



**Hello World**

<http://huaf.edu.vn/>



## TỔNG HỢP HỆ VẬT LIỆU NANO TỔ HỢP MANG KHÁNG SINH (Ag-TiO<sub>2</sub>-DOXYCYCLINE-ALGINATE) VÀ ĐÁNH GIÁ HIỆU LỰC DIỆT KHUẨN *VIBRIO ALGINOLYTICUS* GÂY BỆNH TRÊN TÔM

Mạc Như Bình<sup>1</sup>, Hà Phương Thu<sup>2</sup>, Trần Nguyên Thảo<sup>1</sup>, Lê Thị Kim Anh<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thị Thanh Thủy<sup>1</sup>, Đặng Đình Kim<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế,

<sup>2</sup>Viện Khoa học Vật liệu, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,

<sup>3</sup>Viện Công nghệ Môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Liên hệ email: [macnhubinh@huaf.edu.vn](mailto:macnhubinh@huaf.edu.vn)

### TÓM TẮT

Các hệ nano phân phối thuốc được xem là hướng tiếp cận đầy tiềm năng đem lại hiệu quả cao trong điều trị nhiều loại bệnh nhờ khả năng phân phối thuốc tốt và tính hướng đích cao. Trong nghiên cứu này, hệ vật liệu nano tổ hợp mang kháng sinh (Ag-TiO<sub>2</sub>-Doxycycline-Alginate) đã được tổng hợp qua nhiều bước. Các đặc trưng của hệ nano đã được xác định bằng kính hiển vi điện tử quét phát xạ trường (FE-SEM), phương pháp nhiễu xạ tia X, phổ hồng ngoại IR và phương pháp tán xạ ánh sáng động DLS. Hệ nano có khả năng kháng tốt đối với vi khuẩn *Vibrio alginolyticus* gây bệnh trên tôm. Nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ tiêu diệt tối thiểu của hệ nano đối với vi khuẩn *V. alginolyticus* được xác định lần lượt là 40 ppm và 55 ppm.

**Từ khóa:** Ag-TiO<sub>2</sub>, Doxycycline, kháng kháng sinh, vật liệu nano, *Vibrio alginolyticus*.

Nhận bài: 02/06/2017

Hoàn thành phản biện: 13/06/2017

Chấp nhận đăng: 30/07/2017

### 1. MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, nghề nuôi tôm chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) đang phải đối mặt với nhiều thách thức lớn trong đó dịch bệnh do nhiều vi khuẩn *Vibrio* spp. thường xuyên dẫn đến sụt giảm sản lượng và chất lượng sản phẩm. Thuộc nhóm vi khuẩn này, *Vibrio alginolyticus* đã được chứng minh có liên quan tới các bệnh nguy hiểm trên tôm như hội chứng hoại tử gan tụy (Nguyễn Thị Thùy Giang và cs., 2016) và bệnh phân trắng (Somboon và cs., 2012). Để chữa trị các bệnh nhiễm khuẩn trên tôm, thuốc kháng sinh thường được sử dụng, nhưng hiện nay phương pháp này không còn được ưa chuộng. Nguyên nhân chính là do tình trạng kháng thuốc kháng sinh ở vi khuẩn ngày càng tăng và tồn dư kháng sinh trong sản phẩm thủy sản đem lại lo ngại cho cả người nuôi tôm lẫn người tiêu dùng (Holmström và cs., 2003). Đứng trước tình hình đó cần có các phương pháp nghiên cứu và chữa trị mới. Một trong những xu hướng được đánh giá cao hiện nay là ứng dụng công nghệ nano. Đặc biệt, hệ nano vận chuyển thuốc giúp tăng tính hướng đích và tăng hiệu quả tác động của thuốc lên tác nhân gây bệnh (Huh và Kwon, 2011).

Nano TiO<sub>2</sub> được biết đến với khả năng diệt khuẩn phổ rộng do tính chất xúc tác quang mạnh và các tính chất ưu việt khác như bền hóa học và không gây độc. Tuy nhiên, hạn chế của vật liệu này như đòi hỏi chiếu xạ UV và sự tái kết hợp nhanh chóng của các cặp điện tử và lỗ trống dẫn đến việc phải sử dụng kết hợp với các kim loại như Au, Pd và Ag. Nano tổ

hợp  $\text{TiO}_2\text{-Ag}$  đã được chứng minh là có tính kháng khuẩn cao ngay cả trong điều kiện không chiếu xạ UV (Amin và cs., 2009). Bản thân nano Ag cũng được chứng minh có tính kháng khuẩn mạnh, có khả năng hạn chế và tiêu diệt sự phát triển của vi khuẩn, nấm mốc và thậm chí cả vi rút, tuy nhiên, Ag khó thu hồi sau khi sử dụng vì một mặt gây lãng phí, mặt khác gây ô nhiễm, ảnh hưởng đến môi trường sinh thái (Dung và cs., 2009). Chính vì vậy sử dụng nano tổ hợp  $\text{TiO}_2\text{-Ag}$  vừa làm giảm các mặt hạn chế của mỗi loại vật liệu đồng thời vẫn tăng cường hoạt tính diệt khuẩn của chúng. Kháng sinh Doxycycline là kháng sinh phổ rộng thuộc nhóm Tetracycline, tác động lên cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương. Tính kháng khuẩn của Doxycycline được thực hiện nhờ tác động lên ribosom và màng bào tương của vi khuẩn (Dược điển Việt Nam, 2002). Tất cả các thành phần nói trên được bọc trong polymer Alginate – một tác nhân làm bền hệ phân tán nano, giúp kiểm soát quá trình phóng thích thuốc từ hệ chất mang.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung chế tạo hệ vật liệu nano tổ hợp Ag- $\text{TiO}_2$  mang kháng sinh Doxycycline và bước đầu khảo sát khả năng diệt khuẩn *Vibrio alginolyticus* gây bệnh trên tôm thẻ chân trắng, từ đó đánh giá triển vọng ứng dụng phương pháp này trong phòng và trị bệnh vi khuẩn trên tôm trong thực tế.

## 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

- Hệ vật liệu nano tổ hợp Ag- $\text{TiO}_2$  mang kháng sinh Doxycycline (viết tắt là Ag- $\text{TiO}_2$ -Dox-Alg) được tổng hợp tại Viện Khoa học Vật liệu, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Vi khuẩn *Vibrio alginolyticus* chủng X7 phân lập từ Tôm chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) bị bệnh phân trắng tại Khoa Thủy sản, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

### 2.2. Nội dung nghiên cứu

- Tổng hợp và khảo sát các đặc trưng của hệ nano Ag- $\text{TiO}_2$ -Dox-Alg.
- Đánh giá hiệu lực diệt khuẩn *Vibrio alginolyticus* của hệ nano Ag- $\text{TiO}_2$ -Dox-Alg.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Tổng hợp hệ vật liệu nano tổ hợp mang kháng sinh (Ag- $\text{TiO}_2$ -Dox-Alg)

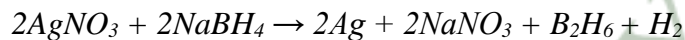
##### 2.3.1.1. Hóa chất

- $\text{TiO}_2$  thương phẩm (tên thương mại là P25-Degusa) (Merck).
- Bạc nitrat:  $\text{AgNO}_3$  (Sigma).
- Natri bohidrua:  $\text{NaBH}_4$  (Nhật Bản).
- Alginate (M= 3000) (Sigma).
- Amoni hydroxit độ tinh khiết 28%:  $\text{NH}_4\text{OH}$  28%, (Trung Quốc).
- N-Hydroxysuccinimide: NHS (Sigma).
- N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride: EDC (Sigma).
- Ethylene diamine: EDA (Sigma).
- Doxycycline (Merk).

### 2.3.1.2. Phương pháp chế tạo

#### - Tổng hợp hạt nano Ag trên nền Alginate:

Hạt nano bạc được hình thành trên nền Alginate (ký hiệu Alg/Ag) dựa trên phản ứng:



Các bước thực hiện: Hòa tan 100 mg Alginate trong 20 mL nước cất, khuấy trong 2 giờ, không gia nhiệt. Nhỏ từ từ dung dịch 0,01M  $\text{AgNO}_3$  vào dung dịch Alginate dưới điều kiện khuấy trộn mạnh để  $\text{AgNO}_3$  phân tán đồng nhất vào dung dịch Alginate trong 45 phút, được dung dịch A ( $\text{AgNO}_3/\text{Alg}$ ). Cân 0,15 g  $\text{NaBH}_4$  (đảm bảo  $\text{NaBH}_4$  dư), hòa tan hoàn toàn trong 20 mL nước, nhanh chóng nhỏ giọt vào dung dịch A trong điều kiện khuấy mạnh và không gia nhiệt.

#### - Tổng hợp hạt nano Titan dioxide trên nền Alginate:

Hòa tan bột nano  $\text{TiO}_2$  P25 kích thước 25 nm vào 100 mL nước cất. Khuấy từ không gia nhiệt trong vòng 2 tiếng thu được dung dịch huyền phù. Alginate mạch dài được hòa vào nước cất, khuấy từ không gia nhiệt 45 phút để thu được dung dịch đồng nhất, trong suốt. Phân tán hạt nano  $\text{TiO}_2$  trên nền Alginate để tạo hạt nano Alg/ $\text{TiO}_2$  bằng cách nhỏ từ từ một lượng xác định dung dịch  $\text{TiO}_2$  vào dung dịch Alginate, khuấy từ không gia nhiệt 12 tiếng.

#### - Tổng hợp hệ vật liệu nano tổ hợp Ag - $\text{TiO}_2$ trên nền Alginate:

Vật liệu nano tổ hợp Ag -  $\text{TiO}_2$  trên nền Alginate (Alg/AgNPs- $\text{TiO}_2$ ) được tổng hợp bằng phương pháp phân tán ex situ, phối trộn các thành phần Alg/Ag và Alg/ $\text{TiO}_2$ . Cụ thể, trộn 7,5 mL dung dịch Alg/ $\text{TiO}_2$  nồng độ 1500 ppm vào 10 mL dung dịch Alg/Ag nồng độ 200 ppm, khuấy mạnh trong 1 giờ tại nhiệt độ phòng.

#### - Phương pháp hoạt hóa dung dịch Alginate:

Hòa tan 200 mg Alginate mạch dài trong 40 mL nước cất, khuấy từ không gia nhiệt trong vòng 1 giờ thu được dung dịch nhớt đồng nhất. Khuấy dung dịch Alginate với 60 mg EDC trong nước trong vòng 20 phút. Tiếp tục nhỏ giọt dung dịch NHS (40 mg NHS trong nước) vào hỗn hợp nói trên thu được Alginate hoạt hóa, tiến hành khuấy từ không gia nhiệt trong 1 giờ.

#### - Phương pháp mang kháng sinh Doxycycline lên hệ vật liệu nano tổ hợp Alg/AgNPs- $\text{TiO}_2$ :

Hòa tan 250 mg kháng sinh Doxycycline trong 10 mL nước cất, khuấy từ không gia nhiệt. Nhỏ từ từ dung dịch này vào 50 mL dung dịch Alginate hoạt hóa, sau đó tiếp tục nhỏ giọt 250  $\mu\text{L}$  EDA, khuấy không gia nhiệt trong 1 giờ ta thu được dung dịch Dox-Alg (dung dịch B). Phối trộn dung dịch B vào dung dịch Alg/AgNPs- $\text{TiO}_2$ . Tiếp tục khuấy cho đến thể tích không đổi  $V = 50$  mL, trong điều kiện không gia nhiệt. Sản phẩm được tiến hành đo quang phổ hấp thụ UV-vis để xác định khả năng mang kháng sinh.

### 2.3.2. Các phương pháp nghiên cứu đặc trưng của hệ vật liệu nano

- Phương pháp kính hiển vi điện tử quét phát xạ trường FE-SEM (TB Hitachi S-4800) dùng cho đánh giá hình thái và kích thước hạt.

- Phương pháp nhiễu xạ tia X (Thiết bị Siemens D-500) dùng để xác định đặc trưng cấu trúc tinh thể.

- Phương pháp hồng ngoại xa FTIR (Quang phổ FTIR, SHIMADZU) bằng hạt KBr trong vùng sóng số  $400 - 4.000 \text{ cm}^{-1}$  đặc trưng liên kết hóa học vô cơ – hữu cơ.
- Phương pháp phổ Zeta, phương pháp tán xạ ánh sáng động DLS (máy đo nano Zetasizer, Malvern UK) dùng để xác định sự phân bố kích thước và thế năng Zeta.

### 2.3.3. Đánh giá hiệu lực diệt khuẩn *V. alginolyticus* của hệ vật liệu nano tổ hợp mang kháng sinh

#### 2.3.3.1. Phương pháp khuếch tán đĩa thạch (Agar diffusion test) xác định độ nhạy của vi khuẩn

Lấy 200  $\mu\text{L}$  dung dịch vi khuẩn *V. alginolyticus* có nồng độ  $10^6 \text{ CFU/mL}$  dàn đều trên mặt thạch CHROMagar<sup>TM</sup>. Các khoanh giấy thấm ( $\phi 7,8 \text{ mm}$ ) được ngâm bão hòa trong dung dịch nano Ag-TiO<sub>2</sub>-Dox-Alg ở các nồng độ khác nhau hoặc trong dung dịch nano Doxycycline 30 ppm sau đó được đặt lên đĩa thạch đã có vi khuẩn, nuôi ở 37°C. Sau 24 giờ, xác định đường kính vòng kháng khuẩn (ĐKVKK) bằng thước kẹp. ĐKVKK thực tế là ĐKVKK đo được trừ đi 7,8 mm. Nghiệm thức đối chứng thay nano bằng nước cất. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

#### 2.3.3.2. Phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ tiêu diệt tối thiểu của hệ nano

Nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ tiêu diệt tối thiểu được xác định dựa theo phương pháp của Petrus và cs. (2011) có cải biến. Tiến hành nuôi vi khuẩn trong môi trường pepton kiềm lỏng (APW) ở 37°C cho đến khi  $\text{OD}_{600} = 0,8$  tương đương  $6 \times 10^8$  tế bào/mL (Schauer và cs., 2012). Chuẩn bị các ống nghiệm vô trùng chứa 8,8 mL APW, bổ sung 1 mL nano Ag-TiO<sub>2</sub>-Dox-Alg có nồng độ khác nhau, sau đó thêm 0,2 mL dung dịch vi khuẩn ở trên vào. Nghiệm thức đối chứng có bổ sung vi khuẩn nhưng không bổ sung nano mà bổ sung 1 mL APW. Nuôi các ống nghiệm ở 37°C, lắc 200 vòng/phút, quan sát ở 18 giờ, 24 giờ và 36 giờ.

Tại mỗi thời điểm trên, lấy dịch trong ống nghiệm pha loãng thành các nồng độ  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  và  $10^{-8}$  bằng nước muối sinh lý, lấy 100  $\mu\text{L}$  cấy trải trên đĩa petri chứa môi trường thạch pepton kiềm, nuôi ở 37°C, 24 giờ, sau đó đếm số khuẩn lạc. Mật độ vi khuẩn trong ống nghiệm ( $\text{CFU/mL}$ ) = số khuẩn lạc x hệ số pha loãng/0,1). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum inhibition concentration - MIC) được định nghĩa là nồng độ thấp nhất của dung dịch nano tại đó sự phát triển của vi khuẩn không phát hiện được bằng mắt thường (môi trường không bị đục). Nồng độ tiêu diệt tối thiểu (Minimum bactericidal concentration - MBC) là nồng độ thấp nhất của hệ nano tại đó vi khuẩn bị tiêu diệt > 99,9%.

#### 2.3.3.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu nghiên cứu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh vật học trên phần mềm Microsoft Excel 2010 và SPSS 22.0.

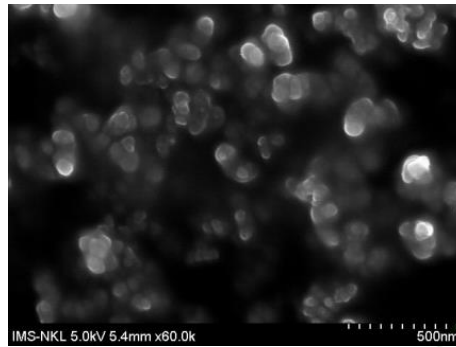
## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả đặc trưng của vật liệu nano Ag-TiO<sub>2</sub>-Dox-Alg

#### 3.1.1. Đặc trưng hình thái học của Ag-TiO<sub>2</sub>-Dox-Alg

Thông qua hình ảnh chụp FE-SEM của Ag-TiO<sub>2</sub>-Dox-Alg (Hình 1) ta thấy các hạt có xu hướng kết dính lại với nhau do polymer Alginate có tính chất tạo dung dịch độ nhớt cao. Sự phân bố của các hạt trong polymer là đồng đều. Kích thước các hạt đều trong khoảng từ 70 - 80 nm, bề mặt các hạt trơn nhẵn.





**Hình 1.** Ảnh FE-SEM của hệ nano Ag- TiO<sub>2</sub>-Dox-Alg.

### 3.1.2. Kết quả nhiễu xạ tia X

Đặc trưng cấu trúc tinh thể của các mẫu Alg/Ag và Alg/TiO<sub>2</sub> được xác định bằng phương pháp nhiễu xạ tia X (XRD) (hình 2 và 3). Qua kết quả này có thể nhận thấy:

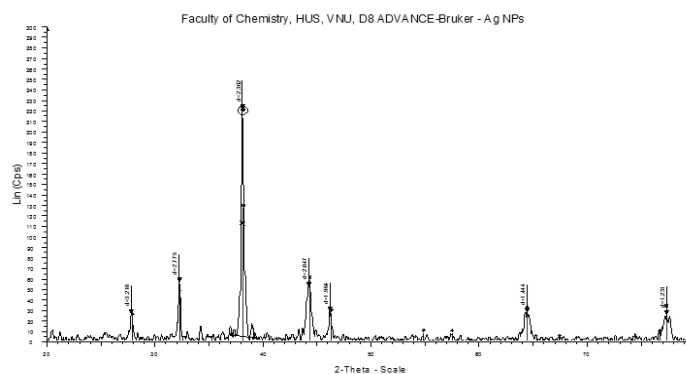
+ Các pic trên phổ XRD rất rõ nét, các đám phổ chính có cường độ cao, đường nền của các mẫu khá bằng phẳng, không lẫn pha lạ chứng tỏ vật liệu tổng hợp được có chất lượng tốt.

+ Áp dụng công thức Scherrer ta tính được kích thước trung bình của các hạt nano Alg/Ag và Alg/TiO<sub>2</sub> tương ứng là khoảng 34 nm và 30 nm.

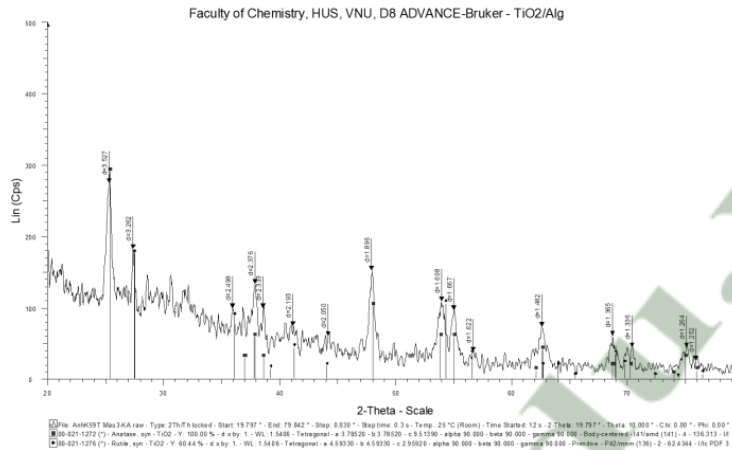
+ Từ giản đồ nhiễu xạ tia X của TiO<sub>2</sub>/Alg ta có thể tính được thành phần của các pha anatase và rutile trong mẫu Alg/TiO<sub>2</sub> theo các phương trình:

$$\text{Hàm lượng rutile (\%)} \quad \chi = \frac{1}{1 + 0.8 \frac{I_A}{I_R}} \quad ; \quad \text{Hàm lượng anatase (\%)} \quad X = \frac{1}{1 + 1,26 \cdot \frac{I_R}{I_A}}$$

Trong đó: I<sub>A</sub> là cường độ nhiễu xạ của anatase ứng với mặt phản xạ (101), I<sub>R</sub> là cường độ nhiễu xạ của rutile ứng với mặt phản xạ (110). Dựa vào các công thức trên, ta xác định được hàm lượng anatase và rutile tương ứng là 57% và 43%.



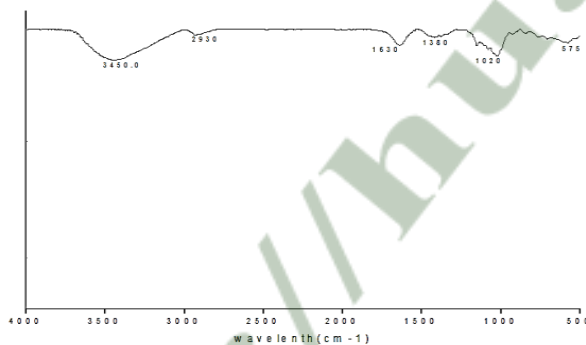
**Hình 2.** Phổ XRD của mẫu nano Alg/Ag.



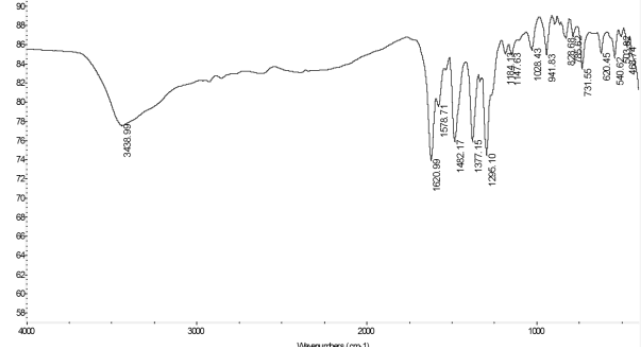
**Hình 3.** Phổ nhiễu xạ tia X của các hạt nano Alg/TiO<sub>2</sub>.

### 3.1.3. Phổ IR của hệ vật liệu

Dựa vào Hình 4 ta thấy trên phổ IR của Alginate, dải hấp thụ ở tần số 3.432,41 cm<sup>-1</sup>, 1.104,61 cm<sup>-1</sup>, 1.644 cm<sup>-1</sup> được gán lần lượt cho dao động O-H, C-O-C, C=O. Trên phổ IR của mẫu Dox-Alg (Hình 5) cho thấy các pic đặc trưng cho các dao động của liên kết O-H, C-O-C, C=O lần lượt dịch chuyển về vùng tần số 3.438,99 cm<sup>-1</sup>; 1.105,43 cm<sup>-1</sup>; 1.638,78 cm<sup>-1</sup>. Điều đó chứng tỏ có sự tương tác giữa kháng sinh và Alginate.



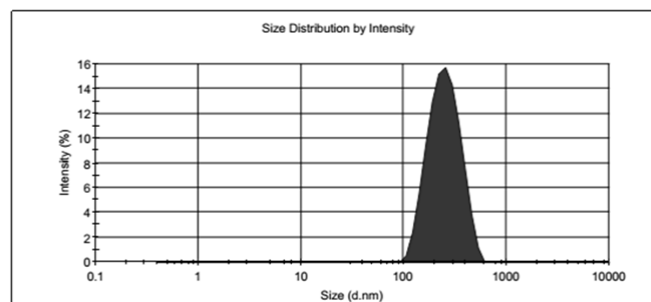
**Hình 4.** Phổ IR của Alginate.



**Hình 5.** Phổ IR của hệ Dox-Alg.

### 3.1.4. Phổ DLS của hệ vật liệu

| Size (d.nm):            |               | % Intensity | Width (d.nm): |
|-------------------------|---------------|-------------|---------------|
| Z-Average (d.nm): 222.0 | Peak 1: 259.8 | 100.0       | 88.45         |
| Pdi: 0.144              | Peak 2: 0.000 | 0.0         | 0.000         |
| Intercept: 0.944        | Peak 3: 0.000 | 0.0         | 0.000         |
| Result quality: Good    |               |             |               |



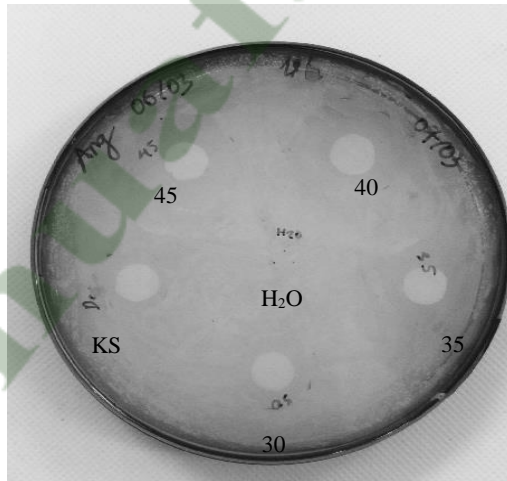
**Hình 6.** Phổ DLS của hệ Ag-TiO<sub>2</sub>-Dox-Alg.

Kết quả phổ DLS (Hình 6) cho thấy với kích thước thủy động khoảng 222 - 260 nm (lớn hơn nhiều so với kích thước đo trên SEM), hệ Ag-TiO<sub>2</sub>-Dox-Alg cho thấy tính ưa nước của lớp vỏ polymer, tạo cho hệ khả năng tương thích sinh học tốt. Chỉ số đa phân tán PDI khá nhỏ chứng tỏ hệ có tính đồng nhất cao, do đó có thể duy trì trạng thái phân tán trong thời gian dài.

### 3.2. Kết quả nghiên cứu khả năng diệt khuẩn *V. alginolyticus* của hệ nano Ag-TiO<sub>2</sub>-Dox-Alg

#### 3.2.1. Kết quả khảo sát độ nhạy của *V. alginolyticus* đối với hệ nano Ag-TiO<sub>2</sub>-Dox-Alg

Kết quả đường kính vòng kháng khuẩn được thể hiện ở Hình 7 và Bảng 1 cho thấy hệ nano Ag-TiO<sub>2</sub>-Dox-Alg có khả năng kháng tốt với *V. alginolyticus* chủng X7. Tính kháng có xu hướng tăng lên khi nồng độ nano tăng và tốt nhất ở 45 ppm. Kháng sinh nano Doxycycline 30 ppm có đường kính kháng khuẩn không sai khác về mặt thống kê với đường kính kháng khuẩn của hệ nano Ag-TiO<sub>2</sub>-Dox-Alg ở nồng độ 30 ppm. Tuy nhiên, điều này có thể do trong quá trình chế tạo vật liệu nano, một lượng nhỏ kháng sinh đã bị mất hoạt tính nên tính kháng cộng hợp của nano Ag-TiO<sub>2</sub> với kháng sinh đã bị giảm đi.



**Hình 7.** Độ nhạy của vi khuẩn *V. alginolyticus* đối với hệ nano Ag-TiO<sub>2</sub>-Dox-Alg ở các nồng độ 30 ppm, 35 ppm, 40 ppm và 45 ppm. KS: đối chứng Doxycycline 30 ppm. H<sub>2</sub>O: đối chứng nước cất vô trùng.

**Bảng 1.** Kết quả đường kính vòng kháng khuẩn

| Nghiệm thức                             | 30 ppm       | 35 ppm       | 40 ppm       | 45 ppm       | KS           |
|-----------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) (M±SD) | 11,2 ± 0,40a | 16,1 ± 0,23b | 18,2 ± 0,38c | 19,7 ± 0,35c | 10,8 ± 0,31a |

M±SD: trung bình mẫu; ± độ lệch chuẩn; Các kí tự a, b, c thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

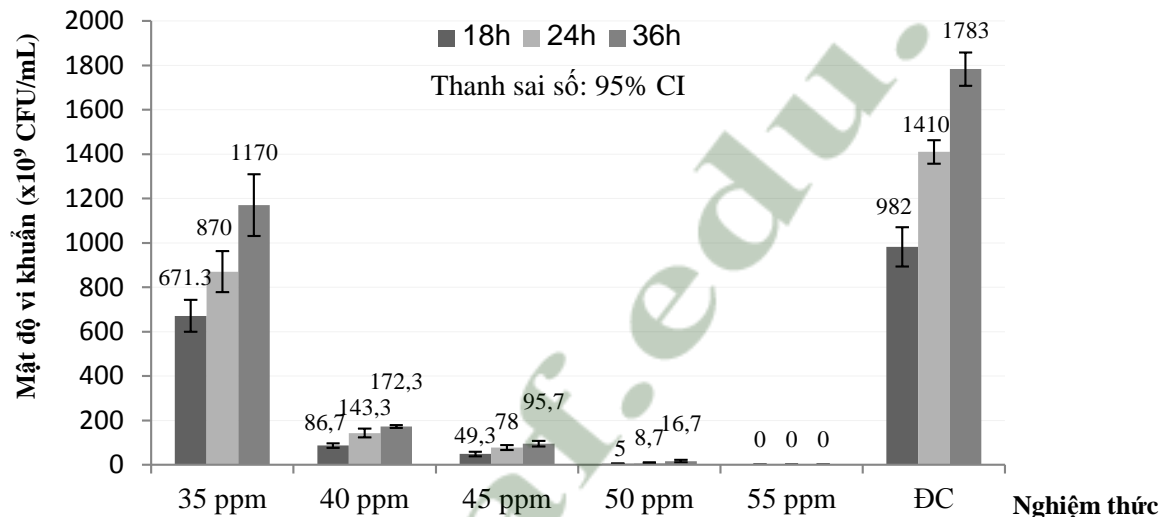
#### 3.2.2. Kết quả sàng lọc nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ tiêu diệt tối thiểu của hệ nano Ag-TiO<sub>2</sub>-Dox-Alg đối với vi khuẩn *V. alginolyticus*

Vi khuẩn *V. alginolyticus* trong ống nghiệm được coi là phát triển nếu làm đục môi trường và được phát hiện bằng mắt thường. Kết quả này được trình bày ở Bảng 2. Mật độ vi khuẩn ở các thời điểm khác nhau được trình bày ở Hình 8.



**Bảng 2.** Sự phát triển của vi khuẩn *V. alginolyticus* sau 18 giờ ở các ống nghiệm bổ sung nano Ag-TiO<sub>2</sub>-Dox-Alg ở các nồng độ khác nhau.

| Nồng độ nano               | 35 ppm | 40 ppm | 45 ppm | 50 ppm | 55 ppm | 0 ppm (ĐC) |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|
| Sự phát triển của vi khuẩn | +      | -      | -      | -      | -      | +          |



**Hình 8.** Kết quả mật độ tế bào vi khuẩn *V. alginolyticus* trong ống nghiệm có chứa dung dịch nano Ag-TiO<sub>2</sub>-Dox-Alg ở các nồng độ khác nhau ở các thời điểm sau 18, 24 và 36 giờ.

Kết quả cho thấy khi nuôi vi khuẩn với nano Ag-TiO<sub>2</sub>-Dox-Alg ở nồng độ 35 ppm, sau 18 giờ, môi trường đục do mật độ vi khuẩn còn khá cao. Tuy nhiên khi sử dụng 40 ppm nano Ag-TiO<sub>2</sub>-Dox-Alg, bằng mắt thường nhận thấy ống nghiệm có màu trong suốt khác với ống ĐC chứng tỏ sự phát triển của vi khuẩn bị ức chế rõ rệt. Mật độ vi khuẩn sau 18 giờ ở nghiệm thức này cũng có sự khác biệt lớn với nghiệm thức ĐC (thấp hơn 11,3 lần). Như vậy, chúng tôi xác định nồng độ 40 ppm là nồng độ ức chế tối thiểu của hệ nano Ag-TiO<sub>2</sub>-Dox-Alg đối với vi khuẩn *V. alginolyticus*.

Tại nồng độ nano Ag-TiO<sub>2</sub>-Dox-Alg 55 ppm thì kết quả cấy lên đĩa petri không có khuẩn lạc nào phát triển ở tất cả các thời điểm cấy kể cả khi cấy ở nồng độ gốc. Điều này cho thấy, tại nồng độ nano 55 ppm vi khuẩn bị tiêu diệt hoàn toàn sau 18 tiếng và không phát triển trở lại sau 36 tiếng. Do đó nồng độ 55 ppm là nồng độ tiêu diệt tối thiểu của hệ vật liệu nano Ag-TiO<sub>2</sub>-Dox-Alg đối với vi khuẩn *V. alginolyticus*.

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã chế tạo thành công hệ vật liệu nano tổ hợp Ag-TiO<sub>2</sub> mang kháng sinh Doxycycline có kích thước từ 70 đến 80 nm. Các tính chất của vật liệu với các phép đo như XRD, FE-SEM, FTIR và DLS đã được khảo sát. Hệ nano tổ hợp mang kháng sinh này có khả năng kháng tốt với vi khuẩn *V. alginolyticus* gây bệnh trên tôm chân trắng. Nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ tiêu diệt tối thiểu của hệ nano này đối với vi khuẩn *V. alginolyticus* lần lượt là 40 ppm và 55 ppm.



## LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thiện nghiên cứu này chúng tôi xin chân thành cảm ơn Viện Khoa học Vật Liệu, Viện Hàn Lâm Khoa Học Việt Nam đã hỗ trợ kỹ thuật và trang thiết bị vật tư để sản xuất hệ vật liệu nano. Cảm ơn dự án “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ nano trong nông nghiệp” do GS.TS. Đặng Đình Kim chủ trì đã hỗ trợ kinh phí để hoàn thành nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### 1. Tài liệu tiếng Việt

Nguyễn Thị Thùy Giang, Phạm Văn Toàn, Phạm Quốc Hùng, (2016). Hội chứng hoại tử gan tụy ở Tôm chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) nuôi thương phẩm tại Ninh Thuận. *Tạp chí Khoa học – Công nghệ Thủy sản*, 01(2016): 32-40.

Hội đồng Dược điển Việt Nam, (2002). *Dược điển Việt Nam*. NXB Y học.

### 2. Tài liệu tiếng nước ngoài

Amin, S. A., Pazouki, M., & Hosseinnia, A., (2009). Synthesis of TiO<sub>2</sub>-Ag nanocomposite with sol-gel method and investigation of its antibacterial activity against E. coli. *Powder Technology*, 196(3): 241-245.

Dung, T. T. N., Buu, N. Q., Quang, D. V., Ha, H. T., Bang, L. A., Chau, N. H., Ly, N. T., & Trung, N. V., (2009). Synthesis of nanosilver particles by reverse micelle method and study of their bactericidal properties. *Journal of Physics: Conference Series*, 187(1), 012054.

Holmström, K., Gräslund, S., Wahlström, A., Pounghompoo, S., Bengtsson, B. E., & Kautsky, N., (2003). Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *International journal of food science & technology*, 38(3): 255-266.

Huh, A. J., & Kwon, Y. J., (2011). “Nanoantibiotics”: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*, 156(2): 128-145.

Schauer, S., Sommer, R., Farnleitner, A. H., & Kirschner, A. K., (2012). Rapid and sensitive quantification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* cells in water samples by use of catalyzed reporter deposition fluorescence *in situ* hybridization combined with solid-phase cytometry. *Applied and environmental microbiology*, 78(20): 7369-7375.

Somboon, M., Purivirojkul, W., Limsuwan, C., & Chuchird, N., (2012). Effect of *Vibrio* spp. in white feces infected shrimp in Chantaburi, Thailand. *Kasetsart University Fisheries Research Bulletin*, 36(1): 7-15.

Petrus, E. M., Chai, L. C., Anyi, U., Robin, T., Elexson, N., Chai, L. F., & Radu, S., (2011). A study on the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of Nano Colloidal Silver on food-borne pathogen. *International Food Research Journal*, 18(1): 55-66.



## SYNTHESIS OF ANTIBIOTIC DELIVERY NANOSYSTEM (AG-TiO<sub>2</sub>-DOXYCYCLINE-ALGINATE) AND EVALUATE ITS ANTAGONISTIC EFFECT TO *VIBRIO ALGINOLYTICUS* CAUSING WHITE FECES SYNDROME ON SHRIMP

Mac Nhu Binh<sup>1</sup>, Ha Phuong Thu<sup>2</sup>, Tran Nguyen Thao<sup>1</sup>, Le Thi Kim Anh<sup>1</sup>,  
Nguyen Thi Thanh Thuy<sup>1</sup>, Dang Dinh Kim<sup>3</sup>

<sup>1</sup>University of Agriculture and Forestry, Hue University;

<sup>2</sup>Institute of Materials Sciences, Vietnam Academy of Science and Technology;

<sup>3</sup>Institute of Environmental Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

Contact email: [macnhubinh@huaf.edu.vn](mailto:macnhubinh@huaf.edu.vn)

### ABSTRACT

Drug delivery nanosystems have been proved as a great potential approach to producing high efficiency in the treatment of many types of diseases thanks to excellent ability in delivery and distribution of the drug to the targeted sites. In this study, antibiotic delivery nanosystem (Ag-TiO<sub>2</sub>-Doxycycline-Alginate) was prepared by the multi-step procedure. Characteristics of the nano-materials were determined by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM), X-ray diffraction, infrared spectroscopy and dynamic light scattering (DLS). The antibacterial activity of the nanosystem against *Vibrio alginolyticus*, a shrimp pathogen, has also been observed. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the nanosystem were 40 ppm and 55 ppm, respectively.

**Key words:** Ag-TiO<sub>2</sub>, antibiotic resistance, Doxycycline, nano-materials, *Vibrio alginolyticus*.

Received: 2<sup>nd</sup> June 2017

Reviewed: 13<sup>th</sup> June 2017

Accepted: 30<sup>th</sup> July 2017