo Mỹ là  $0,74 \times 10^5$  CFU/ml hay  $0,74 \times 10^4$  CFU/cá.

### 3.3. Kết quả theo dõi tỉ lệ sống của cá nheo Mỹ sau khi điều trị

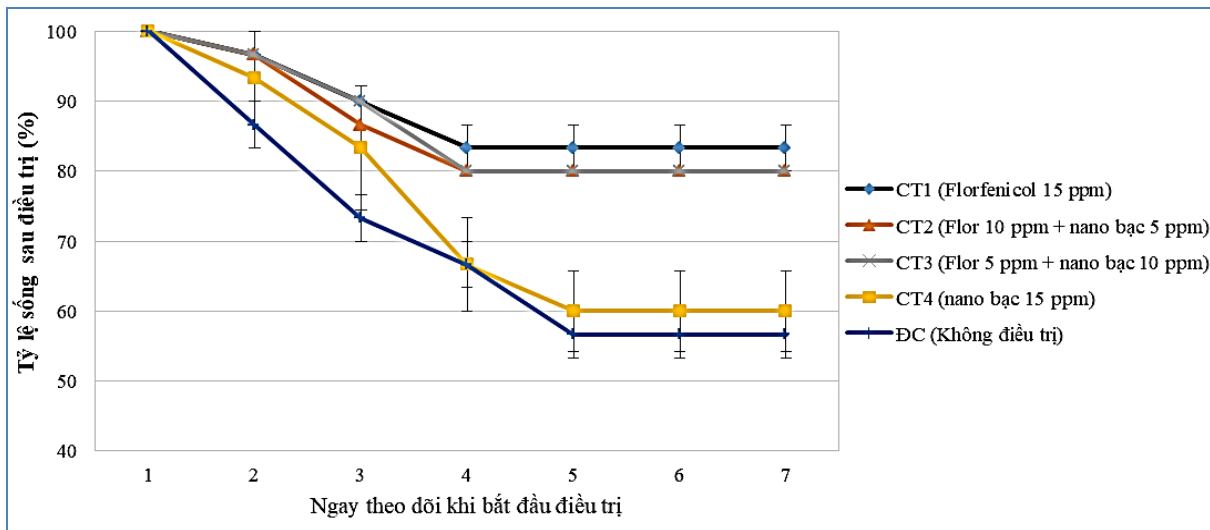
Tỉ lệ sống của cá sau quá trình điều trị thể hiện khả năng trị bệnh của thuốc với vi khuẩn. Sau khi gây nhiễm 3 ngày cá có các biểu hiện bệnh và quá trình điều trị được bắt đầu, 7 ngày theo dõi thí nghiệm điều trị cho cá được cảm nhiễm có thể thấy tỉ lệ sống của cá là khá cao ở các lô được điều trị so với lô đối chứng (gây nhiễm, không điều trị). Diễn biến quá trình điều trị và tỉ lệ sống chi tiết ở các lô thí nghiệm được thể hiện ở hình 3 và bảng 2.

Thử nghiệm kết hợp nano bạc và florfenicol trong điều trị bệnh do vi khuẩn *Aeromonas veronii* trên cá nheo Mỹ (*Ictalurus punctatus*)



Ghi chú: Tỷ lệ chết ở các ngày theo dõi là trung bình cộng của 3 lần lặp.

Hình 2. Tỷ lệ chết cộng dồn của cá nheo Mỹ khi cảm nhiễm với *A. veronii*

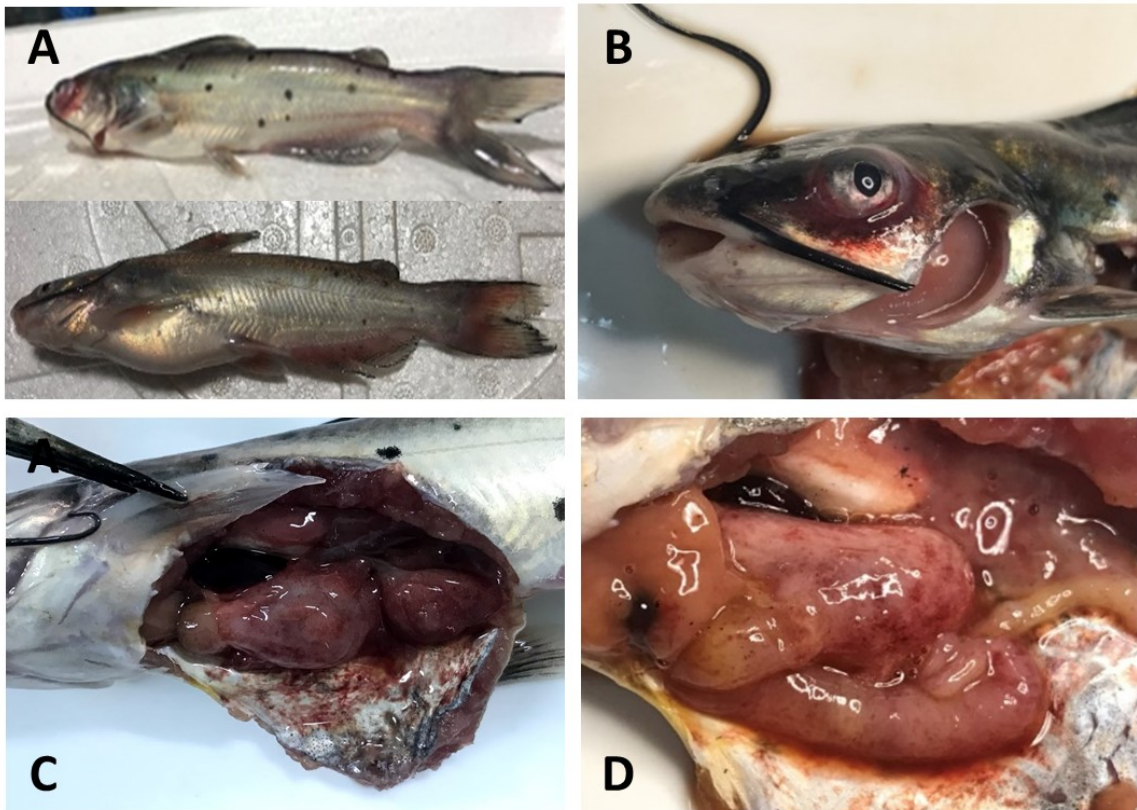


Hình 3. Tỷ lệ sống của cá nheo Mỹ ở các phác đồ điều trị

Bảng 2. Tỷ lệ sống của cá nheo Mỹ sau điều trị thử nghiệm

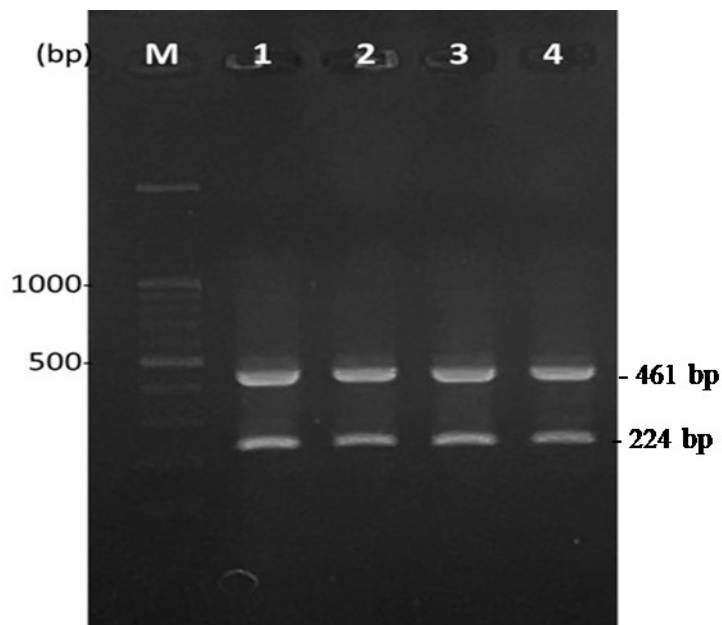
Nghiệm thức	Số cá thí nghiệm/bể (cá)	Số cá còn sống			Tỷ lệ sống (%) TB ± SD
		Bể 1	Bể 2	Bể 3	
CT1	10	8	8	9	83,3 <sup>a</sup> ± 5,7
CT2	10	8	8	8	80,0 <sup>a</sup> ± 0,0
CT3	10	8	8	8	80,0 <sup>a</sup> ± 0,0
CT4	10	6	5	7	60,0 <sup>b</sup> ± 10
ĐC	10	5	6	6	56,6 <sup>b</sup> ± 5,7

Ghi chú: M ± SD: Trung bình mẫu ± độ lệch chuẩn; các ký tự a, b thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm trong cùng một cột (P < 0,05).



Ghi chú: A, B: Xuất huyết mắt, gốc vây, hậu môn; C, D: Xuất huyết nội quan.

**Hình 4. Triệu chứng và bệnh tích ở cá nheo Mỹ chết do *A.veronii***



Ghi chú: M: Marker; Giếng 1-3 mẫu đại diện phân lập từ cá chết sau cảm nhiễm; Giếng 4: Mẫu đối chứng từ cá nheo Mỹ sử dụng cảm nhiễm.

**Hình 5. Kết quả giám định ngẫu nhiên các mẫu cá chết do vi khuẩn *A. veronii* bằng kỹ thuật Duplex PCR**

Từ kết quả bảng 2 cho thấy sau 7 ngày điều trị, nghiệm thức điều trị bằng CT1 (điều trị bằng florfenicol 15ppm) cho tỉ lệ sống 83,3%. Các lô phối hợp florfenicol và nano có tỉ lệ sống 80,0%. Tuy nhiên kết quả so sánh thống kê cho thấy nghiệm thức sử dụng florfenicol CT1 (florfenicol 15ppm) và phối trộn kháng sinh và nano bạc ở nghiệm thức CT2 và CT3 không có sự khác biệt thống kê ( $P > 0,05$ ). Trong khi đó lô CT4 (nano bạc 15ppm) và đối chứng (không điều trị) cho tỉ lệ sống lần lượt là 60,0% và 56,6% và thấp hơn so với các lô điều trị theo công thức CT1, CT2, CT3 ( $P < 0,05$ ). Cá chết ở các lô thí nghiệm có biểu hiện tương tự với cá chết ngoài tự nhiên (Hình 4) và tương đồng theo mô tả của Truong Dinh Hoai & cs. (2019). Kết quả phân lập và giám định lại bằng kỹ thuật PCR cho thấy cá chết đều do vi khuẩn *A. veronii* (Hình 5).

Gaunt & cs. (2003) thử nghiệm florfenicol điều trị nhiễm khuẩn do *E. ictaluri* trên cá nheo Mỹ khi sử dụng các liều 10, 20, 40 mg/kg trọng lượng, cho cá ăn trong 5 ngày liên tục kết quả thu được cá có tỉ lệ sống đạt được 100; 98,75; 98,75% ở các lô thí nghiệm. Tuy nhiên đến năm 2004 khi sử dụng florfenicol điều trị bệnh nhiễm khuẩn *E. ictaluri* trên cá nheo Mỹ khi sử dụng với liều 10 mg/kg trọng lượng sau 10 ngày điều trị, tỉ lệ sống đạt 86% như vậy nếu dùng florfenicol về lâu dài sẽ xảy ra hiện tượng kháng thuốc, tỉ lệ sống của cá giảm từ 100% xuống còn 86% (Gaunt & cs., 2004). Ngoài nghiên cứu chứng minh hiệu quả Các nghiên cứu về kết hợp kháng sinh và nano bạc đã được chứng minh có hiệu quả trong việc tiêu diệt vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm (Đặng Thị Lua & cs., 2017; Mạc Như Bình & cs., 2020). Tuy nhiên, cho tới nay các nghiên cứu chuyên sâu về cơ chế tương tác giữa kháng sinh và nano bạc chưa được công bố, chính vì thế cơ chế của quá trình cộng hợp này cần được tiếp tục nghiên cứu và làm sáng tỏ trong thời gian tới. Tuy nhiên với những kết quả bước đầu trong nghiên cứu này cho thấy được sự kết hợp kháng sinh và nano bạc có ý nghĩa trong việc giảm lượng kháng sinh sử dụng, tránh tồn dư kháng sinh trong sản phẩm thủy sản, giảm chi phí điều trị.

#### 4. KẾT LUẬN

Trong điều kiện *in vitro*, kết hợp phối trộn kháng sinh và nano bạc có tác dụng diệt khuẩn tốt, trong đó florfenicol 10ppm với nano bạc 5ppm có tác dụng diệt khuẩn tương đương như khi dùng kháng sinh đơn (15ppm).

Dựa vào kết quả điều trên mô hình *in vivo* trị tại phòng thí nghiệm đã chứng minh hiệu quả điều trị thực nghiệm, kết hợp florfenicol và nano bạc cho hiệu quả điều trị tốt bệnh *A. veronii* trên cá nheo Mỹ, giúp giảm thiểu lượng kháng sinh trong điều trị.

#### LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm Bộ môn Môi trường và Bệnh thủy sản, Công ty VMC Việt Nam đã hỗ trợ nguyên liệu thực hiện nghiên cứu, nhóm tác giả cũng xin chân thành cảm ơn Học viện Nông nghiệp Việt Nam hỗ trợ một phần kinh phí thông qua đề tài cấp Học viện Mã số T2020-02-9.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Camacho-Jiménez L., Álvarez-Sánchez A.R. & Mejía-Ruiz C.H. (2020). Silver nanoparticles (AgNPs) as antimicrobials in marine shrimp farming: A review. *Aquaculture Reports*. 18: 100512.
- Clinical L. & Standards I. (CLSI) (2014). *Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals, Approved Guideline VET- 03A*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, NJ. 26(03).
- CLSI (2018). *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals*. 3<sup>rd</sup> Edition. CLSI document M31-A3. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute.
- Đặng Thị Lua, Kim Văn Vạn & Hà Phương Thu (2017). Đánh giá khả năng diệt khuẩn *in vitro* của sản phẩm nano polymer- Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> - kháng sinh đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) trên tôm nuôi nước lợ. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 15(7): 953-961.
- Dang L.T., Nguyen L.H.T., Pham V.T. & Bui H.T. (2021). Usage and knowledge of antibiotics of fish farmers in small-scale freshwater aquaculture in the Red River Delta, Vietnam. *Aquaculture Research*. 52(8): 3580-3590.



- Dong H.T., Techatanakitarnan C., Jindakittikul P., Thaiprayoon A., Taengphu S., Charoensapsri W., Khunrae P., Rattanaojpong T. & Senapin S. *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of Fish Diseases*. 40(10): 1395-1403.
- Gaunt P.S., Endris R., Khoo L., Leard A.T., Jack S., Santucci T., Katz S., Radecki V. & Simmons R. (2003). Preliminary assessment of the tolerance and efficacy of florfenicol against *Edwardsiella ictaluri* administered in feed to channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*. 15(3): 239-247.
- Gaunt P.S., Endris R.G., Khoo L., Howard R., McGinnis A.L., Santucci T.D. & Katz T. (2004). Determination of dose rate of florfenicol in feed for control of mortality in channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) infected with *Edwardsiella ictaluri*, etiological agent of enteric septicemia. *Journal of the World Aquaculture Society*. 35(2): 257-267.
- Hoai T.D., Trang T.T., Van Tuyen N., Giang N.T.H. & Van V.K. (2019). *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in channel catfish in Vietnam. *Aquaculture*. 513: 734425.
- Kim Văn Vạn (2017). Xây dựng mô hình nuôi cá nheo Mỹ (*Ictalurus punctatus*) trong ao nuôi tại Hưng Yên. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 15(6): 738-745.
- Li H., Li D., Chen F., Yang C., Li X., Zhang Y., Hua C., Ma X., Zhao X., Shao D. & Wang Y. (2021). Nanosilver-Decorated Biodegradable Mesoporous Organosilica Nanoparticles for GSH-Responsive Gentamicin Release and Synergistic Treatment of Antibiotic-Resistant Bacteria. *International Journal of Nanomedicine*. 16: 4631.
- Mạc Như Bình, Lê Thị Kim Anh, Trần Nguyên Thảo, Nguyễn Hữu Thịnh, Nguyễn Thị Thanh Thủy, Hoàng Thị Yến Nhi, Hà Phương Thư & Đặng Đình Kim (2019). 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 tụy cấp (AHPNS) trên tôm chân trắng *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931). *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. 128(3c) : 77-85.
- Miller J.H., Novak J.T., Knocke W.R., Young K., Hong Y., Vikesland P.J., Hull M.S. & Pruden A. (2013). Effect of silver nanoparticles and antibiotics on antibiotic resistance genes in anaerobic digestion. *Water environment research*. 85(5) : 411-421.
- Nhinh D.T., Le D.V., Van K.V., Huong Giang N.T., Dang L.T. & Hoai T.D. (2021). Prevalence, Virulence Gene Distribution and Alarming the Multidrug Resistance of *Aeromonas hydrophila* Associated with Disease Outbreaks in Freshwater Aquaculture. *Antibiotics*. 10(5): 532.
- Persson S., Al-Shuweli S., Yapici S., Jensen J.N. & Olsen K.E. (2015). Identification of clinical aeromonas species by rpoB and gyrB sequencing and development of a multiplex PCR method for detection of *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, and *A. media*. *Journal of clinical microbiology*. 53(2): 653-656.
- Rahman M., Colque-Navarro P., Kühn I., Huys G., Swings J. & Möllby R. (2002). Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* biovar sobria associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh. *Applied and environmental microbiology*. 68(2): 650-655.
- Ran C., Qin C., Xie M., Zhang J., Li J., Xie Y., Wang Y., Li S., Liu L., Fu X. & Lin Q. (2018). *Aeromonas veronii* and aerolysin are important for the pathogenesis of motile aeromonad septicemia in cyprinid fish. *Environmental microbiology*. 20(9): 3442-3456.
- Trương Đình Hoài, Kim Văn Vạn, Đào Lê Anh, Nguyễn Thị Huyền, Nguyễn Văn Tuyền, Vũ Đức Mạnh, Nguyễn Thị Hương Giang, Trương Quang Lâm & Nguyễn Thị Lan (2020). Đặc điểm bệnh lý và ứng dụng phương pháp PCR chẩn đoán bệnh gan thận mù trên cá nheo Mỹ (*Ictalurus punctatus*). *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 18(2): 94-104.
- Dang L.T., Nguyen L.H.T., Pham V.T. & Bui H.T. (2021). Usage and knowledge of antibiotics of fish farmers in small-scale freshwater aquaculture in the Red River Delta, Vietnam. *Aquaculture Research*. 52(8): 3580-3590.