

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Yên Chi

**NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO PHỨC HỆ NANO BẠC VỚI AXIT
PERAXETIC CÓ KHẢ NĂNG DIỆT VI KHUẨN, VIRUS GÂY
BỆNH HAY GẶP TRONG MÔI TRƯỜNG CHĂN NUÔI LỢN**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ KỸ THUẬT HÓA HỌC, VẬT LIỆU, LUYỆN KIM
VÀ MÔI TRƯỜNG**

Hà Nội - 2025

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Yến Chi

**NGHIÊN CỨU CHÉ TẠO PHỨC HỆ NANO BẠC VỚI AXIT
PERAXETIC CÓ KHẢ NĂNG DIỆT VI KHUẨN, VIRUS GÂY
BỆNH HAY GẶP TRONG MÔI TRƯỜNG CHĂN NUÔI LỢN**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ KỸ THUẬT HÓA HỌC, VẬT LIỆU, LUYỆN KIM
VÀ MÔI TRƯỜNG**

Ngành : Kỹ thuật môi trường

Mã số: 8 52 03 20

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :
TS. Trần Thị Ngọc Dung**

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'TND', is written over a horizontal line.

Hà Nội - 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài luận văn “Nghiên cứu chế tạo phức hệ nano bạc với axit peraxetic có khả năng diệt vi khuẩn, virus gây bệnh hay gặp trong môi trường chăn nuôi lợn” là do tôi thực hiện với sự hướng dẫn của TS. Trần Thị Ngọc Dung. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về những nội dung mà tôi đã trình bày trong luận văn này.

Hà Nội, ngày 13 tháng 05 năm 2025

Học viên



Nguyễn Thị Yên Chi

LỜI CẢM ƠN

Với lòng biết ơn sâu sắc, em xin gửi lời cảm ơn chân thành đến TS. Trần Thị Ngọc Dung – Trưởng khoa Công nghệ Môi trường và Năng lượng, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam đã tận tình hướng dẫn và giúp đỡ em hoàn thành luận văn này.

Em cũng xin gửi lời cảm ơn tới thầy (cô) giáo Khoa Công nghệ Môi trường và Năng lượng, Học viện Khoa học và Công nghệ đã giúp đỡ em trong quá trình học tập và nghiên cứu tại học viện.

Cuối cùng em xin cảm ơn gia đình, người thân và bạn bè đã luôn ủng hộ, động viên và giúp đỡ em trong suốt thời gian qua.

Mặc dù rất cố gắng trong quá trình thực hiện đề tài nhưng do trình độ và kinh nghiệm còn hạn chế nên luận văn không tránh khỏi những thiếu sót. Rất mong nhận được sự chỉ dẫn và đóng góp thêm của thầy cô và các bạn để em rút kinh nghiệm và hoàn chỉnh thêm đề tài.

MỤC LỤC

DANH MỤC BẢNG.....	v
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT	vii
MỞ ĐẦU	1
1. Tính cấp thiết của đề tài	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN VỀ VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU	3
1.1. Tổng quan về ngành chăn nuôi lợn	3
1.2. Một số dịch bệnh thường gặp trong chăn nuôi lợn	4
1.2.1. Dịch tả lợn Châu Phi – DTLCF (<i>African Swine Fever virus</i>) ...	4
1.2.2. Một số bệnh do vi khuẩn do vi khuẩn gây ra.....	8
1.3. Tổng quan về phức hợp nano	10
1.3.1. Tổng quan về nano bạc	10
1.3.2. Tổng quan về chitosan	16
1.3.3. Tổng quan về axit peraxetic	17
1.3.3. Các nghiên cứu về sự kết hợp giữa axit peraxetic và nano bạc	18
CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	21
2.1. Cách tiếp cận	21
2.2. Đối tượng nghiên cứu	21
2.3. Hóa chất, thiết bị và dụng cụ thí nghiệm	22
2.3.1. Hóa chất và sinh phẩm	22
2.3.2. Trang thiết bị	22
2.4. Phương pháp nghiên cứu.....	23
2.4.1. Phương pháp chế tạo phức hệ nano	23
2.4.2. Phương pháp xác định đặc trưng tính chất của phức hệ nano .	24
2.4.3. Phương pháp đánh giá khả năng diệt khuẩn của phức hệ nano với 2 chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> và <i>S. aureus</i>	24
2.4.4. Đánh giá tính hiệp đồng của các thành phần trong phức hệ SCP bằng phương pháp thử Checkerboard	25
2.5.4. Phương pháp thử nghiệm đánh giá khả năng ức chế virus Dịch tả lợn Châu Phi (ASFV) của phức hệ nano.....	26
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	29
3.1. Đánh giá đặc tính của phức hệ nano	29

3.2. Đánh giá khả năng diệt khuẩn của phức hệ nano.....	32
3.3. Đánh giá khả năng bất hoạt virus DTLCP của phức hệ nano.....	37
3.3.1. Độc tính của phức hệ nano trên tế bào PAM.....	37
3.3.2. Khả năng bất hoạt virus DTLCP của phức hệ nano.....	40
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	44
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ.....	46

DANH MỤC BẢNG

Bảng 3. 1. Hiệu quả diệt khuẩn của dung dịch nano bạc và phức hệ nano ở nồng độ bạc khác nhau đối với <i>S. aureus</i> và <i>E. coli</i>	34
Bảng 3. 2. Kiểm nghiệm bằng phương pháp checkerboard của phức hệ nano đối với 2 chủng vi khuẩn <i>S. aureus</i> và <i>E. coli</i>	36

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Hình ảnh cấu trúc của virus Dịch tả lợn Châu Phi.....	5
Hình 1. 2. Sơ đồ truyền lây của virus DTLCP [11]	6
Hình 1.3. Tình hình Dịch tả lợn Châu Phi trên toàn cầu (2016 – 2020) [16]...	7
Hình 1.4. Con đường xâm nhập vào vật chủ của vi khuẩn <i>E. coli</i> [22].....	9
Hình 1.5. Cơ chế diệt khuẩn của các hạt nano bạc [32].....	11
Hình 1.6. Ảnh SEM của một số chủng vi khuẩn sau khi được xử lý bằng nano bạc [35].....	12
Hình 1. 7. Cơ chế kháng virus của các hạt nano bạc [37].....	14
Hình 1. 8. Hiệu quả ngăn chặn virus LMLM của các hạt nano bạc [40].....	15
Hình 1.9. Hình ảnh tế bào PAM gây nhiễm virus DTLCP không được xử lý (a) và được xử lý (b) với dung dịch AgNP 0,78 ppm trong 1h. Hình ảnh được chụp trên kính hiển vi LED Leica DM IL ở độ phóng đại 200x [42].....	16
Hình 1.10. Sơ đồ bố trí thí nghiệm kháng virus [42].....	16
Hình 2. 1. Sơ đồ quá trình thực hiện nghiên cứu đánh giá hiệu quả trên virus DTLCP của phức hệ nano	26
Hình 2. 2. Sơ đồ biểu diễn bố trí thử nghiệm kiểm tra độc tính của phức hệ nano với tế bào PAM	27
Hình 3. 1. Phổ cộng hưởng plasmon bề mặt của nano bạc và phức hệ nano..	29
Hình 3. 2. Hình ảnh TEM của dung dịch nano bạc (A) và phức hệ nano (B -D)	30
Hình 3. 3. Giảm đồ XRD của nano bạc (a) trước và sau khi kết hợp với PAA (b)	31
Hình 3. 4. Hình ảnh SEM của phức hệ nano (A) và AgNP (B).....	31
Hình 3. 5. Phổ cộng hưởng plasmon bề mặt của phức hệ nano sau khi chế tạo và sau 6 tháng bảo quản	32
Hình 3. 6. Hình ảnh đánh giá hoạt tính của phức hệ nano và nano bạc tại 2 nồng độ pha loãng 2^{-8} và 2^{-9} đối với vi khuẩn <i>E. coli</i>	33
Hình 3. 7. Hiệu quả diệt 2 chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> và <i>S. aureus</i> của phức hệ nano và nano bạc	35
Hình 3. 8. Hình ảnh đánh giá hoạt tính của phức hệ nano và nano bạc tại 2 nồng độ pha loãng 2^{-8} và 2^{-9} chống lại vi khuẩn <i>S. aureus</i>	36

Hình 3.9. Sơ đồ đánh giá độc tính của dung dịch nano bạc và phức hệ nano trên tế bào PAM với các nồng độ pha loãng khác nhau	38
Hình 3. 10. Hình ảnh hiển vi của tế bào PAM sau khi xử lý với các nồng độ khác nhau của phức hệ nano	39
Hình 3. 11. Hình ảnh quan sát tế bào dưới kính hiển vi trước và sau khi nhuộm Crystal violet của tế bào PAM trong mẫu đối chứng và mẫu được xử lý ở nồng độ gây độc tế bào	40
Hình 3. 12. Kết quả thử nghiệm hoạt tính bất hoạt virus của phức hệ SCP tại nồng độ an toàn tế bào	41
Hình 3.13.Tế bào PAM được quan sát dưới kính hiển vi LED Leica DM II .	42
Hình 3. 14. Biểu đồ minh họa hiệu giá virus DTLCP giảm sau khi xử lý với phức hệ nano và nano bạc ở các thời gian khác nhau	42

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tên tiếng Anh	Tên tiếng Việt
AgNP	Silver nanoparticles	Nano bạc
ASF/DTLCP	African swine fever	Bệnh Dịch tả lợn Châu Phi
CC	Cultural control	Mẫu đối chứng
CPE	Cytopathic effect	Hiệu ứng gây bệnh cho tế bào
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	Môi trường nuôi cấy tế bào cơ bản
FICI	Fractional inhibitory concentration index	Chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn
HAD ₅₀		Liều gây hiện tượng hấp phụ hồng cầu ở 50% tế bào.
MIC	Minimum Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
PAA	Peracetic acid	Axit peraxetic
PAM	Porcine Alveolar Macrophages	Tế bào đại thực bào phế nang phổi của lợn
PBS	Phosphate-Buffered Saline	Dung dịch đệm photphate
pRBC	Packed red blood cell	Khối hồng cầu đậm đặc
ROS	Reactive oxygen species	Các dạng oxi hoạt động

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Trong những năm gần đây, ngành chăn nuôi lợn đã trở thành lĩnh vực quan trọng trong nền kinh tế nông nghiệp, cung cấp nguồn thực phẩm thiết yếu cho con người. Tuy nhiên ngành chăn nuôi đang bị đe dọa bởi các dịch bệnh do virus, vi khuẩn gây ra, điều này làm ảnh hưởng nghiêm trọng đến tình hình kinh tế và an ninh lương thực trên thế giới.

Dịch tả lợn Châu Phi (ASF) bắt nguồn từ chu trình sylvatic giữa lợn rừng và ve mềm tại khu vực cận Sahara, Châu Phi. Năm 2007, virus này được ghi nhận đã xâm nhập vào Georgia, sau đó lan sang khu vực Trans-Caucasus và tiến vào Liên bang Nga. Đến năm 2014, ASF tiếp tục lây lan và được báo cáo tại một số quốc gia thuộc Liên minh châu Âu [1]. Dịch tả lợn Châu Phi gây thiệt hại nặng nề nhất khi xâm nhập vào Trung Quốc – quốc gia có số lượng lợn lớn nhất thế giới – vào ngày 03/8/2018 [2] và bùng phát mạnh tại các nước thuộc Châu Á, trong đó, năm 2019 Việt Nam đã phát hiện hơn 6000 ổ dịch trên cả nước. Trước đó, ngành chăn nuôi đã trải qua một số đợt bùng phát bệnh dịch lớn như bệnh Lở mồm long móng (FMD), hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS), bệnh tiêu chảy ở lợn (PED), và tất cả các bệnh này đều do virus gây ra. Ngoài nguy cơ bệnh truyền nhiễm do các loại virus thì ở lợn cũng xuất hiện nhiều loại bệnh do vi khuẩn gây ra, điều này cũng ảnh hưởng đến kinh tế nông nghiệp nói chung và sự phát triển của ngành chăn nuôi lợn nói riêng. Các bệnh như tiêu chảy phân trắng do vi khuẩn *E. coli* (thuộc họ *Enterobacteriaceae*), viêm da do *Staphylococcus hyicus*, phó thương hàn do *Salmonella*,...[3] là những bệnh có thể để lại hậu quả nghiêm trọng.

Các bệnh này không chỉ gây ảnh hưởng đến tình hình kinh tế mà cũng là một trong những nguy cơ ảnh hưởng đến sức khỏe con người khi sử dụng thực phẩm như thịt từ những vật nuôi bị bệnh [3].

Biện pháp phòng chống dịch bệnh hiệu quả nhất hiện nay là đảm bảo vệ sinh môi trường chăn nuôi. Việc khử trùng thường xuyên khu vực chuồng trại và môi trường xung quanh là rất cần thiết. Hiện nay, nhiều hóa chất và chế phẩm như clorocrestol, glutaraldehyde, natri hypochlorite, kali (peroxy)monosulfate, formaldehyde,... đang được sử dụng để khử trùng chuồng

trại [4]. Tuy nhiên, các chất diệt khuẩn hiện nay đều tồn tại một số nhược điểm như: độc tính cao, ăn mòn, gây kích ứng cho người và vật nuôi, vi khuẩn có thể tạo cơ chế đề kháng, có khả năng gây ung thư, thêm vào nữa có thể làm tăng lượng chất khó phân hủy. Chính vì vậy cần tìm những chất khử trùng có thể sử dụng an toàn đối với người và vật nuôi, không tạo các sản phẩm gây ô nhiễm môi trường thứ cấp là rất cần thiết.

Vì vậy, đề tài đề xuất nghiên cứu chế tạo một phức hệ nano kết hợp giữa axit peracetic và nano bạc nhằm tạo ra một chất khử trùng hiệu quả mới, an toàn trong môi trường chăn nuôi. Đồng thời, nghiên cứu đánh giá hiệu quả diệt vi khuẩn và virus của phức hệ nano này trong phòng thí nghiệm.

2. Mục tiêu nghiên cứu

- Chế tạo thành công phức hệ nano bạc với axit peraxetic. Đánh giá các đặc trưng tính chất của phức hệ thu được.
- Đánh giá khả năng diệt một số vi khuẩn và virus gây bệnh trong chăn nuôi lợn của phức hệ nano thu được.

3. Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Nghiên cứu chế tạo phức hệ nano từ nano bạc và axit peraxetic. Phân tích đánh giá một số thông số đặc trưng tính chất của phức hệ bằng một số phương pháp như SEM, TEM, XRD, UV-Vis, ORP.

Nội dung 2: Xác định hiệu quả diệt khuẩn của phức hệ nano đối với 2 chủng vi khuẩn gây bệnh cho lợn hay gặm (*E. coli*, *S. aureus*).

Nội dung 3: Xác định khả năng bất hoạt virus ASF – gây bệnh tả lợn Châu Phi của phức hệ nano.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN VỀ VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

1.1. Tổng quan về ngành chăn nuôi lợn

Chăn nuôi lợn là một trong những lĩnh vực chủ chốt của nền kinh tế nông nghiệp Việt Nam, đóng góp lớn vào GDP khu vực nông nghiệp với doanh thu 33 tỷ USD trong năm 2023 [5]. Vai trò của ngành không chỉ dừng lại ở việc cung cấp nguồn thực phẩm thiết yếu, đồng thời đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng ngày càng tăng của xã hội. Dự kiến doanh thu năm 2024 đạt 35 tỷ USD, với tổng đàn lợn cả nước đạt hơn 25 triệu con, tăng 2,9% so với cùng kỳ năm trước. Sản lượng thịt lợn chiếm tới 65% trong cơ cấu sản xuất thịt, cho thấy vai trò trọng yếu của ngành trong ổn định kinh tế và bảo đảm an ninh lương thực quốc gia.

Tuy nhiên, sự bùng phát của các dịch bệnh truyền nhiễm như dịch tả lợn châu Phi, tiêu chảy do virus PED, bệnh lở mồm long móng và hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp (PRRS)... đã gây tổn thất nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi lợn. Chỉ trong năm 2024, hơn 863 ổ dịch tả lợn châu Phi tại 46 tỉnh thành ở Việt Nam đã khiến 57.000 con lợn bị tiêu hủy, ảnh hưởng lớn đến nguồn cung thực phẩm [6]. Những mầm bệnh này lây lan nhanh qua tiếp xúc trực tiếp, nguồn nước, không khí và thức ăn, trong khi điều kiện chuồng trại ẩm ướt, mật độ nuôi cao làm gia tăng nguy cơ bùng phát dịch.

Bùng phát dịch bệnh không chỉ gây thiệt hại kinh tế mà còn ảnh hưởng đến môi trường và an toàn thực phẩm. Nếu không được tiêu hủy đúng cách, lợn bệnh có thể trở thành nguồn gây ô nhiễm đất và nước, góp phần làm lan rộng dịch bệnh và ảnh hưởng tiêu cực đến môi trường sinh thái. Đồng thời, lạm dụng kháng sinh trong chăn nuôi đã thúc đẩy sự xuất hiện của vi khuẩn kháng thuốc, làm giảm hiệu quả điều trị và tăng chi phí phòng chống dịch bệnh [7].

Để kiểm soát dịch bệnh hiệu quả, việc khử trùng tiêu độc trong các trang trại chăn nuôi lợn đóng vai trò sống còn. Các mầm bệnh nguy hiểm có thể tồn tại dai dẳng trong môi trường chuồng trại, nước uống, thức ăn và thậm chí cả không khí. Vì vậy, việc sử dụng các chất khử trùng mạnh với khả năng diệt khuẩn, bất hoạt virus phổ rộng là việc cần thực hiện liên tục.

Hiện nay, nhiều chế phẩm/hóa chất đã được sử dụng để khử trùng chuồng trại chăn nuôi như formaldehyde, glutaraldehyde và chlorine dioxide... [4]. Tuy nhiên, các chất khử trùng này vẫn tồn tại nhiều hạn chế như gây kích ứng, tạo sản phẩm phụ độc hại, hiệu quả khử trùng không ổn định, nguy cơ tăng kháng thuốc và tồn dư hóa chất trong sản phẩm chăn nuôi, đồng thời ảnh hưởng tiêu cực đến môi trường. Do đó, cần thiết phải tìm kiếm một chất khử trùng mới có hiệu quả diệt khuẩn cao, không gây độc tế bào, an toàn với người và vật nuôi, đồng thời không tạo ra các sản phẩm phụ gây ô nhiễm môi trường.

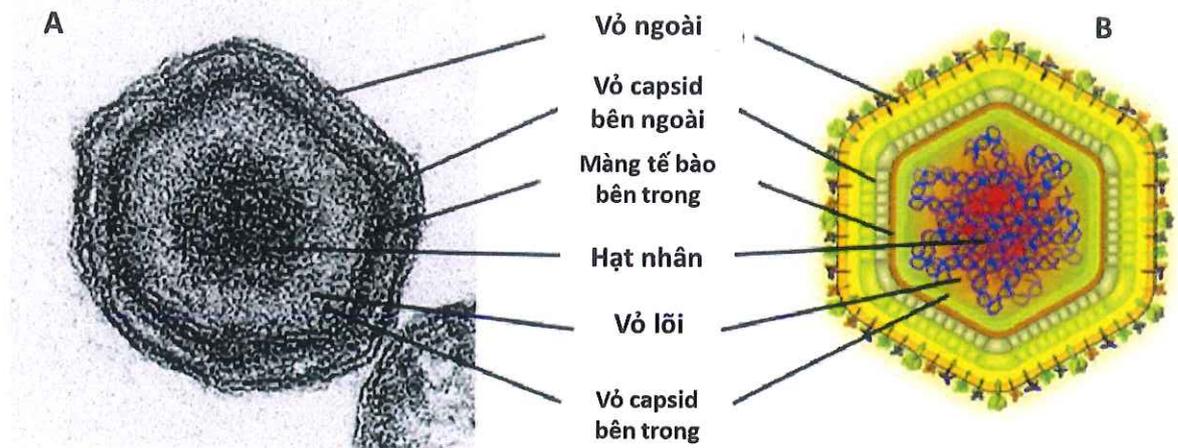
1.2. Một số dịch bệnh thường gặp trong chăn nuôi lợn

Dịch bệnh truyền nhiễm do virus gây ra là một trong những vấn đề nghiêm trọng nhất và là mối đe dọa thường trực với ngành chăn nuôi lợn trên toàn cầu. Trong những năm gần đây, dịch tả lợn châu Phi (*African swine fever*) và một số bệnh do vi khuẩn gây ra bùng phát nhiều khu vực trên thế giới gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến ngành chăn nuôi và an ninh lương thực ở một số quốc gia.

1.2.1. Dịch tả lợn Châu Phi – DTLCP (*African Swine Fever virus*)

Virus dịch tả lợn Châu Phi (ASFV) là tác nhân gây bệnh nguy hiểm trên lợn, có khả năng lây lan nhanh với tỷ lệ tử vong gần như 100% nếu không được kiểm soát kịp thời. Từ năm 2018, dịch bệnh bùng phát tại Trung Quốc và nhanh chóng lan sang nhiều nước châu Á, bao gồm Việt Nam, Mông Cổ, Hàn Quốc, Philippines và Malaysia [1]. Tại Việt Nam, năm 2019 ghi nhận hơn 6.000 ổ dịch trên toàn quốc, gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng. Riêng Trung Quốc, thiệt hại kinh tế từ ASF trong năm 2019 ước tính lên đến 130 tỷ USD [8].

Virus DTLCP thuộc họ *Asfarviridae*, giống *Asfivirus*, mang bộ gen DNA sợi kép với đường kính khoảng 200 nm, được bao bọc bởi lớp vỏ capsid dạng hình khối hai mươi mặt [9]. Virus này có sức đề kháng cao, cho phép nó tồn tại lâu trong môi trường. Virus DTLCP có thể tồn tại trong thịt lợn sống từ 3 đến 6 tháng, trong thịt đông lạnh hơn 1000 ngày, trong phân tươi khoảng 11 ngày, trong máu khô tới 70 ngày hay trên bề mặt của dụng cụ chăn nuôi, quần áo và phương tiện vận chuyển từ vài ngày đến vài tuần [10], từ đó làm gia tăng nguy cơ phát tán mầm bệnh trong môi trường chăn nuôi.



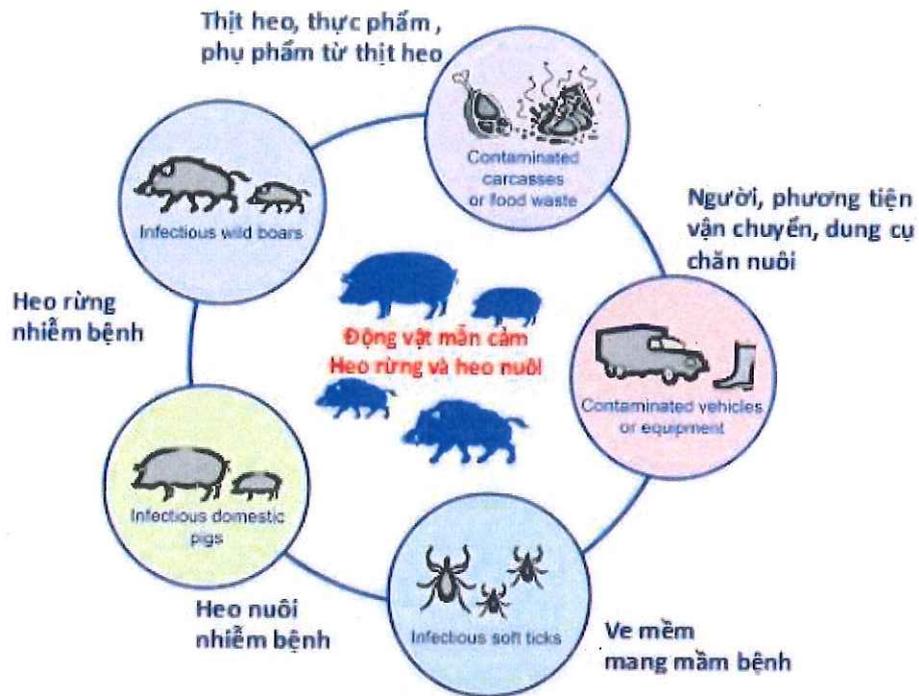
Hình 1.1. Hình ảnh cấu trúc của virus Dịch tả lợn Châu Phi

A – Hình ảnh hạt virus DTLCP dưới kính hiển vi điện tử (mẫu đã cố định hóa học và nhúng resin);

B- Sơ đồ tổng quan cấu trúc của hạt virus DTLCP

Bệnh DTLCP có thể lây truyền qua các con đường sau:

- Lây truyền trực tiếp: thông qua tiếp xúc giữa lợn khỏe và lợn nhiễm bệnh, qua dịch tiết, phân, nước tiểu, tinh dịch hoặc tiêu thụ thịt và các sản phẩm từ lợn nhiễm virus chưa qua xử lý nhiệt..
- Lây gián tiếp: thông qua các vật chủ trung gian sinh học như ve mềm thuộc giống *Ornithodoros*, côn trùng (ruồi, muỗi), chim và lợn hoang. Ngoài ra, các yếu tố cơ học như quần áo, dụng cụ chăn nuôi, xe vận chuyển và thức ăn cũng có thể mang mầm bệnh, góp phần lan rộng dịch [11].



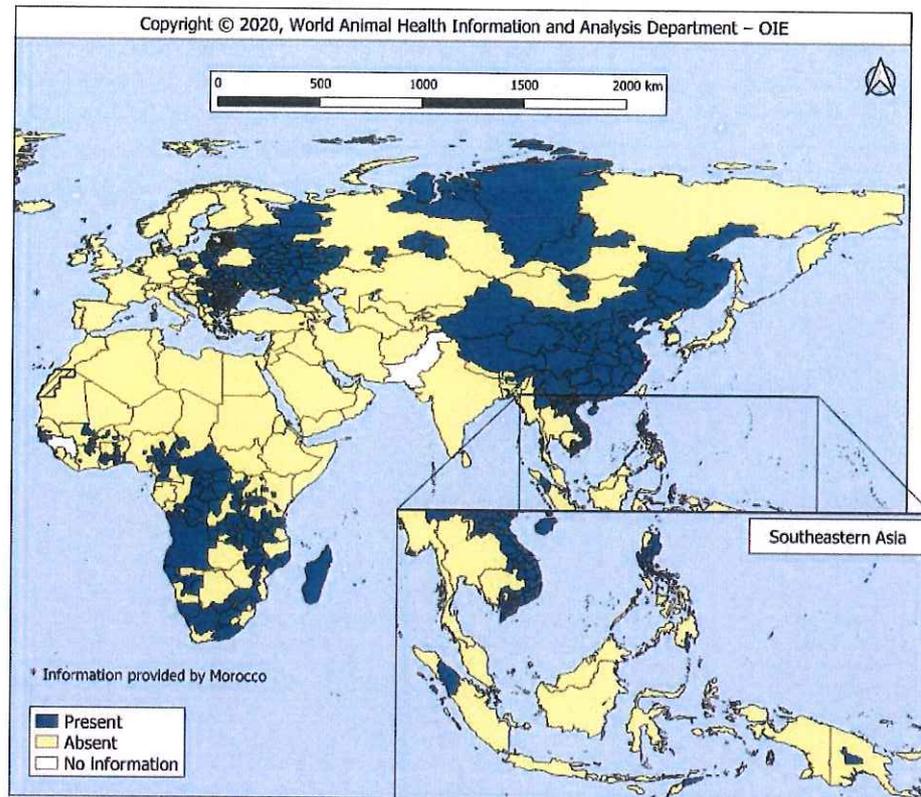
Hình 1. 2. Sơ đồ truyền lây của virus DTLCP [11]

Cho đến nay, vẫn chưa có loại vắc-xin nào được chứng minh là hiệu quả tuyệt đối trong việc phòng chống virus DTLCP. Các loại vắc-xin bất hoạt hiện chưa cung cấp được khả năng bảo vệ lâu dài. Nguyên nhân là do virus DTLCP có tốc độ nhân lên nhanh, trong khi hệ miễn dịch của lợn không thể tạo ra đáp ứng đủ mạnh để kiểm soát virus [12]. Một số nghiên cứu đã tập trung phát triển vắc-xin sống giảm độc lực, điển hình như ASFV-G- Δ I177L. Mặc dù có hiệu quả bước đầu, loại vắc-xin này vẫn gặp nhiều hạn chế về chi phí, thời gian bảo quản và tính ổn định [13].

Tháng 7 năm 2023, Việt Nam đã chính thức cấp phép và triển khai hai vắc-xin sống giảm độc lực, NAVET-ASFVAC và AVAC ASF LIVE, được phát triển dựa trên chủng ASFV-G- Δ I177L và ASFV-G- Δ MGF. Mặc dù các vắc-xin này có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch, nhưng các nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng chúng không thể bảo vệ hoàn toàn lợn trước các chủng DTLCP tái tổ hợp mới xuất hiện, đặc biệt là chủng rASFV I/II – biến thể có nguồn gốc từ cả hai kiểu gen I và II, gây nguy cơ bùng phát dịch bệnh trở lại. Ngoài ra, hai loại vắc-xin trên tiềm ẩn nguy cơ tái tổ hợp và phục hồi độc lực. Hiện tại vẫn chưa có vắc-xin DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals), khiến việc phân biệt giữa động vật nhiễm bệnh và đã tiêm phòng trở

nên khó khăn [14, 15]. Hơn nữa, các vắc-xin hiện tại chỉ được khuyến cáo sử dụng cho lợn thịt từ 4 tuần tuổi trở lên, điều này làm hạn chế phạm vi bảo vệ trên toàn đàn [14].

Do đó, bên cạnh vắc-xin, cần tăng cường áp dụng các biện pháp an toàn sinh học như kiểm soát nhập khẩu, chẩn đoán sớm và sử dụng chất khử trùng để kiểm soát hiệu quả dịch tả lợn châu Phi [14, 15].



Hình 1.3. Tình hình Dịch tả lợn Châu Phi trên toàn cầu (2016 – 2020) [16]

Bên cạnh việc sử dụng vắc-xin, các biện pháp an toàn sinh học đóng vai trò quan trọng trong việc kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh. Khử trùng hiệu quả là yếu tố then chốt trong việc kiểm soát sự lây lan của dịch bệnh. Biện pháp này cần được kết hợp với các quy định nghiêm ngặt về vận chuyển động vật và sản phẩm, quản lý chất thải từ thịt lợn, cũng như giám sát chặt chẽ các khu vực có dịch. Virus DTLCP có thể bị bất hoạt ở điều kiện pH 11,5 hoặc khi tiếp xúc với một số chất khử trùng truyền thống như canxi hydroxit, hypochlorite, formalin, ortho-phenylphenol, glutaraldehyde và các hợp chất iot [17]. Tuy nhiên, nhiều chất khử trùng truyền thống còn tồn tại hạn chế như mùi khó chịu,

thời gian tác dụng ngắn, thậm chí có nguy cơ gây ung thư. Do đó, chỉ một số ít được Cơ quan Bảo vệ Môi trường Hoa Kỳ (EPA) khuyến nghị sử dụng [17].

Virus DTLCP không lây sang người, nhưng dịch tả lợn Châu Phi vẫn gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến kinh tế và an ninh lương thực. Bên cạnh việc phát triển vắc-xin hiệu quả, các phương pháp khử trùng đóng vai trò thiết yếu trong việc ngăn chặn sự lây lan nhanh chóng của dịch bệnh trong môi trường chăn nuôi.

1.2.2. Một số bệnh do vi khuẩn do vi khuẩn gây ra

Ngoài các bệnh truyền nhiễm do virus, nhiều chủng vi khuẩn cũng là mối nguy tiềm tàng, khó kiểm soát trong chăn nuôi. Chúng có thể ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe con người nếu tiêu thụ sản phẩm từ vật nuôi nhiễm bệnh.

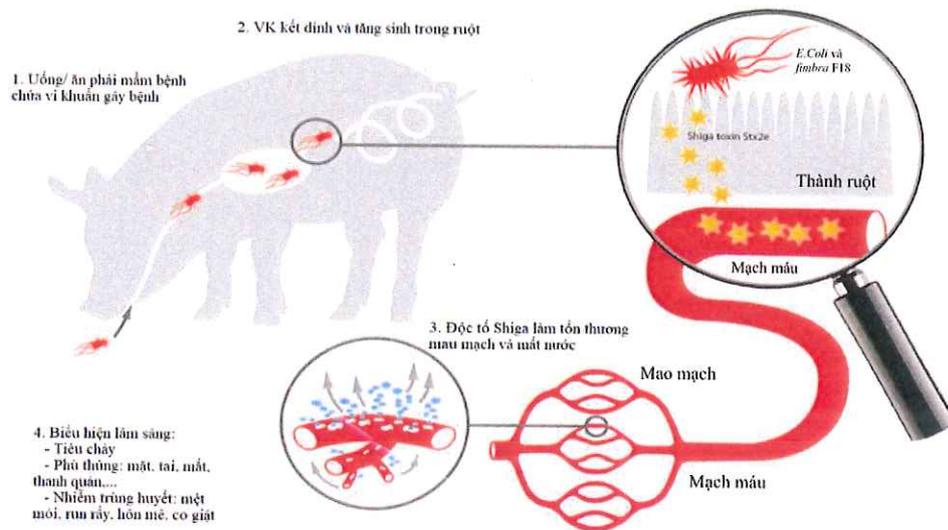
Một số bệnh thường gặp trong chăn nuôi lợn bao gồm tiêu chảy phân trắng, viêm da và phó thương hàn...

a) Vi khuẩn *E. coli* – gây bệnh tiêu chảy phân trắng

Escherichia coli (*E. coli*) là vi khuẩn Gram âm, phổ biến trong môi trường đất và đường ruột của người cũng như các loài động vật máu nóng, bao gồm cả lợn [18]. Phần lớn các chủng *E. coli* là vi khuẩn cộng sinh vô hại trong hệ tiêu hóa. Tuy nhiên, một số chủng đặc hiệu về huyết thanh có thể gây nhiễm trùng đường ruột nghiêm trọng.

Theo báo cáo năm 2015 của Liên minh Châu Âu, các đợt bùng phát dịch do *E. coli* sinh độc tố verotoxigenic (VTEC) chiếm khoảng 1,7% tổng số ca nhiễm [19]. Ngoài ra, tỷ lệ nhiễm VTEC trong thịt lợn dao động từ 0–74%. Một trong những nhóm *E. coli* phổ biến gây bệnh trên lợn, đặc biệt là lợn con, là *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC). Bệnh tiêu chảy sau cai sữa (PWD) ở lợn, do vi khuẩn ETEC gây ra, là một trong những nguyên nhân chính gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng do tỷ lệ mắc bệnh, tử vong cao và ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng đàn lợn [20].

Vi khuẩn này sản sinh hai yếu tố độc lực chính: (1) các chất kết dính giúp gắn vào các thụ thể đặc hiệu trên tế bào ruột, hỗ trợ quá trình xâm nhập, và (2) các độc tố ruột kích thích bài tiết dịch, gây tiêu chảy [21].



Hình 1.4. Con đường xâm nhập vào vật chủ của vi khuẩn *E. coli* [22]

Vi khuẩn *E. coli* thường xâm nhập vào vật chủ qua đường tiêu hóa thông qua thức ăn, nước uống bị nhiễm khuẩn. Lợn con dễ mắc bệnh do tiếp xúc với môi trường xung quanh hoặc bú sữa từ lợn mẹ bị viêm tuyến vú. Lợn con mắc bệnh tiêu chảy phân trắng thường có biểu hiện: phân lỏng như nước, có bọt, màu trắng hoặc vàng, và có mùi hôi khó chịu. Trong một số trường hợp, hậu môn liên tục chảy nước phân màu trắng hoặc vàng. Một số trường hợp có triệu chứng như: ói mửa, bụng thót, mắt trũng sâu, da tím tái, lông xù, suy kiệt nhanh và bỏ bú. Lợn con có thể chết sau 24–48 giờ kể từ khi bắt đầu tiêu chảy.

Ngoài ra, nhóm *E. coli* gây phù thũng thường xuất hiện ở lợn cai sữa từ 1–2 tuần tuổi. Bệnh thường xảy ra ở những con lớn nhất trong đàn, với các triệu chứng như lờ đờ, đi đứng loạng choạng, bại liệt, co giật, hôn mê, bụng trương hơi, khó thở, sưng phù mí mắt, lưỡi và hầu họng. Tỷ lệ tử vong do bệnh có thể lên tới 60–65% [23].

b) Vi khuẩn *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus là vi khuẩn Gram dương, thường được phân lập từ da và niêm mạc của nhiều loài động vật máu nóng, bao gồm cả lợn. Mặc dù *S. aureus* có thể tồn tại trong cơ thể mà không gây bệnh [24], nhưng trong một số điều kiện thuận lợi, vi khuẩn này có thể trở thành tác nhân gây bệnh nghiêm trọng.

S. aureus có thể gây ra một số bệnh lý trên lợn như viêm da, áp xe, viêm vú ở lợn nái, viêm khớp và viêm mô liên kết [25]. Một số nghiên cứu đã ghi nhận rằng *S. aureus* có thể gây viêm da mủ hạt tại chỗ (viêm mạch bạch huyết), dẫn đến viêm mủ toàn thân với sự hình thành các ổ mủ gây thuyên tắc ở phổi và xương [26].

Thêm vào đó, một điều đáng lo ngại là khả năng kháng kháng sinh của *S. aureus*. Việc sử dụng kháng sinh trong phòng và điều trị bệnh có thể làm giảm tỷ lệ nhiễm *S. aureus*. Tuy nhiên, điều này đồng thời làm gia tăng tỷ lệ kháng thuốc của vi khuẩn. Trong 80 mẫu thu được từ lợn nuôi tại Bắc Ninh, có tỷ lệ nhiễm *S. aureus* 16,25%, trong đó, vi khuẩn *S. aureus* kháng methicillin (MRSA) chiếm 6,25%. Ngoài ra, *S. aureus* có thể kháng với nhiều loại khác như penicillin G, erythromycin và clindamycin [27]... Trong một nghiên cứu khác tại Quảng Ngãi, kết quả ghi nhận *S. aureus* có khả năng kháng cao với streptomycin (79,07%), cefotaxime (72,09%) và oxacillin (67,44%) [28]. Ngoài ra, tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *S. aureus* trong thịt lợn là 16,67% với khả năng kháng cao với colistin (73,68%), ceftazidime (57,89%) và tetracycline (52,63%) [29].

Từ đó có thể thấy rằng một trong những nguyên nhân chính dẫn đến dịch bệnh trên lợn là môi trường chăn nuôi không đảm bảo vệ sinh. Chính vì vậy, để có thể ngăn ngừa các bệnh cho lợn cần phải đảm bảo môi trường sạch, không có chứa các tác nhân gây bệnh trực tiếp.

Bên cạnh việc nghiên cứu và sử dụng vắc-xin nhằm tăng khả năng phòng bệnh, việc hạn chế sử dụng kháng sinh, dọn chuồng thường xuyên và phun chất khử trùng trong không khí cũng đóng vai trò quan trọng. Phương pháp này giúp kháng lại phần lớn lượng vi khuẩn, virus tồn tại trong môi trường, kiểm soát dịch bệnh lây lan [30].

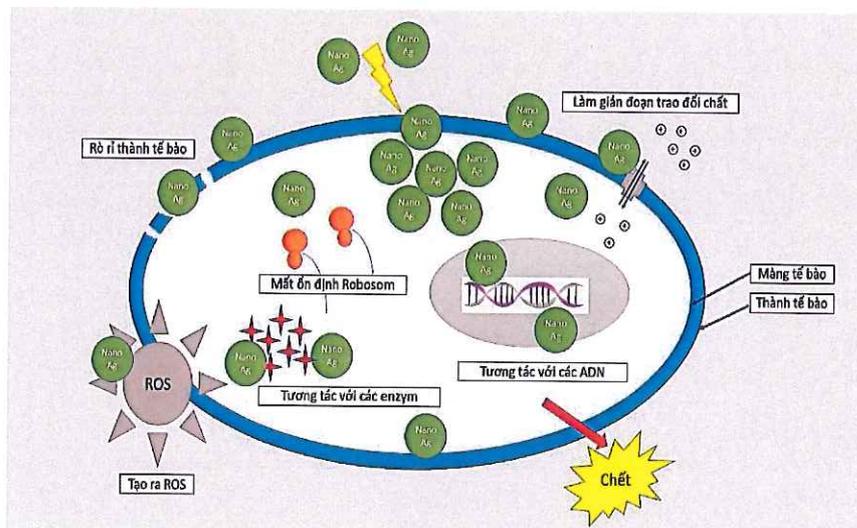
1.3. Tổng quan về phức hợp nano

1.3.1. Tổng quan về nano bạc

Vật liệu nano là vật liệu có ít nhất một chiều có kích thước nằm trong khoảng từ 1 - 100nm. Chúng được cho là "Vật liệu của thế kỷ 21" nhờ các tính chất độc đáo cho phép ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau như y

tế, điện tử, môi trường [31]. Trong số các vật liệu nano kim loại, nano bạc (AgNP) là loại được sử dụng phổ biến nhất và đóng vai trò là nguồn nguyên liệu quan trọng. Bạc được biết đến từ lâu với tác dụng kháng khuẩn vượt trội. Ở trạng thái nano, khả năng kháng khuẩn của bạc được tăng lên nhiều lần so với dạng vật liệu khối hay muối bạc.

Nano bạc có thể được tổng hợp bằng nhiều phương pháp khác nhau như vật lý, hóa học, và sinh học. Nano bạc có diện tích bề mặt lớn, khả năng phân tán tốt trong môi trường lỏng, giúp tăng cường diện tích tương tác với các vi sinh vật. Nano bạc còn thể hiện hiệu ứng quang học đặc trưng do hiện tượng cộng hưởng plasmon bề mặt trên các hạt [32]. Về tính chất hóa học, nano bạc có khả năng oxy hóa cao, có thể phản ứng với các chất hữu cơ và vô cơ. Cơ chế hoạt động của nano bạc dựa trên sự tương tác điện hóa mạnh mẽ giữa các ion bạc và thành phần cấu tạo của tế bào vi khuẩn. Ion bạc liên kết và xâm nhập vào tế bào, làm mất hoạt tính sinh học và dẫn đến sự tiêu diệt tế bào vi khuẩn. Nhờ đó, nano bạc được ứng dụng rộng rãi trong y sinh, bảo quản thực phẩm và xử lý môi trường [33].



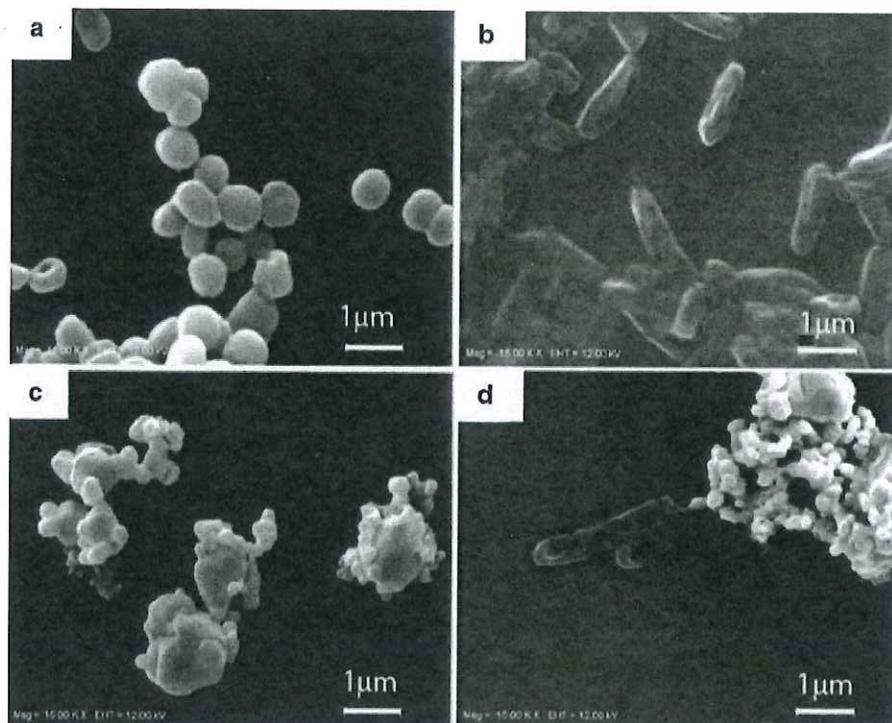
Hình 1.5. Cơ chế diệt khuẩn của các hạt nano bạc [32]

Trong các nghiên cứu trước đây, cơ chế kháng khuẩn của nano bạc đã được lý giải thông qua một số cơ chế sau:

- Tương tác trực tiếp với màng tế bào: Các hạt nano bạc (AgNPs), nhờ vào kích thước nanomet và tỷ lệ diện tích bề mặt trên thể tích cao, thể hiện ái lực mạnh đối với màng tế bào vi khuẩn. Sự tương tác tĩnh điện giữa AgNPs mang điện

tích dương và các thành phần mang điện tích âm trên màng tế bào giúp chúng dễ dàng bám vào bề mặt, dẫn đến phá vỡ màng và hình thành các lỗ thủng. Quá trình này làm tăng tính thấm của màng, gây ra hiện tượng rò rỉ các thành phần nội bào như ion, protein và ATP, từ đó làm rối loạn cân bằng nội môi của tế bào [34]. Thêm vào đó, nano bạc còn làm biến đổi cấu trúc protein trong màng tế bào, khiến màng bị giảm tính ổn định và dễ bị phá vỡ.

- Giải phóng ion bạc và tác động lên các thành phần tế bào: Nano bạc giải phóng các ion bạc vào môi trường xung quanh. Các ion bạc xâm nhập vào tế bào và liên kết với các nhóm chức quan trọng như thiol (-SH, sunphohydrid), cacboxyl, hoặc phosphate của enzyme, làm bất hoạt hoặc giảm chức năng của các enzyme này, gây ức chế quá trình trao đổi chất và tổng hợp năng lượng [32].



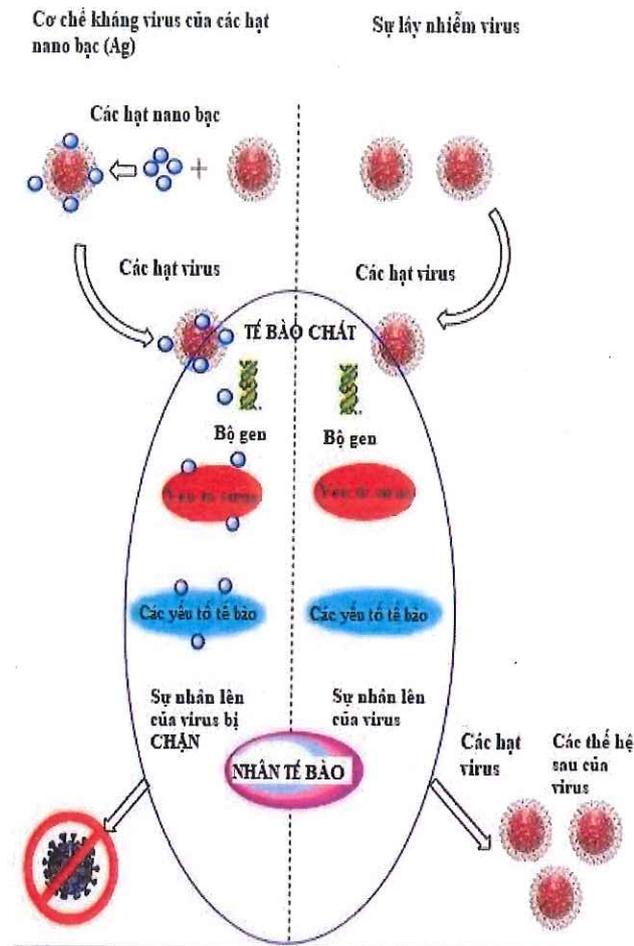
Hình 1.6. Ảnh SEM của một số chủng vi khuẩn sau khi được xử lý bằng nano bạc [35]

a. *Staphylococcus epidermidis*, vi khuẩn Gram dương; b. *Pseudomonas aeruginosa*, Gram âm; c. *S. epidermidis* sau khi được xử lý trong 6h ở 100oC với nano bạc (0,04 mg/mL); d. *P. aeruginosa* được xử lý trong 6h tại 100oC với nano bạc (0,04 mg/mL)

- Tạo các loại oxy phản ứng (Reactive Oxygen Species – ROS): AgNPs thúc đẩy sự hình thành các gốc tự do như superoxide (O_2^-), hydroxyl radical ($\cdot OH$), và

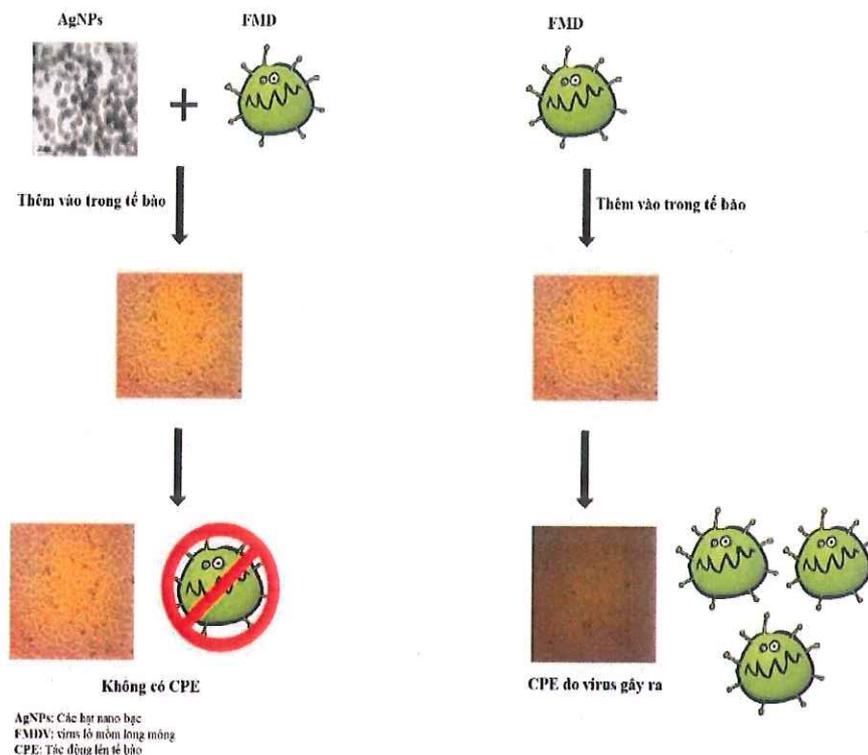
hydrogen peroxide (H_2O_2) trong tế bào vi khuẩn [34]. Những gốc oxy phản ứng này gây stress oxy hóa, làm tổn thương màng tế bào, protein và DNA, từ đó gây chết tế bào. Tế bào bị rối loạn chức năng, dẫn đến chết tế bào thông qua quá trình apoptosis (chết tế bào theo chương trình) hoặc necrosis (chết tế bào do tổn thương).

- Tác động lên vật liệu di truyền (ADN/ARN) : Bên cạnh khả năng phá hủy màng tế bào, nano bạc còn có thể xâm nhập vào bên trong nhân tế bào và tương tác lên phân tử ADN thông qua liên kết với các nhóm photphat trên chuỗi xoắn kép ADN, làm thay đổi cấu trúc không gian của phân tử. Sự biến đổi này ngăn chặn quá trình sao chép và phân chia tế bào [32].
- Ức chế hình thành biofilm : Nano bạc (AgNPs) ức chế quá trình hình thành biofilm của vi khuẩn nhờ khả năng bám vào bề mặt tế bào và làm gián đoạn giai đoạn đầu của sự bám dính – bước thiết yếu trong sinh tổng hợp biofilm. Bên cạnh đó, AgNPs còn phá hủy cấu trúc nền ngoại bào của biofilm (gồm polysaccharide và protein), làm suy yếu khả năng bảo vệ của cộng đồng vi khuẩn. Ngoài ra, có bằng chứng cho thấy nano bạc có thể ảnh hưởng đến hệ thống quorum sensing, làm giảm khả năng điều hòa và phối hợp trong tập thể vi sinh vật, từ đó làm giảm mật độ và độ ổn định của biofilm đã hình thành [36].



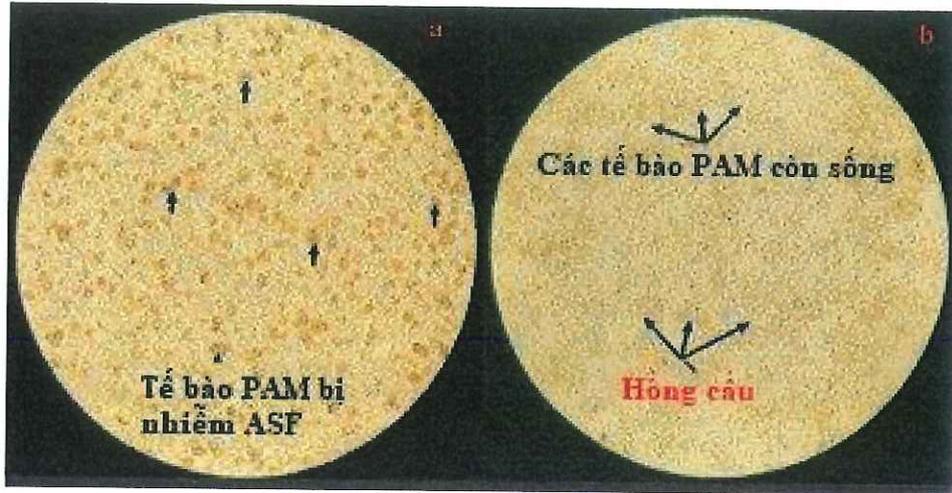
Hình 1. 7. Cơ chế kháng virus của các hạt nano bạc [37]

Ngoài vi khuẩn, nano bạc cũng có hiệu quả kháng virus mạnh mẽ. Cơ chế kháng virus của nano bạc là một trong nghiên cứu được quan tâm của các nhà khoa học, từ đó mở ra triển vọng ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực chất khử trùng. Nano bạc có thể tác động lên virus theo nhiều cách khác nhau, bao gồm: ngăn cản sự gắn kết của virus với tế bào chủ, phá hủy cấu trúc protein của virus, và bất hoạt quá trình sao chép của virus. Đặc biệt, khả năng liên kết đặc hiệu với các protein giàu nhóm sulfhydryl trên bề mặt virus khiến AgNPs trở thành một công cụ tiềm năng để chống lại nhiều chủng virus khác nhau [38]. Thêm vào đó, nano bạc cũng có thể tương tác với protein cấu trúc trên bề mặt của virus ngoại bào để bất hoạt sự lây nhiễm trong giai đoạn đầu. Do đó, AgNPs có thể được ứng dụng trong việc phát triển các loại thuốc kháng virus mới, góp phần vào cuộc chiến chống lại các bệnh truyền nhiễm [39].

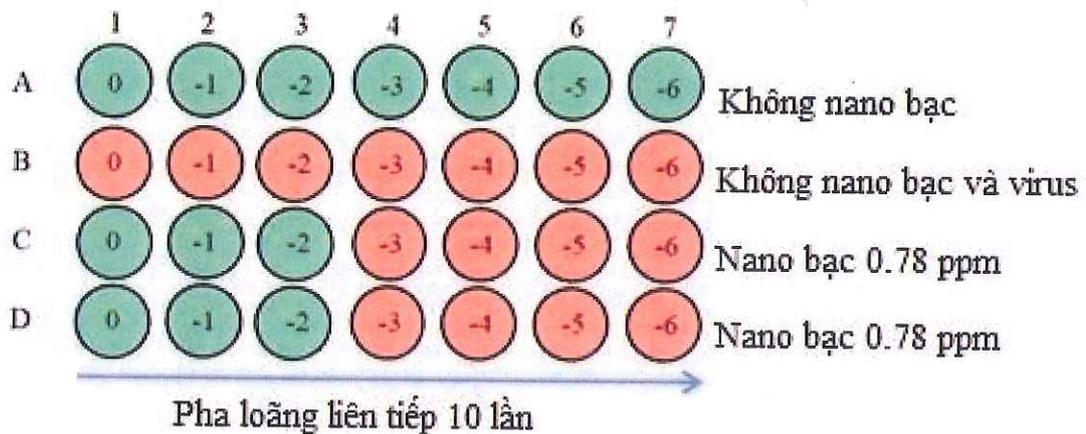


Hình 1. 8. Hiệu quả ngăn chặn virus LMLM của các hạt nano bạc [40]

Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng nano bạc có khả năng bất hoạt một số chủng virus như Tacaribe (ở dơi), Gumboro (ở gà), TGEV, PRRSV và PEDV (ở lợn) [41]. Nghiên cứu của Dung và cộng sự (2020) [42] cho thấy nano bạc có khả năng bất hoạt hoàn toàn virus Dịch tả lợn châu Phi (DTLCP) ở nồng độ 0,78 ppm (Hình 1.9). Đáng chú ý, nano bạc không gây độc cho tế bào ở điều kiện xử lý này (Hình 1.10). Những kết quả này mở ra tiềm năng ứng dụng nano bạc trong phòng và kiểm soát dịch bệnh ở lợn.



Hình 1.9. Hình ảnh tế bào PAM gây nhiễm virus DTLCP không được xử lý (a) và được xử lý (b) với dung dịch AgNP 0,78 ppm trong 1h. Hình ảnh được chụp trên kính hiển vi LED Leica DM IL ở độ phóng đại 200x [42].



Hình 1.10. Sơ đồ bố trí thí nghiệm kháng virus [42].

Mẫu A (virus, không xử lý nano bạc), B (đối chứng, không virus, không AgNP), C và D (virus, xử lý AgNP 0,78 ppm). Cột 1-7: pha loãng 10 lần liên tiếp virus đồng nhất ở mức 10^6 HAD₅₀ (số trong vòng tròn: log pha loãng). Vòng tròn xanh: phát hiện virus sống; vòng tròn đỏ: không phát hiện virus sống [42].

1.3.2. Tổng quan về chitosan

Chitosan là một polysaccharide tự nhiên, được tạo thành từ quá trình deacetyl hóa chitin - hợp chất chủ yếu có trong vỏ của các loài giáp xác như tôm, cua và một số côn trùng. Nhờ đặc tính không gây độc hại, có khả năng phân hủy sinh học và tương thích sinh học cao, chitosan đã được ứng dụng rộng

rãi trong y học, như làm vật liệu băng vết thương, thiết bị y tế và hệ vận chuyển thuốc [43].

Ngoài ra, chitosan còn được sử dụng như một tác nhân ổn định hiệu quả trong quá trình tổng hợp nano bạc (AgNPs). Nhờ đó, các hạt nano tạo ra có độc tính thấp hơn, độ tương thích sinh học cao hơn và chi phí sản xuất hợp lý hơn [44]. Hiệu quả kháng khuẩn mạnh mẽ của hệ nano bạc ổn định bằng chitosan đã chứng minh qua nhiều nghiên cứu, và được ứng dụng thành công trong các thiết bị y tế như ống thông và băng vết thương [45].

AgNPs ổn định bằng chitosan có khả năng ức chế sự nhân lên của virus *Dengue* – tác nhân gây bệnh sốt xuất huyết, với hiệu quả lên đến 96% trong điều kiện in - vitro. Hệ nano này còn cho thấy khả năng diệt muỗi, bao gồm cả giai đoạn ấu trùng và trưởng thành của các loài như *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* và *Culex quinquefasciatus* [46].

Từ những kết quả trên, có thể thấy rằng hệ nano bạc sử dụng chitosan làm chất ổn định rất tiềm năng. Nó không chỉ kiểm soát được vật trung gian truyền bệnh mà còn ức chế hiệu quả sự phát triển của virus, góp phần giảm nguy cơ bùng phát dịch bệnh.

1.3.3. Tổng quan về axit peraxetic

Axit peraxetic (PAA) là một chất oxy hóa mạnh, được ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực như y tế, công nghiệp thực phẩm và xử lý nước nhờ khả năng diệt khuẩn và bất hoạt virus hiệu quả. PAA được tổng hợp từ phản ứng hai chiều giữa axit axetic (CH_3COOH) và hydro peroxit (H_2O_2) với sự xúc tác của axit sulfuric. Thông thường, các dung dịch PAA được ổn định trong môi trường chứa axit axetic, H_2O_2 và nước [47]. PAA không dễ bị phân hủy bởi peroxidase như clo và H_2O_2 , nhờ đó duy trì được hoạt tính kháng khuẩn ngay cả khi có mặt chất hữu cơ hoặc thực phẩm [48]. Bên cạnh đó, PAA cũng được cho là ổn định hơn so với chất khử trùng khác khi tiếp xúc với nhiệt độ và pH khác nhau. Tuy nhiên, một số nghiên cứu cho thấy PAA ở nồng độ thấp có xu hướng phân hủy nhanh hơn trong môi trường nước, đặc biệt khi điều kiện nhiệt độ và độ pH không được kiểm soát chặt chẽ [49].

Hoạt tính kháng khuẩn của PAA dựa trên sự giải phóng oxy hoạt tính, làm oxy hóa các liên kết sulfuhydryl, sulfur trong protein, enzyme và các chất chuyển hóa khác, phá vỡ liên kết với chức năng hóa học của màng lipoprotein, dẫn đến sự phá hủy màng tế bào của vi khuẩn [50]. Vì vậy, PAA thường được sử dụng trong ngành công nghiệp đồ uống và thực phẩm, các bệnh viện, cơ sở chăm sóc sức khỏe và dược phẩm như một tác nhân kháng khuẩn, chất tẩy rửa bề mặt và chất khử trùng [48].

Một số nghiên cứu cho thấy PAA có hiệu quả kháng khuẩn vượt trội hơn so với hydro peroxit [47]. PAA cũng được đánh giá là có hiệu quả tương đương, thậm chí là vượt trội so với các chất khử trùng khác như sodium hypochlorite (NaOCl) và chlorhexidine trong việc diệt khuẩn trong quá trình điều trị tủy răng [51]. Đặc biệt, PAA được chứng minh có khả năng loại bỏ màng sinh học hỗn hợp trên mô răng một cách đáng kể [51]. Ngoài ra, PAA cũng được đánh giá cao trong việc khử trùng nước thải, với nhiều thử nghiệm đã được tiến hành ở Châu Âu và Bắc Mỹ để thay thế clo trong quá trình này [52].

PAA được công nhận là chất khử trùng hóa học có phổ diệt khuẩn rộng, thời gian tiếp xúc ngắn và các sản phẩm phân hủy không gây độc hại, được Trung tâm Kiểm soát Dịch bệnh Hoa Kỳ ứng dụng trong xử lý thiết bị y tế, và PAA cũng được Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) và Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ - Dịch vụ kiểm tra và an toàn thực phẩm (USDA-FSIS) chấp nhận là tác nhân kháng khuẩn an toàn (GRAS) với nồng độ 0,0005 đến 0,2% [53].

Từ đây có thể thấy được, PAA là chất khử trùng, tác nhân kháng khuẩn an toàn, có phổ diệt khuẩn rộng và có hiệu quả trên nhiều loại vi sinh vật khác nhau.

1.3.3. Các nghiên cứu về sự kết hợp giữa axit peraxetic và nano bạc

Nano bạc đã được chứng minh là chất kháng khuẩn có phổ diệt khuẩn rộng, hoạt tính cao đối với nhiều chủng vi khuẩn, nấm và virus, an toàn cho con người và vật nuôi. Nano bạc cũng đã được ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực như môi trường, y tế, công nghiệp và nông nghiệp. Tuy nhiên, nano bạc chưa thực sự được sử dụng nhiều trong việc xử lý môi trường ngành chăn nuôi vì giá thành cao.

PAA có giá thành thấp, khả năng phân tán trong môi trường nhanh, có hiệu quả trong việc kháng các vi sinh vật nên được sử dụng phổ biến trong chế biến thực phẩm, vệ sinh môi trường, cũng như trong ngành thú y. Đặc biệt, PAA có khả năng phân hủy thành CO_2 và H_2O , nên có tính an toàn cho sức khỏe con người, động vật, và môi trường. Mặc dù vậy, PAA vẫn có điểm hạn chế là mùi dung dịch khá nồng cay, gây khó chịu cho người sử dụng. Khi pha loãng, tính ổn định không cao, nồng độ của PAA dễ bị giảm hơn các chất khử trùng khác, dễ bay hơi ngoài môi trường không khí nên khó kéo dài hiệu quả kháng khuẩn.

Hiện nay, mặc dù chưa có nhiều công bố khi kết hợp nano bạc và PAA, nhưng đã có một số nghiên cứu về sự tương tác giữa PAA và các kim loại chuyển tiếp trong đó có bạc, sản phẩm tạo ra có khả năng khử trùng mạnh. Kim loại chuyển tiếp có thể bao gồm Fe(III), Co (I), Cu(II) và Ag(I). Trong đó, sự kết hợp giữa Ag(I) và PAA đã được chứng minh có khả năng tăng cường hiệu lực diệt khuẩn so với từng thành phần đơn lẻ [54]. Mặc dù cơ chế chính xác của tương tác này vẫn đang được nghiên cứu, nhưng một số giả thuyết cho rằng PAA có thể làm suy yếu cấu trúc màng tế bào vi sinh vật, qua đó tạo điều kiện để ion Ag(I) xâm nhập và phát huy hiệu quả kháng khuẩn, [54].

Trong nghiên cứu của de Velásquez và cộng sự, họ đã tiến hành nghiên cứu sự tác động của việc kết hợp sử dụng đồng thời cả bạc nitrat (AgNO_3) và PAA trong việc xử lý nước thải để có thể tái sử dụng trong việc tưới cây [55]. Nghiên cứu đã cho thấy việc sử dụng kết hợp bạc và PAA đã mang lại tác động hiệp đồng đặc biệt, dẫn đến hoạt tính kháng khuẩn cao hơn đáng kể so với việc chỉ sử dụng PAA một mình. Trong các nghiên cứu trước đó của Lalueza và cộng sự năm 2012, đã chứng minh được tác động hiệp đồng tồn tại với zeolite trao đổi bạc và đã được nạp PAA. Tác giả đã giải thích rằng PAA gây ra sự tách rời của mạng lưới ma trận exopolysaccharide để tạo nên màng sinh học, làm cho các vi khuẩn và vi sinh vật bị cô lập trong khi vẫn được tiếp xúc với cation bạc (Ag^+) đã được giải phóng [56]. Tuy nhiên trong nghiên cứu mới của nhóm, PAA không chỉ đóng vai trò trong việc tăng diện tích bề mặt để vi khuẩn có thể tiếp xúc với các ion bạc có trong môi trường, mà còn giúp thúc đẩy quá trình giải phóng các ion bạc Ag^+ . Theo nghiên cứu của Carmona và cộng sự

(2012), trong quá trình nạp PAA lên vật liệu chứa Ag, lượng bạc trong sản phẩm có thể giảm đến khoảng 40% dưới tác động của sự oxy hóa, nhưng hoạt tính kháng khuẩn vẫn được cải thiện rõ rệt, nhờ tác động hiệp đồng giữa Ag và PAA khi cùng có mặt trong cấu trúc mao quản của vật liệu SBA-1543 [57].

Như vậy, khi cả bạc –Ag và PAA cùng có mặt trong dung dịch hoặc vật liệu, hiệu ứng hiệp đồng có thể xảy ra, giúp tăng khả năng kháng khuẩn của sản phẩm, mặc dù PAA là một trong những nguyên nhân gây nên sự giảm lượng bạc do bạc bị oxy hóa. Để có thể tăng khả năng kháng khuẩn lên mà lại giảm được lượng bạc có thể thải ra môi trường, thay vì sử dụng muối bạc, có thể sử dụng nano bạc. Khi kết hợp nano bạc với axit peraxetic có thể tạo nên một phức hệ nano có kỳ vọng là một chất kháng khuẩn có phổ diệt vi khuẩn, virus rộng. Không chỉ vậy phức hệ nano này có thể làm giảm lượng bạc được thải ra môi trường và dễ phân hủy sinh học trong môi trường hơn. Tuy vậy, trong những năm gần đây, hầu như chưa có công bố nào liên quan đến việc kết hợp giữa axit peraxetic và nano bạc tạo nên một phức hệ nano và áp dụng chúng trong môi trường chăn nuôi.

Đề tài: ***“Nghiên cứu chế tạo phức hệ nano (axit peraxetic và nano bạc) và đánh giá khả năng diệt khuẩn và virus trong môi trường không khí chuồng trại chăn nuôi”*** là đề tài đầu tiên nghiên cứu chế tạo và đánh giá tính hiệu quả diệt khuẩn và diệt virus của phức hệ nano này với những chủng vi sinh vật gây bệnh cho lợn như vi khuẩn *Encherichia coli* (*E. coli*) và *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) và virus Dịch tả lợn Châu Phi (ASFV).

CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Cách tiếp cận

Nano bạc được biết đến là một chất diệt khuẩn mạnh mẽ, có khả năng tiêu diệt nhiều loại vi sinh vật như vi khuẩn, nấm và virus. Chất này được sử dụng rộng rãi trong môi trường, công nghiệp, y tế và nông nghiệp. Tuy nhiên, việc sử dụng nano bạc cũng dẫn đến tăng lượng bạc trong môi trường, gây ô nhiễm kim loại nặng và chi phí cao.

Axit peracetic (PAA) là một chất sát khuẩn được sử dụng trong thực phẩm và vệ sinh môi trường. PAA có giá thành thấp, tác động nhanh và khả năng diệt khuẩn rộng. Tuy nhiên, PAA không bền, có thể bay hơi nhanh, mùi khá mạnh và khi pha loãng sẽ giảm hiệu quả.

Để khắc phục những hạn chế của cả hai chất trên, phức hệ nano đã được phát triển. Phức hệ này có sự kết hợp giữa axit peracetic và nano bạc, với tác dụng hiệp đồng của các thành phần trong phức hệ mà hiệu quả diệt khuẩn được tăng lên gấp bội với thời gian kháng khuẩn kéo dài, đồng thời phức hệ nano an toàn hơn cho môi trường, vật nuôi và con người.

Nghiên cứu này tập trung vào việc chế tạo phức hệ nano và đánh giá hiệu quả diệt khuẩn và virus của phức hệ nano so với dung dịch nano bạc.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

- Axit peraxetic và nano bạc được chế tạo tại phòng thí nghiệm của Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ màng, Viện Khoa học công nghệ Năng lượng và Môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
- Chủng vi khuẩn chuẩn *Escherichia coli* (*E. coli*) WDCM 00012 VT000127 và chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) WDCM 00034 VT000346 được cung cấp bởi Sigma Aldrich.
- Chủng virus tả lợn Châu Phi (African swine fever virus – ASFV) (VNUA/rASFV/VP1/2023) sống được thu thập từ bệnh phẩm và phân lập tại phòng thí nghiệm thuộc Trung tâm nghiên cứu xuất sắc và đổi mới sáng tạo, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

2.3. Hóa chất, thiết bị và dụng cụ thí nghiệm

2.3.1. Hóa chất và sinh phẩm

Các hóa chất sử dụng cho chế tạo phức hệ nano, đánh giá hiệu quả diệt khuẩn và bất hoạt virus gồm

- Muối bạc (AgNO_3 , độ tinh khiết >99%), natri borohydrit (NaBH_4 , tinh khiết 99%) đều được cung cấp bởi hãng Merck (Đức).
- Chitosan có trọng lượng phân tử dao động từ 50.000 đến 190.000 Da (theo độ nhớt), được mua từ Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Đức).
- Axit axetic (>99,5%), hydro peroxit (H_2O_2 30%) và axit sulfuric (H_2SO_4 >98%) được nhập từ Xilong (Trung Quốc).
- Môi trường nuôi cấy vi sinh vật được sử dụng là PCA (Plate Count Agar), cũng do Sigma-Aldrich Chemie GmbH cung cấp.
- Môi trường RPMI 1640, dung dịch đệm phosphat (PBS) và môi trường DMEM – tất cả đều được cung cấp bởi hãng Gibco, Thermo Fisher Scientific (Mỹ).
- Thuốc nhuộm crystal violet dùng trong bước nhuộm và quan sát tế bào được nhập từ hãng Xilong (Trung Quốc).
- *Escherichia coli* (*E. coli*) WDCM 00012 VT000127 và chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) WDCM 00034 VT000346 được cung cấp bởi Sigma Aldrich.
- Virus tả lợn Châu Phi (*African swine fever virus* – ASFV) (VNUA/rASFV/VP1/2023) sống được thu thập từ bệnh phẩm tại trang trại ở tỉnh Vĩnh Phúc [58], và phân lập tại phòng thí nghiệm thuộc Trung tâm nghiên cứu xuất sắc và đổi mới sáng tạo, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.3.2. Trang thiết bị

- Thiết bị đo quang phổ khả kiến (UV-Vis / Hitachi UH5300);
- Tủ hấp tiệt trùng (Jibimed LS-100HD);
- Tủ cấy an toàn sinh học cấp 2 (Haier HR40-IIA2);
- Tủ môi trường (SPX-150B);
- Cân phân tích (± 0.0001 mg);
- Thiết bị cất nước (Bibby-Stuart, W4000).
- Thiết bị khuấy gia nhiệt

- Thiết bị ổn nhiệt.
- Tủ ẩm CO₂;
- Kính hiển vi soi ngược ;
- Máy lắc Vortex ;
- Máy ly tâm lạnh đa năng.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phương pháp chế tạo phức hệ nano

a) Nghiên cứu chế tạo nano bạc

Điều chế nano bạc bằng phương pháp khử hoá học muối bạc nitrat bằng natri borohydrid với các chất phân tán, chất ổn định để thu được dung dịch nano bạc nồng độ từ 500 ppm và có kích thước hạt nano bạc nằm trong khoảng 5nm-50nm.

Dung dịch muối bạc chứa 2,36 g/L ion Ag⁺ được hoà tan trong dung dịch chất ổn định chứa chitosan với tỉ lệ chitosan : ion bạc là 1:1 (khối lượng:khối lượng). Dung dịch chất khử chứa natri borhydriect (NaBH₄) để khử muối bạc về trạng thái nano, được đưa vào từ từ bằng phương pháp nhỏ giọt và khuấy mãnh liệt với tốc độ khuấy 1800 vòng/phút, trong đó tỉ lệ NaBH₄ : muối bạc là 1:2 (mol:mol). Tiếp tục khuấy thêm 10 phút, thu được dung dịch nano bạc 500 ppm có kích thước hạt nano bạc trung bình từ 5 – 50 nm.

b) Nghiên cứu chế tạo phức hệ nano - SCP

Hòa dung dịch CH₃COOH 9% và H₂O₂ 3% theo tỉ lệ thể tích dung dịch CH₃COOH :H₂O₂ là 2 :1, có mặt xúc tác H₂SO₄ và trộn đều trong bể ổn nhiệt, ở nhiệt độ 55°C trong 15 phút với tốc độ lắc 250 vòng/phút, qua đó thu được dung dịch axit peraxetic. Phương trình phản ứng (1) :



Trộn từ từ dung dịch nano bạc thu được có nồng độ là 500 ppm và dung dịch axit peraxetic theo tỷ lệ thể tích dung dịch giữa nano bạc và PAA là 1:4 trong tổng thể tích là 1L.

Khuấy trộn liên tục trong khoảng thời gian từ 10 – 15 phút, tiếp tục để phản ứng xảy ra trong điều kiện tĩnh trong 12 giờ để PAA bao gói toàn bộ bề mặt nano bạc. Ổn định sản phẩm trong môi trường tránh ánh sáng 24 giờ và thu được chế phẩm diệt vi khuẩn và virus chứa phức hệ nano bạc và axit peraxetic được đặt tên là phức hệ SCP.

Phức hệ SCP gốc thu được chứa các thành phần hoạt chất như sau: Axit peraxetic (PAA) 17,9% và nano bạc 100 ppm.

2.4.2. Phương pháp xác định đặc trưng tính chất của phức hệ nano

- Cấu trúc, hình thái của phức hệ nano được xác định thông qua phương pháp kính hiển vi điện tử (SEM) được thực hiện bằng Hitachi S-4800 và kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) thực hiện bằng FEI Tecnai G2 ở điện áp gia tốc 200kV.
- Cấu trúc tinh thể của phức hệ nano được xác định bằng phương pháp phân tích quang phổ nhiễu xạ tia X (XRD) thông qua thiết bị D8 Advance Eco.
- Tính chất của phức hệ nano được xác định thông qua phương pháp quang phổ cộng hưởng plasmon (UV-Vis) được thu thập trên máy quang phổ UV-Vis Hitachi UH5300.
- Xác định được tiềm năng oxi hóa hoặc khử của phức hệ nano thông qua điện thế oxi hóa khử (ORP) đo trên thiết bị Hanna HI991002.

2.4.3. Phương pháp đánh giá khả năng diệt khuẩn của phức hệ nano với 2 chủng vi khuẩn *E. coli* và *S. aureus*

Thử nghiệm đánh giá trên các chủng vi khuẩn chuẩn *E. coli* và *Staphylococcus aureus* đều được tiến hành tại Phòng thí nghiệm thuộc Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển công nghệ màng, Viện Khoa học công nghệ Năng lượng và Môi trường.

Phức hệ nano được pha loãng nồng độ từ 2^{-1} đến 2^{-10} . Trong ống nghiệm vô trùng, ủ 9,0 mL dung dịch phức hệ nano pha loãng với mỗi 0,1 mL dung dịch chứa vi khuẩn, *E. coli* mật độ $5,85 \times 10^7$ CFU/mL, *S. aureus* có mật độ vi khuẩn là 1×10^7 CFU/mL trong 1 giờ ủ ở nhiệt độ phòng.

Mẫu đối chứng tiến hành tương tự, thay dung dịch phức hệ nano bằng nước cất vô trùng. Tiếp theo, lấy 1 mL hỗn hợp (vi khuẩn và phức hệ nano) đã được ủ vào đĩa peptri, với số lần lặp lại thí nghiệm là 3 lần. Đổ môi trường MPA đã được hấp khử trùng vào từng đĩa peptri. Lắc đều và tiếp tục ủ ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ.

Kiểm tra khả năng diệt khuẩn của phức hệ nano so với đĩa thạch chuẩn xem mỗi nồng độ pha loãng của phức hệ nano tương ứng với nồng độ nào của vi khuẩn.

Nếu không thấy sự xuất hiện của khuẩn lạc vi khuẩn thì kết luận: Phức hệ nano ở nồng độ đó, sau thời gian tiếp xúc 1 giờ đã diệt khuẩn hoàn toàn.

Kết quả: Số lượng vi khuẩn trong mẫu được tính theo phương trình (2) sau [42]:

$$N = \frac{C}{V(n_1 + 0,1n_2)d} \quad (2)$$

Trong đó:

N – Tổng số vi khuẩn trong một mL (CFU/mL); **C** – Tổng số khuẩn lạc đếm được trên các đĩa thạch của hai độ pha loãng liên tiếp; **V** – Thể tích mẫu được thêm vào trong các đĩa; **n₁, n₂** – Số đĩa tương ứng với độ pha loãng đĩa thứ nhất và thứ hai; và **d** – Hệ số pha loãng của độ pha loãng thứ nhất

2.4.4. Đánh giá tính hiệp đồng của các thành phần trong phức hệ SCP bằng phương pháp thử Checkerboard

Để đánh giá sự tương tác giữa hai thành phần chính của phức hệ SCP là axit peracetic (PAA) và nano bạc (AgNP), nghiên cứu áp dụng phương pháp Checkerboard, dựa trên xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và tính toán chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn (FICI) [43, 59].

Xác định MIC của từng chất trong phức hệ SCP

MIC của từng thành phần riêng lẻ (PAA, AgNP) và MIC của phức hệ nano được xác định bằng phương pháp pha loãng trên các đĩa 96 giếng trong môi trường nuôi cấy MPA. Các nồng độ khảo sát của axit peraxetic từ 0,0035% đến 0,56%; nồng độ nano bạc từ 0,02 ppm đến 3,13 ppm. Mỗi đĩa được bổ sung dịch

huyền phù vi khuẩn (*E. coli*, *S. aureus*) có mật độ 10^7 CFU/mL và ủ các đĩa ở 37°C trong 24 giờ. MIC được xác định là nồng độ thấp nhất không quan sát thấy sự phát triển của vi khuẩn.

Phương pháp thử Checkerboard

Dựa trên kết quả MIC, có thể tính được chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn (FICI) theo công thức dưới đây:

$$FIC_{PAA} = \frac{MIC_{phức\ hệ\ nano}}{MIC_{PAA}} \quad (1) \quad FIC_{AgNP} = \frac{MIC_{phức\ hệ\ nano}}{MIC_{AgNP}} \quad (2)$$

$$FIC_{tổng} = FIC_{PAA} + FIC_{AgNP} \quad (3)$$

Giá trị FIC tổng được sử dụng để xác định sự tương tác giữa axit peraxetic và nano bạc trong phức hệ nano:

$FICI \leq 0,5$: tương tác hiệp đồng;

$0,5 < FICI \leq 1,0$: tương tác cộng gộp;

$1,0 < FICI \leq 2,0$: không có tương tác (độc lập);

$FICI > 2,0$: tác động đối kháng.

Kết quả thử nghiệm được trình bày dưới dạng giá trị trung bình từ các phép thử lặp lại.

2.5.4. Phương pháp thử nghiệm đánh giá khả năng ức chế virus Dịch tả lợn Châu Phi (ASFV) của phức hệ nano



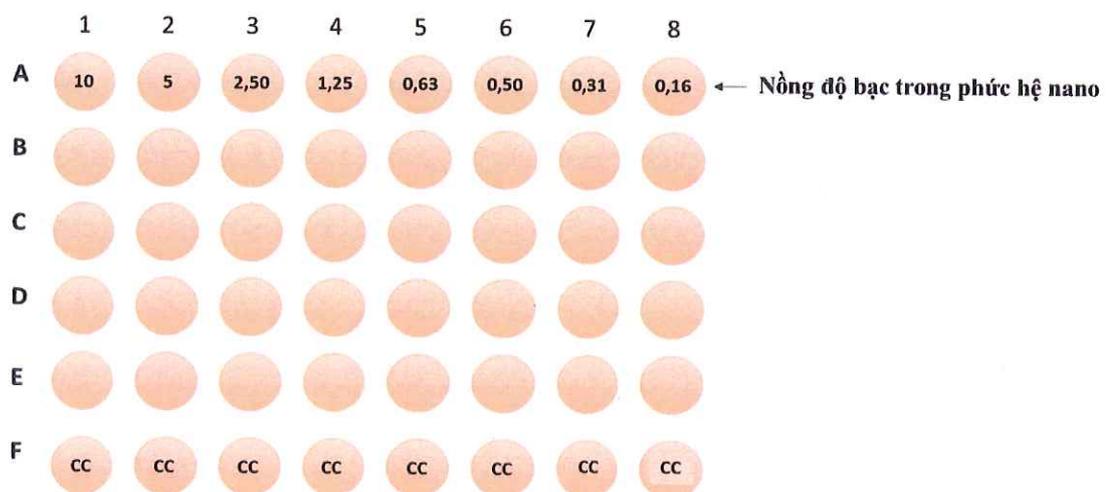
Hình 2. 1. Sơ đồ quá trình thực hiện nghiên cứu đánh giá hiệu quả trên virus DTLCF của phức hệ nano

Tất cả các thử nghiệm với virus DTLCP sống đều được tiến hành tại Phòng thí nghiệm thuộc Trung tâm nghiên cứu xuất sắc và Đổi mới sáng tạo của Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Virus được tiến hành phân lập và nuôi cấy được thực hiện theo TCVN 8400-42:2019. Nghiên cứu này tuân thủ các nguyên tắc ARRIVE và được thực hiện nghiêm ngặt theo Đạo luật Động vật (thủ tục khoa học) của Vương quốc Anh năm 1986 cùng các hướng dẫn liên quan, cũng như Chỉ thị EU 2010/63/EU về thí nghiệm trên động vật [60].

Thử nghiệm đánh giá hiệu quả của chất khử trùng trên virus DTLCP được tiến hành trên chủng virus dòng VNUA/rASFV/VP1/2023 [58] với hiệu giá $10^4 \text{HAD}_{50}/\text{mL}$.

b) Đánh giá độc tính tế bào của phức hệ nano trên dòng tế bào PAM

Độc tính tế bào của phức hệ nano được xác định bằng cách pha loãng dung dịch từ 1/10 đến 1/640, và xử lý tế bào PAM trong 1 giờ ở 37°C , 5% CO_2 . Các giếng đối chứng không có phức hệ nano được chuẩn bị tương tự. Tế bào sống sót được xác định dựa trên hình thái bình thường dưới kính hiển vi [61].



Hình 2. 2. Sơ đồ biểu diễn bố trí thử nghiệm kiểm tra độc tính của phức hệ nano với tế bào PAM

Tế bào sống sót sau khi xử lý với phức hệ nano được đếm và tính tỷ lệ tế bào sống theo công thức :

$$\text{Tỷ lệ tế bào sống} = \frac{\text{Trung bình số tế bào sống trong một giếng tại nồng độ}}{\text{Trung bình tế bào sống trong một giếng tại đối chứng tế bào}} \times 100\% \quad (3)$$

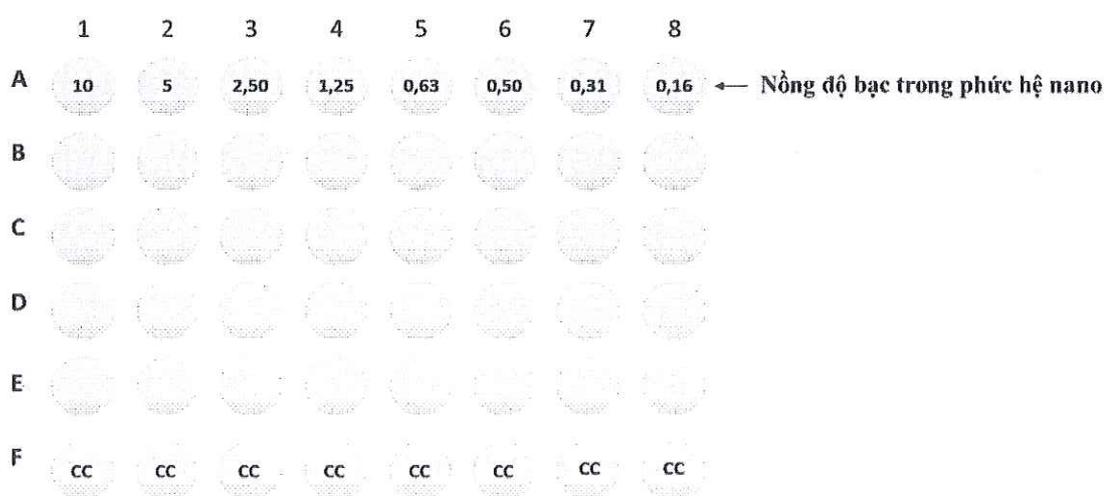
Các tế bào chết và sống được xác định thông qua sự biến đổi hình thái

Tất cả các thử nghiệm với virus DTLCP sống đều được tiến hành tại Phòng thí nghiệm thuộc Trung tâm nghiên cứu xuất sắc và Đổi mới sáng tạo của Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Virus được tiến hành phân lập và nuôi cấy được thực hiện theo TCVN 8400-42:2019. Nghiên cứu này tuân thủ các nguyên tắc ARRIVE và được thực hiện nghiêm ngặt theo Đạo luật Động vật (thủ tục khoa học) của Vương quốc Anh năm 1986 cùng các hướng dẫn liên quan, cũng như Chỉ thị EU 2010/63/EU về thí nghiệm trên động vật [60].

Thử nghiệm đánh giá hiệu quả của chất khử trùng trên virus DTLCP được tiến hành trên chủng virus dòng VNUA/rASFV/VP1/2023 [58] với hiệu giá $10^4\text{HAD}_{50}/\text{mL}$.

b) Đánh giá độc tính tế bào của phức hệ nano trên dòng tế bào PAM

Độc tính tế bào của phức hệ nano được xác định bằng cách pha loãng dung dịch từ 1/10 đến 1/640, và xử lý tế bào PAM trong 1 giờ ở 37°C , 5% CO_2 . Các giếng đối chứng không có phức hệ nano được chuẩn bị tương tự. Tế bào sống sót được xác định dựa trên hình thái bình thường dưới kính hiển vi [61].



Hình 2. 2. Sơ đồ biểu diễn bố trí thử nghiệm kiểm tra độc tính của phức hệ nano với tế bào PAM

Tế bào sống sót sau khi xử lý với phức hệ nano được đếm và tính tỷ lệ tế bào sống theo công thức :

$$\text{Tỷ lệ tế bào sống} = \frac{\text{Trung bình số tế bào sống trong một giếng tại nồng độ}}{\text{Trung bình số tế bào sống trong một giếng tại đối chứng tế bào}} \times 100\% \quad (3)$$

Các tế bào chết và sống được xác định thông qua sự biến đổi hình thái

của chúng sau khi được ủ với dung dịch kháng khuẩn. Tế bào sống sẽ được quan sát thấy ở dạng hình cầu giống với mẫu đối chứng, trong khi những tế bào chết thường bị thu nhỏ lại, không còn hình cầu hoặc bị chia nhỏ.

Để đánh giá được nồng độ an toàn của phức hệ nano, cần tiến hành thêm phương pháp nhuộm tế bào Crystal Violet (CV). Nhuộm CV là xét nghiệm nhanh chóng và linh hoạt để sàng lọc khả năng sống của tế bào trong các điều kiện kích thích hoặc ức chế khác nhau. Quy trình nhuộm được thực hiện như sau:

Sau hai ngày ủ, loại bỏ môi trường nuôi cấy từ các đĩa tế bào và rửa mỗi giếng một lần bằng 100 μL dung dịch đệm PBS 1X. Thêm 50 μL thuốc nhuộm Crystal Violet vào mỗi giếng và ủ trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, loại bỏ thuốc nhuộm và rửa đĩa tế bào dưới nước máy cho đến khi nước rửa trở nên trong. Trong quá trình rửa, để nước chảy từ cạnh đĩa nhằm tránh xả trực tiếp lên bề mặt tế bào, ngăn ngừa làm bong tế bào. Cuối cùng, loại bỏ nước rửa, để khô đĩa và quan sát được hình thái tế bào trên đĩa nuôi cấy.

c) Đánh giá hiệu quả bất hoạt virus DTLCP của phức hệ nano

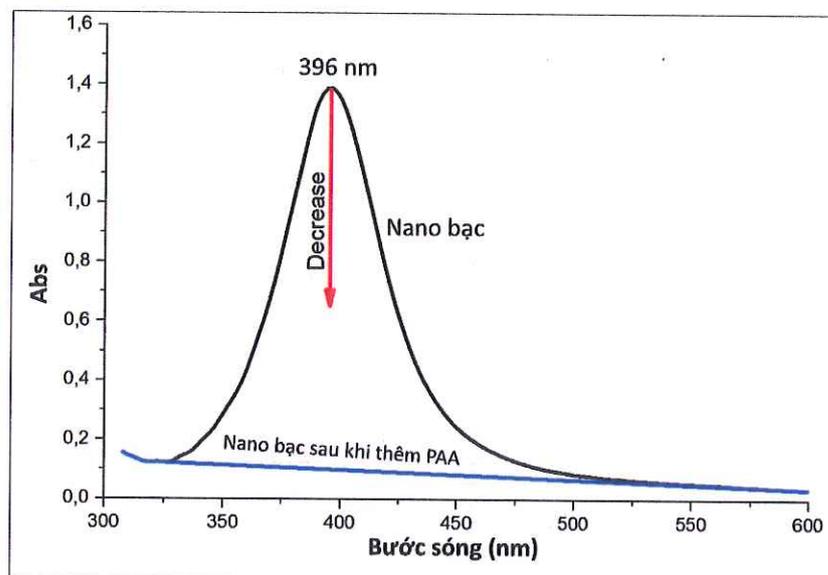
Sau khi chọn nồng độ an toàn cao nhất, phức hệ nano được trộn với dịch virus DTLCP ở hiệu giá 10^4 HAD₅₀/mL theo tỷ lệ 1:1 và ủ ở nhiệt độ phòng trong thời gian ủ khác nhau (30, 60 và 120 phút). Hỗn hợp trên được pha loãng và thêm vào giếng tế bào (100 μL /giếng), các mẫu đối chứng âm không chứa virus, đối chứng dương không chứa phức hệ nano.

Đĩa tế bào được ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 1 giờ, sau đó loại bỏ môi trường ủ và thay bằng 200 μL môi trường DMEM mới. Sau 48 giờ nuôi cấy, bổ sung 20 μL hồng cầu 1% (pRBC) được chuẩn bị trong môi trường RPMI. Khả năng bất hoạt virus được đánh giá bằng tỷ lệ tế bào sống sót (không CPE) so với nhóm đối chứng nhiễm virus [61].

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá đặc tính của phức hệ nano

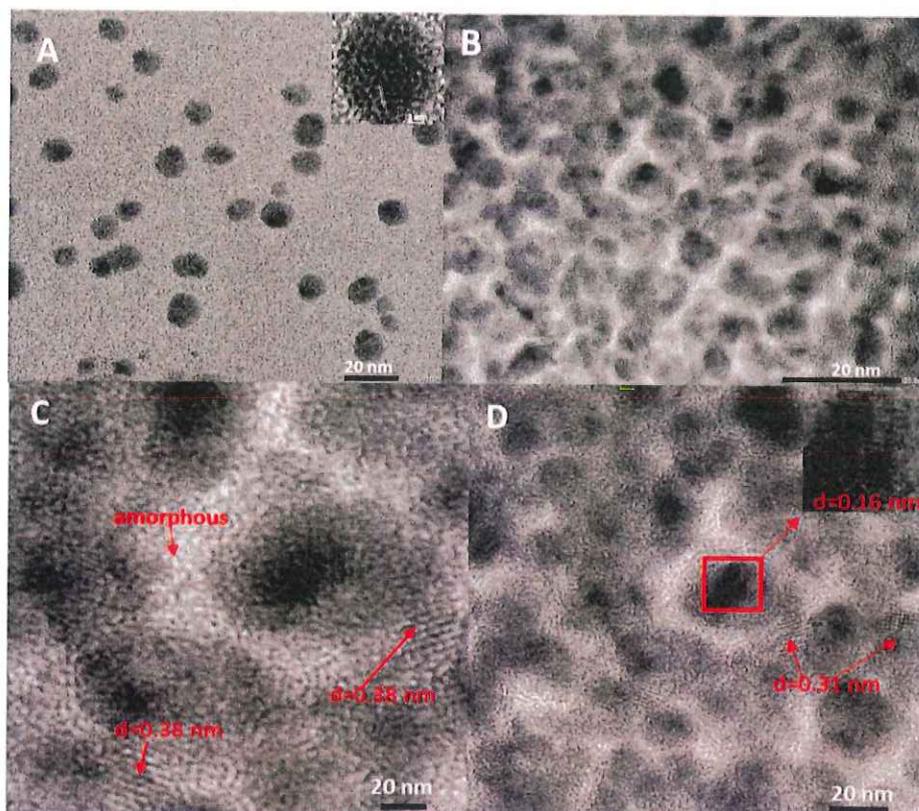
Nano bạc đã được tổng hợp thành công bằng phương pháp dung dịch nước, sử dụng chitosan là chất ổn định, với sự xuất hiện của đỉnh hấp thụ plasmon bề mặt tại bước sóng 396 nm (Hình 3.1), xác nhận sự hình thành của các hạt bạc có kích thước nano như các nghiên cứu trước đây [62]. Hình ảnh TEM thu được các hạt nano bạc có dạng hình cầu với kích thước trung bình khoảng 15 nm, và có thể quan sát thấy khoảng cách d là 0,24 nm (Hình 3.2A), tương ứng với mặt phẳng (111) của bạc phù hợp với phổ nhiễu xạ tia X (XRD) [63, 64].



Hình 3. 1. Phổ cộng hưởng plasmon bề mặt của nano bạc và phức hệ nano

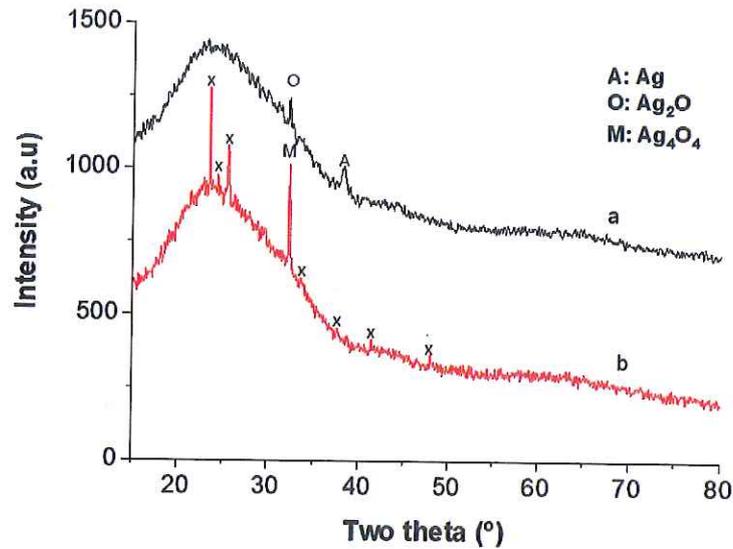
Khi nano bạc kết hợp với axit peraxetic hình thành phức hệ nano, sự thay đổi rõ rệt về màu sắc từ vàng sang trong suốt phản ánh quá trình phản ứng mạnh mẽ giữa nano bạc và PAA. Phổ hấp thụ plasmon bề mặt với sự biến mất của đỉnh tại bước sóng 396 nm, đồng thời xuất hiện các đỉnh hấp thụ mới tại bước sóng từ 200 – 300 nm (Hình 3.1), thể hiện sự hình thành của các hợp chất bạc oxy hóa như Ag_2O , AgO . Hiện tượng này có thể giải thích do tính oxy hóa mạnh của PAA, gây ra sự biến đổi bạc kim loại thành các ion bạc ở trạng thái oxy hóa cao hơn [65, 66]. Kết quả trên phù hợp với nghiên cứu của Meng và cộng sự, sự thay đổi phổ hấp thụ của nano bạc khi bị oxy hóa đã được chứng

minh là dấu hiệu đặc trưng của quá trình biến đổi hóa học của vật liệu nano [67].



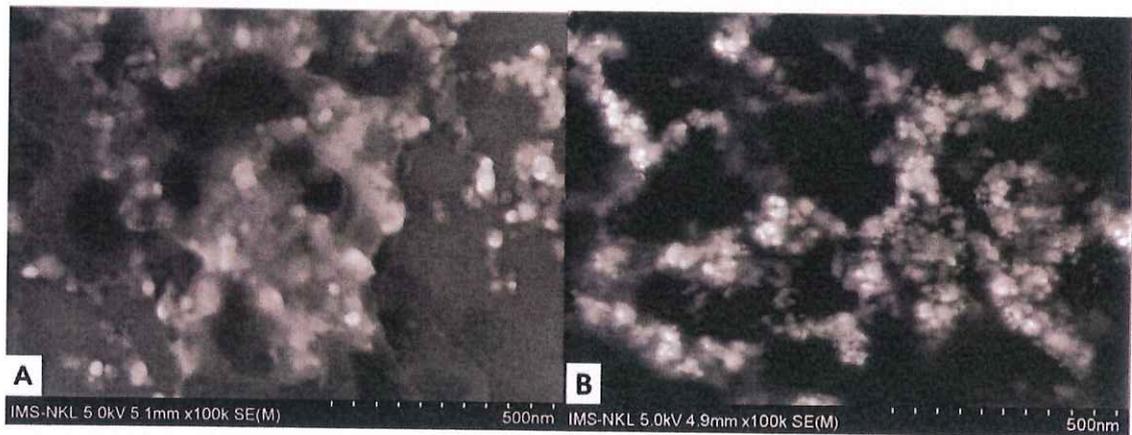
Hình 3. 2. Hình ảnh TEM của dung dịch nano bạc (A) và phức hệ nano (B -D)

Hình ảnh TEM của dung dịch sau khi kết hợp với PAA có thể thấy được rằng các hạt nano bạc vẫn tồn tại, nhưng độ tương phản giảm đi (Hình 3.2B) cho thấy sự thay đổi trong cấu trúc tinh thể. Kết quả phân tích XRD xác nhận rằng đỉnh nhiễu xạ đặc trưng của nano bạc tại $38,7^\circ$ [63] đã suy giảm đáng kể hoặc biến mất hoàn toàn, thay vào đó sự xuất hiện của các đỉnh mới tại $11,7^\circ$, $23,5^\circ$, $25,5^\circ$ và $47,9^\circ$, tương ứng với các pha AgO , Ag_2O , AgSO_4 và Ag_4O_4 [68, 69]. Điều này cho thấy PAA đã thúc đẩy quá trình oxy hóa AgNP, tạo ra các hợp chất bạc đa hóa trị. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng các hợp chất bạc ở trạng thái oxy hóa cao này sở hữu hoạt tính diệt khuẩn mạnh hơn so với Ag hoá trị 0 [55, 56, 70]. Đây chính là nguyên nhân khi kết hợp nano bạc với PAA đã thể hiện tác dụng hiệp đồng rõ rệt. Nhờ đó, phức hệ nano được kỳ vọng sẽ thể hiện khả năng diệt khuẩn vượt trội, mở ra tiềm năng ứng dụng trong các lĩnh vực như y sinh, xử lý nước và bảo vệ môi trường.



Hình 3. 3. Giải đồ XRD của nano bạc (a) trước và sau khi kết hợp với PAA (b)

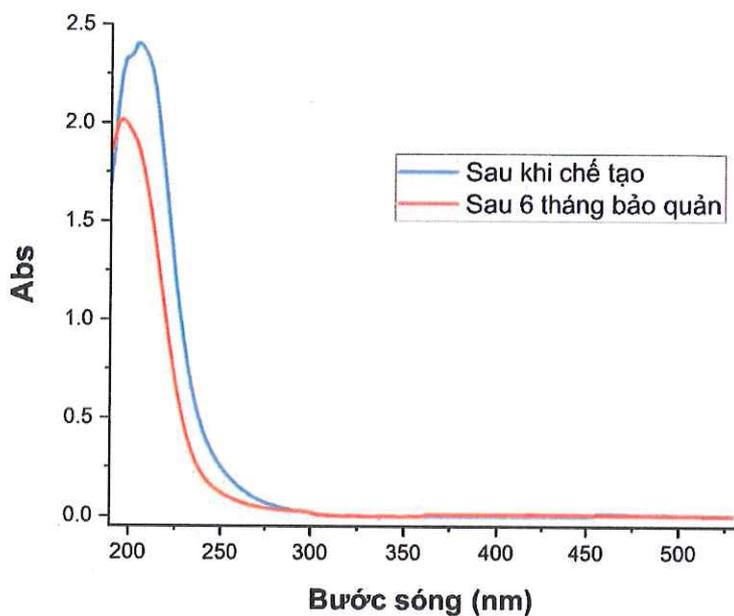
Hình ảnh SEM (Hình 3.4) cũng cho thấy sự hình thành lớp phủ PAA trên bề mặt hạt nano bạc, tạo ra cấu trúc lõi – vỏ ổn định. Điều này giúp cải thiện sự phân tán và kéo dài thời gian bảo quản, giảm thiểu hiện tượng kết tụ hoặc biến đổi hóa học không mong muốn. Không chỉ vậy, chitosan trong phức hệ tạo nên một bộ khung giúp cho các hạt nano bạc bám vào, giúp ổn định nano bạc, ngăn cản sự kết tụ và duy trì được kích thước hạt trong dung dịch.



Hình 3. 4. Hình ảnh SEM của phức hệ nano (A) và AgNP (B)

Sau 6 tháng bảo quản, phức hệ nano vẫn giữ được tính ổn định về màu sắc, phổ hấp thụ UV-Vis chỉ có sự dịch chuyển nhẹ, cho thấy SCP có độ ổn định hóa lý cao (Hình 3.5). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu, vật liệu

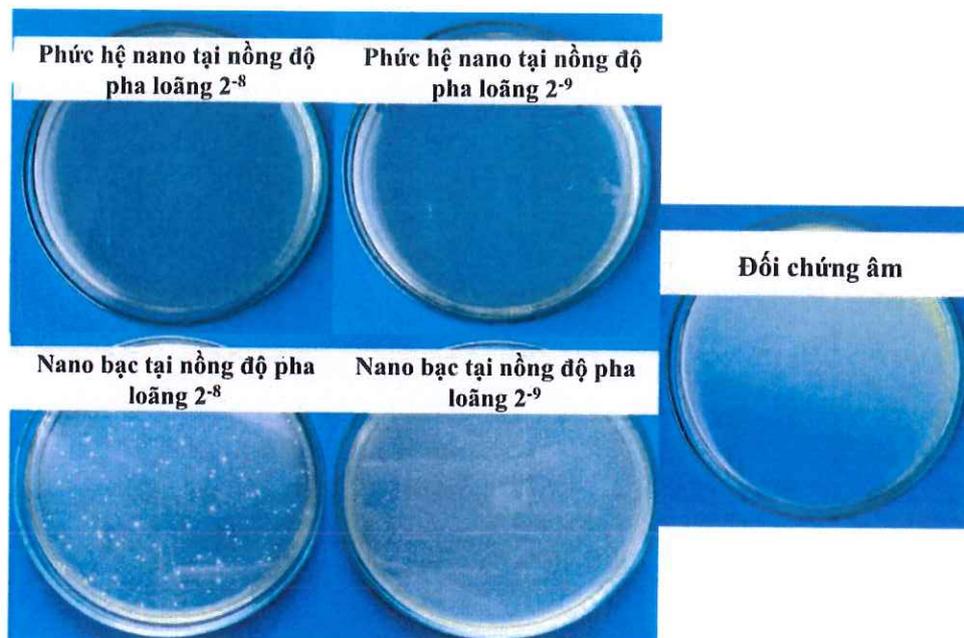
nano bạc khi được ổn định bằng polymer có khả năng duy trì tính chất ban đầu trong thời gian dài mà không bị kết tụ hoặc biến đổi cấu trúc [71].



Hình 3. 5. Phổ cộng hưởng plasmon bề mặt của phức hệ nano sau khi chế tạo và sau 6 tháng bảo quản

3.2. Đánh giá khả năng diệt khuẩn của phức hệ nano

Hoạt tính diệt khuẩn của phức hệ nano đã được đánh giá trên 2 chủng vi khuẩn chuẩn là *S. aureus* với mật độ 10^7 CFU/ml, và *E. coli* $5,85 \times 10^7$ CFU/ml. Dung dịch phức hệ nano và nano bạc đã được pha loãng từ 2^{-9} đến 2^{-1} tương ứng với nồng độ bạc từ 0,02 – 5 ppm. Các dung dịch này được ủ với dịch vi khuẩn trên trong 1 giờ ở nhiệt độ thường.



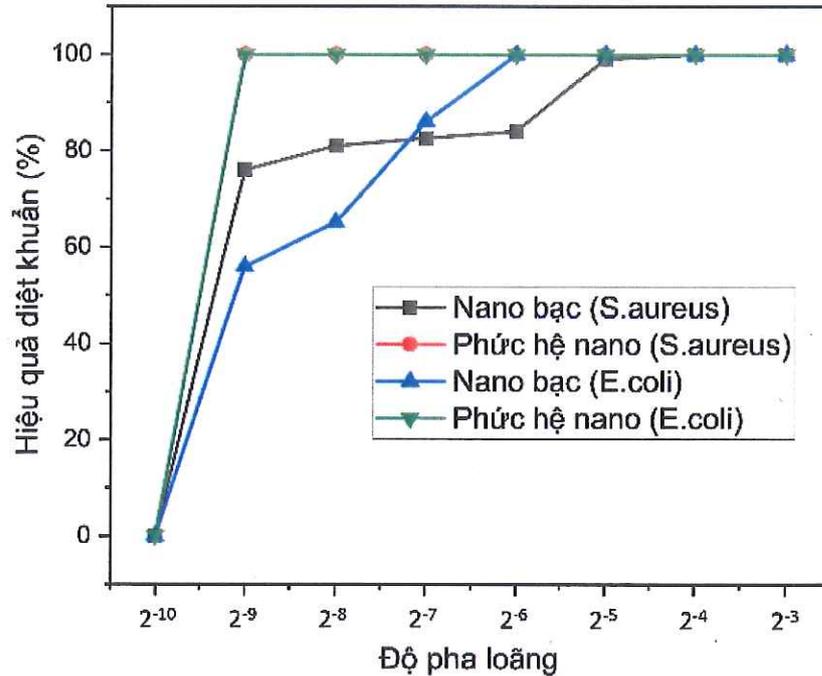
Hình 3. 6. Hình ảnh đánh giá hoạt tính của phức hệ nano và nano bạc tại 2 nồng độ pha loãng 2^{-8} và 2^{-9} đối với vi khuẩn *E. coli*

Kết quả thu được được trình bày trong bảng 3.1 và hình 3.7. Hiệu quả diệt khuẩn được tăng cường đáng kể khi nano bạc được xử lý bởi PAA. Dung dịch phức hệ nano có thể ức chế 100% *S. aureus* ở tại độ pha loãng 2^{-8} và 99,99% vi khuẩn tại độ pha loãng 2^{-9} . Thêm vào đó, phức hệ nano cũng có thể ức chế hoàn toàn vi khuẩn *E. coli* ở độ pha loãng 2^{-7} và ức chế trên 99,99% ở độ pha loãng 2^{-8} . Có thể thấy rằng, phức hệ nano có hiệu quả diệt khuẩn 100% trên cả 2 chủng vi khuẩn *S. aureus* và *E. coli* tại độ pha loãng 2^{-7} (tương ứng nồng độ 0,078 ppm bạc). Trong khi đó, ở thử nghiệm đánh giá hiệu quả diệt khuẩn của nano bạc trên 2 chủng *S. aureus* và *E. coli*, nano bạc ức chế hoàn toàn vi khuẩn *S. aureus* tại độ pha loãng 2^{-3} và *E. coli* tại 2^{-4} (tương ứng nồng độ bạc là 3,13 ppm và 1,56 ppm). Ta có thể dễ dàng nhận thấy, phức hệ nano có hiệu quả hơn nhiều so với khi chỉ sử dụng nano bạc hoặc PAA riêng lẻ. (hình 3.7).

Bảng 3. 1. Hiệu quả diệt khuẩn của dung dịch nano bạc và phức hệ nano ở nồng độ bạc khác nhau đối với *S. aureus* và *E. coli*

Độ pha loãng		2 ⁻⁹	2 ⁻⁸	2 ⁻⁷	2 ⁻⁶	2 ⁻⁵	2 ⁻³	2 ⁻²
Nồng độ bạc	mg/L	0,02	0,039	0,078	0,156	0,3125	1,56	2,5
Tỉ lệ PAA	%	0,0035	0,007	0,014	0,028	0,055	0,28	0,45
<i>S. aureus</i> nồng độ 1×10^7 CFU/mL								
AgNP	CFU/ml	$2,4 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	$1,74 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$9,8 \times 10^4$	$1,5 \times 10^2$	0
PAA	CFU/ml	$1,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^5$	$1,25 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3$	$0,3 \times 10^2$	0	0
Phức hệ nano	CFU/ml	8×10^2	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> nồng độ $5,85 \times 10^7$ CFU/mL								
AgNP	CFU/ml	$2,58 \times 10^7$	$2,04 \times 10^7$	$8,15 \times 10^6$	$1,06 \times 10^4$	10^2	0	0
PAA	CFU/ml	$1,1 \times 10^4$	$2,85 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$1,8 \times 10^2$	0	0	0
Phức hệ nano	CFU/ml	$1,6 \times 10^4$	$3,95 \times 10^2$	0	0	0	0	0

Dựa vào số liệu trong bảng 3.1, nồng độ bạc trong phức hệ nano có hiệu quả ức chế hoàn toàn vi khuẩn *S. aureus* đã giảm tới 32 lần (từ 2,5 ppm xuống 0,039 ppm) khi so nano bạc ban đầu. Trong khi nồng độ bạc có trong phức hệ ức chế hoàn toàn vi khuẩn *E. coli* giảm gần 9 lần (từ 2,5 ppm xuống 0,078 ppm) so với nano bạc ban đầu. Do đó, khi kết hợp PAA, nồng độ bạc sử dụng có thể giảm được đáng kể so với chỉ sử dụng riêng lẻ nano bạc.



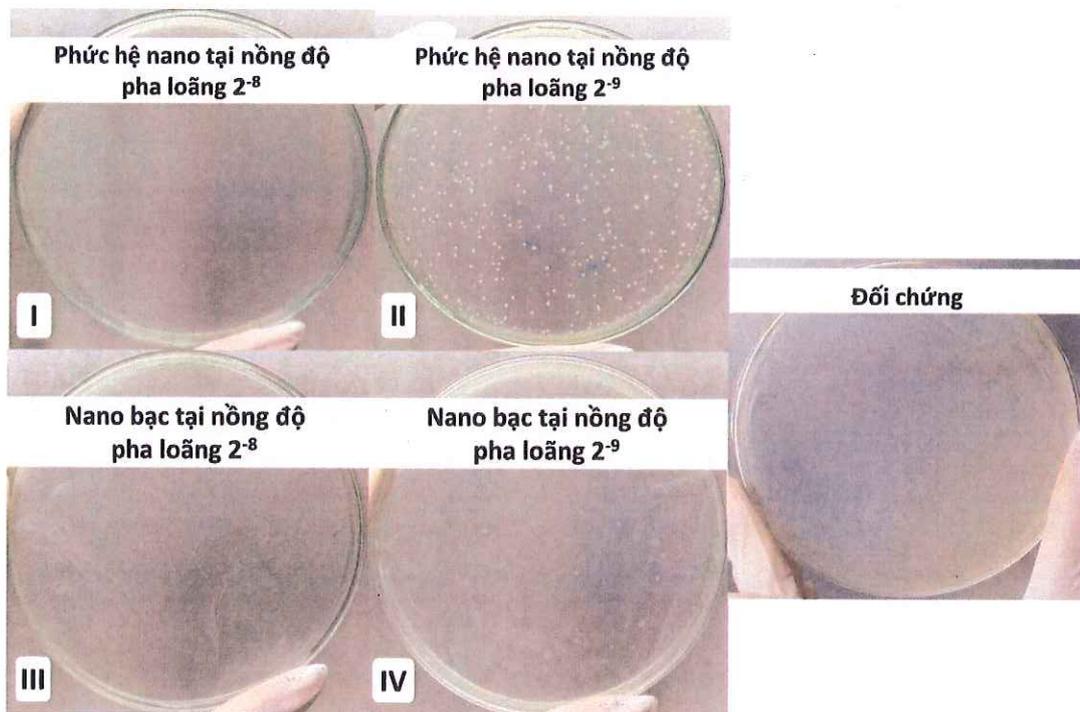
Hình 3. 7. Hiệu quả diệt khuẩn của phức hệ nano và nano bạc

Để xác định tính hiệp đồng của các thành phần trong phức hệ nano ta có thể dùng phương pháp checkerboard. Từ các số liệu thu được từ bảng 3.1 ở trên có thể xác định được nồng độ ức chế tối thiểu từng dung dịch với 2 chủng vi khuẩn *S. aureus* và *E. coli*. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được xác định là nồng độ của mẫu thử nghiệm thấp nhất có khả năng ức chế hoàn toàn sự phát triển có thể quan sát được trong dịch cấy. Từ đó sử dụng phương pháp checkerboard ta xác định được chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn (FICI – Fractional inhibitory concentration index) là tổng của các FIC của từng thành phần có trong dung dịch khi được kết hợp với nhau, chia cho MIC của từng thành phần khi được sử dụng riêng lẻ [72]. Sự tương tác này có thể là phản ứng hiệp đồng nếu chỉ số FIC nhỏ hơn hoặc bằng 0,5; phản ứng cộng gộp nếu chỉ số FIC lớn hơn 0,5 và nhỏ hơn hoặc bằng 1,0; không ảnh hưởng lẫn nhau nếu FIC lớn hơn 1,0 và nhỏ hơn hoặc bằng 2,0; và đối kháng nhau khi FIC lớn hơn 2 [59, 72, 73] (Bảng 3.2).

Bảng 3. 2. Kiểm nghiệm bằng phương pháp checkerboard của phức hệ nano đối với 2 chủng vi khuẩn *S. aureus* và *E. coli*

Chủng vi khuẩn	Dung dịch thử nghiệm	Nồng độ MIC		FIC	FICI	Sự tương tác
		Riêng lẻ	Phức hệ			
<i>S. aureus</i>	Nano bạc	2,5	0,039	0,0156	0.0406	Hiệp đồng
	PAA	0,28	0,007	0.025		
<i>E. coli</i>	Nano bạc	1,56	0,078	0,05	0.3	Hiệp đồng
	PAA	0,055	0,014	0.25		

Sự tương tác giữa nano bạc và PAA trong phức hệ nano đối với 2 chủng vi khuẩn *S. aureus* và *E. coli* đã được xác định là sự tương tác hiệp đồng. Điều này giúp cho giải thích một phần cơ chế diệt khuẩn của phức hệ nano. Nano bạc và PAA tương tác với nhau tạo nên hiệu ứng hiệp đồng, trong đó, PAA oxy hóa nano bạc hình thành bạc ở trạng thái hóa trị cao, giúp nâng cao hiệu quả diệt khuẩn [69]. Đồng thời các ion bạc hóa trị cao xúc tác giúp ổn định PAA, nâng cao thời gian diệt khuẩn của phức hệ [55, 56, 70].



Hình 3. 8. Hình ảnh đánh giá hoạt tính của phức hệ nano và nano bạc tại 2 nồng độ pha loãng 2^{-8} và 2^{-9} chống lại vi khuẩn *S. aureus*

Ngoài các kết quả thu được trong điều kiện phòng thí nghiệm, một thử nghiệm thực tế được triển khai tại trang trại chăn nuôi lợn (200 m², Hưng Yên) nhằm đánh giá hiệu quả ứng dụng của phức hệ nano trong môi trường chăn nuôi. Kết quả cho thấy, với nồng độ bạc chỉ 0,17 ppm, phức hệ nano đã giúp giảm tới 99% mật độ vi sinh vật hiếu khí trong không khí chuồng trại, từ 4×10^5 CFU/mL xuống còn $3,5 \times 10^3$ CFU/mL. Đồng thời, hiệu quả cải thiện chất lượng không khí cũng được ghi nhận rõ rệt thông qua sự suy giảm đáng kể mùi hôi – một trong những yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe vật nuôi và người lao động.

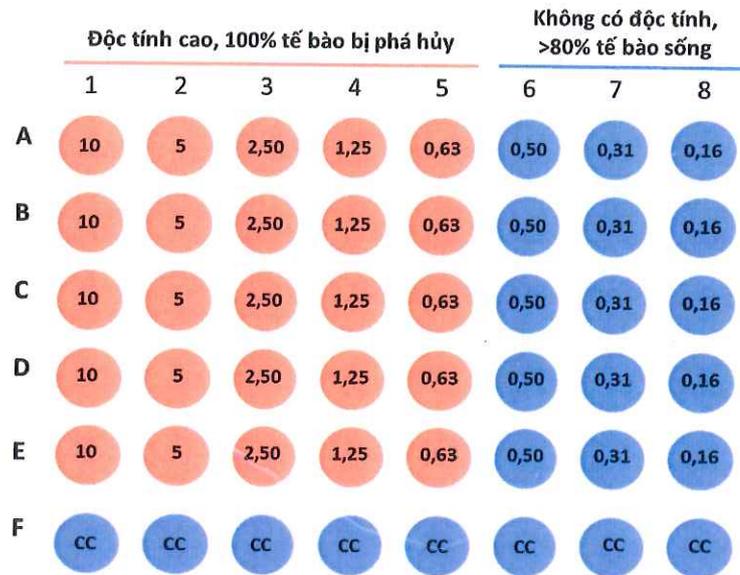
Những kết quả này cho thấy phức hệ nano không chỉ hiệu quả trong kiểm soát vi sinh vật mà còn có tiềm năng ứng dụng cao trong thực tiễn, góp phần xây dựng môi trường chăn nuôi an toàn và bền vững.

3.3. Đánh giá khả năng bất hoạt virus DTLCP của phức hệ nano

3.3.1. Độc tính của phức hệ nano trên tế bào PAM

Độc tính của phức hệ nano được kiểm tra trên môi trường DMEM có chứa tế bào PAM tại các nồng độ pha loãng khác nhau (1/10 – 1/640) tương ứng với nồng độ bạc có trong phức hệ nano từ 10 xuống 0,16 ppm.

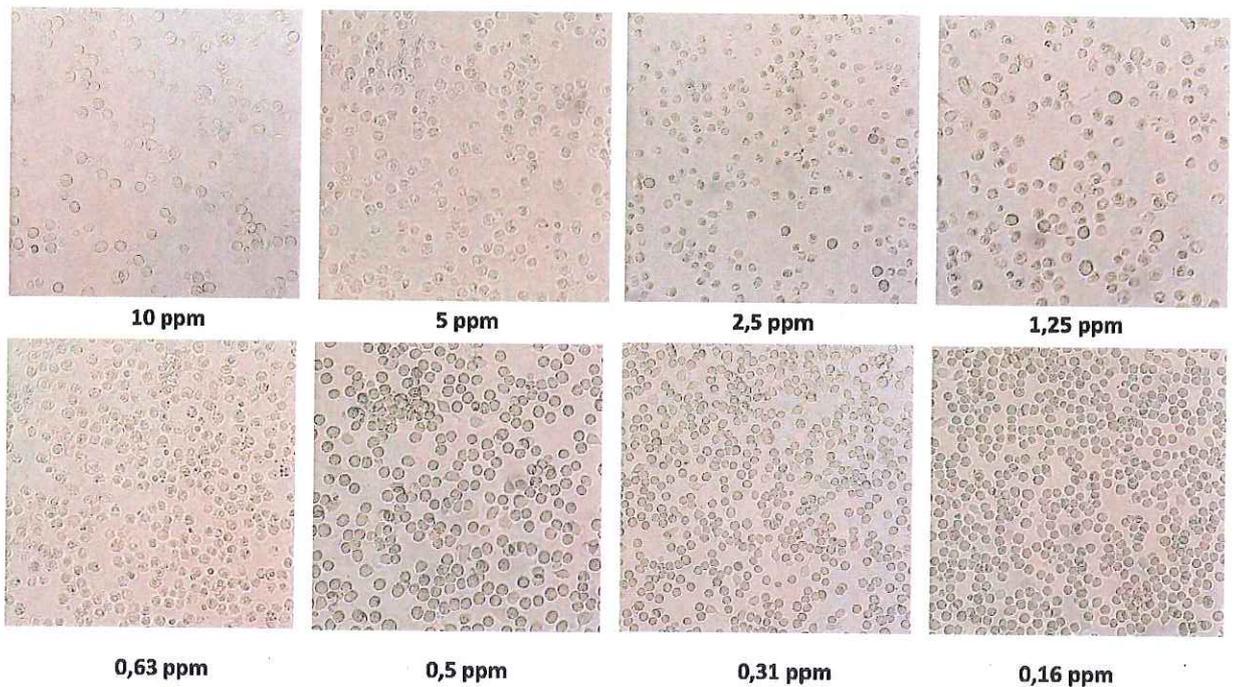
Kết quả đánh giá độc tính của phức hệ nano đối với tế bào PAM sau 4 ngày được trình bày tại Hình 3.9 và Hình 3.10. Dữ liệu cho thấy, khi nồng độ phức hệ nano giảm, tỷ lệ sống của tế bào tăng lên tương ứng. Tại dải nồng độ bạc từ 10 đến 0,63 ppm, toàn bộ tế bào PAM bị ảnh hưởng nghiêm trọng với tỷ lệ chết lên tới 100%, phản ánh độc tính cao của phức hệ tại các nồng độ này. Ngược lại, khi nồng độ giảm dần, độc tính của phức hệ giảm theo, thể hiện qua sự gia tăng tỷ lệ tế bào sống. Các dấu hiệu tổn thương tế bào ghi nhận bao gồm biến dạng hình thái, phá hủy cấu trúc màng, suy giảm khả năng tăng trưởng và mật độ tế bào thấp. Những kết quả này cho thấy, ở nồng độ bạc cao, phức hệ nano có thể gây rối loạn cấu trúc tế bào nghiêm trọng, dẫn đến hiện tượng chết tế bào hàng loạt.



Hình 3.9. Sơ đồ đánh giá độc tính của dung dịch nano bạc và phức hệ nano trên tế bào PAM với các nồng độ pha loãng khác nhau

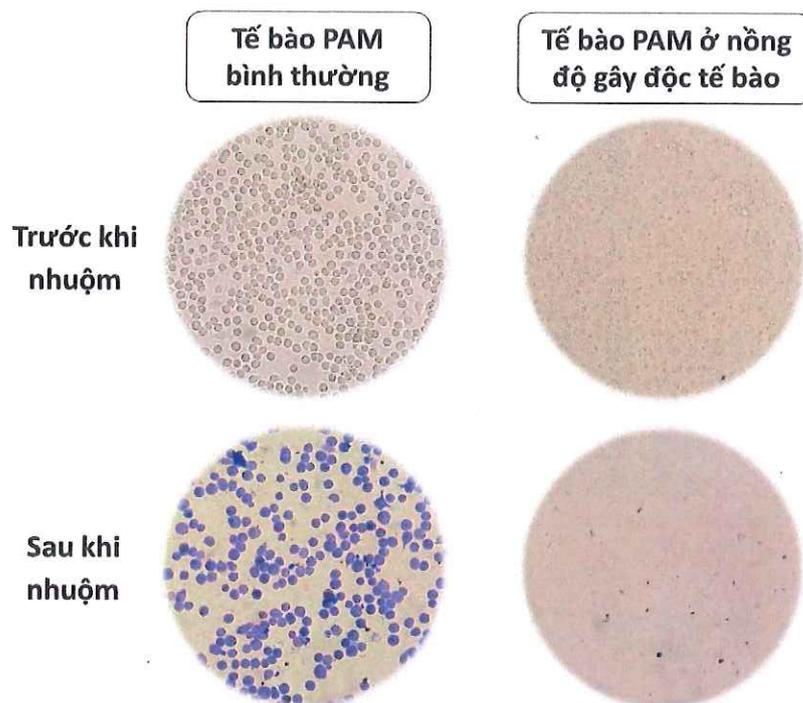
Mỗi cột có 6 giếng từ hàng A đến hàng F cho từng độ pha loãng của phức hệ nano; các giếng ở hàng F là mẫu đối chứng không có phức hệ nano. Màu đỏ thể hiện độc tính cao, phá vỡ tế bào; màu xanh dương cho thấy nồng độ phức hệ nano an toàn với hơn 80 % tế bào còn sống.

Ngược lại, khi nồng độ bạc giảm xuống 0,50 ppm, tỷ lệ sống của tế bào quan sát dưới kính hiển vi vượt quá 80%. Kết quả này cho thấy, ở nồng độ thấp hơn, tế bào PAM có khả năng phục hồi chức năng sinh lý và tiếp tục tăng trưởng. Bắt đầu từ nồng độ 0,31 ppm, tỷ lệ sống đạt mức ổn định, gần như tiệm cận 100%. Điều này chứng minh rằng phức hệ nano không còn gây tác động bất lợi đến tế bào tại nồng độ từ 0,5 ppm trở xuống, đồng thời tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển tế bào. Hình ảnh kính hiển vi (Hình 3.10) ghi nhận rằng ở nồng độ bạc $\leq 0,5$ ppm, các tế bào giữ được hình thái bình thường, không có dấu hiệu co rút hoặc phân mảnh và khả năng sinh trưởng được duy trì. Từ đó có thể kết luận rằng phức hệ nano ở ngưỡng nồng độ này là an toàn và không gây độc tính đối với tế bào PAM.



Hình 3. 10. Hình ảnh hiển vi của tế bào PAM sau khi xử lý với các nồng độ khác nhau của phức hệ nano

Thêm vào đó, có thể thấy được rằng, trong phức hệ nano, nano bạc có ảnh hưởng độc tính đến với tế bào PAM. Ở nồng độ cao, phức hệ nano giải phóng các ion Ag^+ trong môi trường nội bào, hình thành các gốc oxy hoá hoạt động (ROS), không chỉ gây tổn thương đến cấu trúc của màng tế bào, ty thể, mà còn gây rối loạn chức năng của tế bào [42]. Axit peracetic (PAA) đóng vai trò là chất oxy hóa mạnh, có khả năng chuyển hóa bề mặt các hạt nano bạc thành oxit bạc hóa trị cao (AgO , Ag_2O). Các dạng oxit này có hoạt tính oxy hóa mạnh, hỗ trợ tiêu diệt vi sinh vật nhưng ít khuếch tán vào nội bào hơn so với ion bạc Ag^+ tự do [74].



Hình 3. 11. Hình ảnh quan sát tế bào dưới kính hiển vi trước và sau khi nhuộm Crystal violet của tế bào PAM trong mẫu đối chứng và mẫu được xử lý ở nồng độ gây độc tế bào

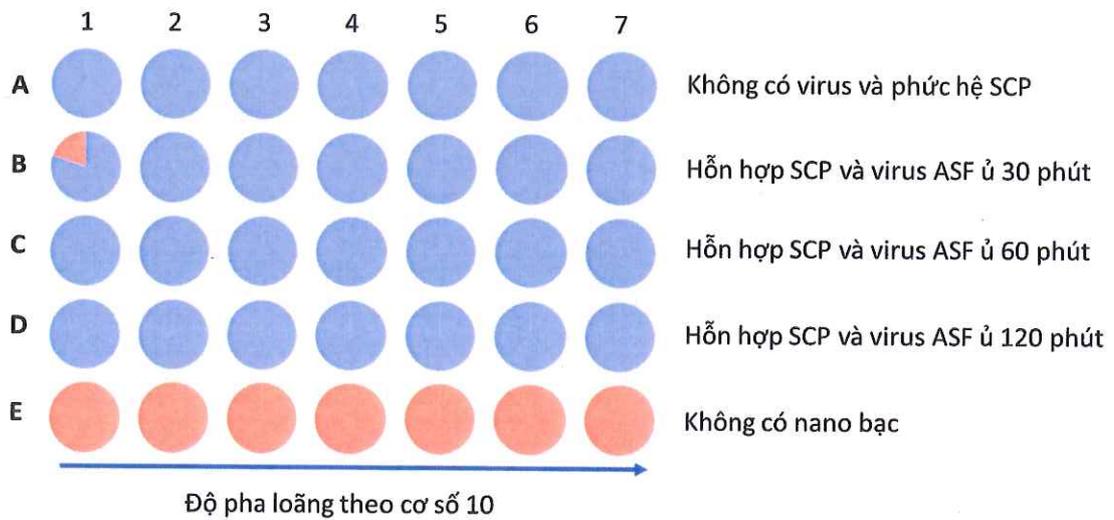
Từ kết quả trên chỉ ra rằng, nồng độ an toàn của phức hệ nano là nồng độ bậc 0,5 ppm. Do đó, nồng độ này của phức hệ nano được lựa chọn để tiến hành thử nghiệm đánh giá khả năng bất hoạt virus DTLCP mà không gây tổn hại đến tế bào PAM.

3.3.2. Khả năng bất hoạt virus DTLCP của phức hệ nano

Phức hệ nano tại nồng độ an toàn tế bào (0,5 ppm bạc) được sử dụng để đánh giá khả năng bất hoạt virus DTLCP có hiệu giá 10^4 HAD₅₀/mL.

Hình 3.12 trình bày kết quả đánh giá, cho thấy phức hệ nano có hiệu quả gây bất hoạt đối với virus DTLCP tại 3 mốc thời gian: 30, 60 và 120 phút. Ở thời điểm 30 phút, virus DTLCP vẫn được phát hiện thông qua sự xuất hiện của các tổn thương trên tế bào trong các giếng đầu tiên của đĩa nuôi cấy. Tuy nhiên, sau 60 phút xử lý, hình ảnh dưới kính hiển vi không còn ghi nhận sự hiện diện của virus ở bất kỳ giếng nào. Tình trạng này tiếp tục duy trì sau 120 phút xử lý. Điều này chứng tỏ rằng phức hệ nano có thể ức chế hơn 99% sự phát triển của virus DTLCP chỉ sau 30 phút và đạt hiệu quả bất hoạt hoàn toàn

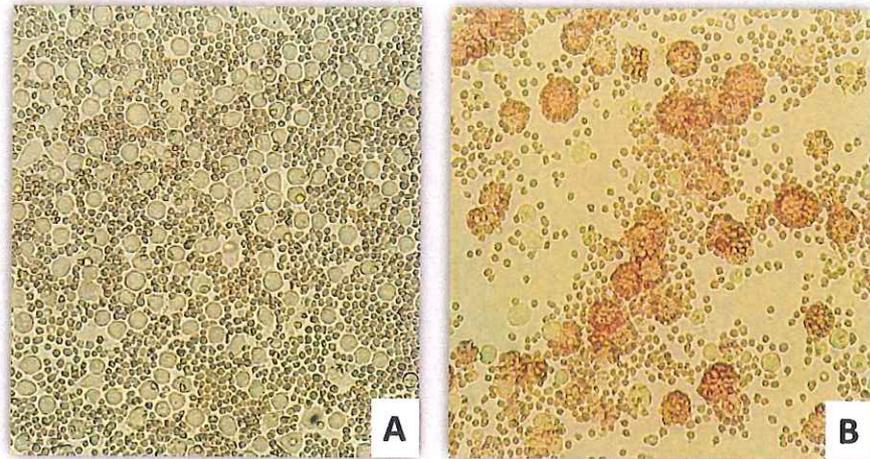
khi thời gian xử lý kéo dài đến 60 hoặc 120 phút, hiệu quả xử lý của phức hệ nano càng được nâng cao khi thời gian tiếp xúc tăng.



Hình 3. 12. Kết quả thử nghiệm hoạt tính bất hoạt virus của phức hệ SCP tại nồng độ an toàn tế bào

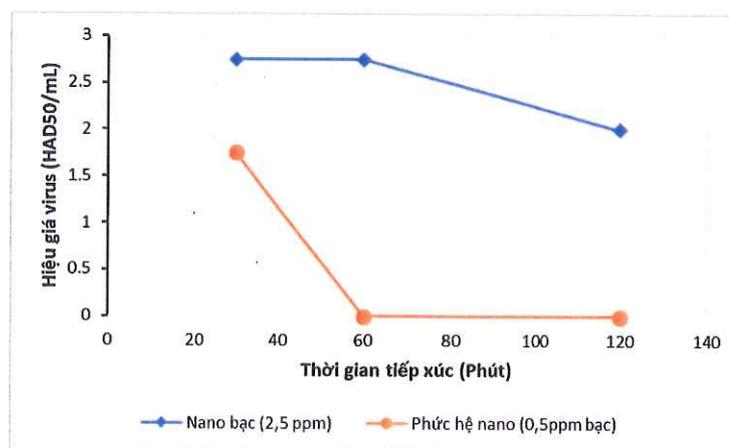
Đối chứng âm (không virus, không có phức hệ nano - A); virus được xử lý bởi phức hệ nano (0,5 ppm bạc) trong các thời gian khác nhau: 30 phút (B), 60 phút (C), 120 phút (D); đối chứng dương (chỉ virus - E). Cột 1-7: tương ứng với độ pha loãng theo cơ số 10 (10^{-1} , 10^{-2} , ... 10^{-7}), mỗi độ pha loãng lặp lại 5 lần. Vòng tròn đỏ: phát hiện virus; vòng tròn xanh: không phát hiện virus sống.

Hình 3.13 thể hiện hình ảnh tế bào PAM được quan sát dưới kính hiển vi. Hình 3.13B khi virus không được xử lý bởi phức hệ nano, độc lực của virus sẽ gây nhiễm trùng và phá hủy tế bào PAM, dẫn đến hình thái tế bào bị thay đổi đồng thời diễn ra hiện tượng hấp phụ hồng cầu xung quanh các tế bào bị nhiễm. Hấp thụ hồng cầu xảy ra do sự tương tác giữa hồng cầu và màng glycoprotein của virus [75]. Trong khi đó, các tế bào PAM sống, phát triển bình thường, có dạng hình cầu trong suốt, không hấp phụ hồng cầu khi bị lây nhiễm với virus DTLCP đã được xử lý bằng phức hệ nano (nồng độ bạc 0,5 ppm) (Hình 3.13A). Kết quả này cho thấy khả năng bất hoạt virus DTLCP của phức hệ nano.



Hình 3.13. Tế bào PAM được quan sát dưới kính hiển vi LED Leica DM II

So sánh kết quả thử nghiệm giữa nano bạc và phức hệ nano trên virus DTLCP cho thấy sự khác biệt rõ rệt về hiệu quả bất hoạt virus của từng chất (Hình 3.14). Các hạt nano bạc với nồng độ 2,5 ppm có hiệu quả ức chế virus hiệu giá 10^4 HAD₅₀/mL trên 94% trong 60 phút và trên 99% với thời gian 120 phút. Thêm vào đó, ở nồng độ 0,78 ppm, nano bạc có khả năng bất hoạt hoàn toàn virus DTLCP ở mức hiệu giá 10^3 HAD₅₀/mL [42]. Trong khi đó, khi nano bạc kết hợp với PAA, hiệu quả bất hoạt virus được cải thiện đáng kể, điều này được thể qua việc phức hệ nano có nồng độ 0,5 ppm bạc đã bất hoạt hoàn toàn virus DTLCP ở mức hiệu giá 10^4 HAD₅₀/mL. Sự thay đổi này cho thấy PAA đóng vai trò quan trọng trong việc tăng cường khả năng bất hoạt virus của nano bạc.



Hình 3. 14. Biểu đồ minh họa hiệu giá virus DTLCP giảm sau khi xử lý với phức hệ nano và nano bạc ở các thời gian khác nhau

Cơ chế giải thích sự tăng cường hiệu quả này vẫn cần tiếp tục được làm sáng tỏ. Tuy nhiên, có thể lý giải rằng PAA với vai trò là chất oxy hóa mạnh, tham gia vào quá trình oxy hóa các hạt nano bạc, chuyển hóa lớp vỏ của chúng thành oxit bạc hóa trị cao. Các hạt nano oxit tạo ra oxy nguyên tử trên bề mặt các hạt, tăng cường hiệu quả bất hoạt virus hiệu quả. Đồng thời, nano bạc cũng đóng vai trò như một chất xúc tác, giúp ổn định PAA, kéo dài thời gian hoạt động của nó và duy trì hiệu quả xử lý.

Qua kết quả trên cho thấy phức hệ nano có khả năng bất hoạt virus mạnh mẽ hơn so với chỉ sử dụng nano bạc riêng lẻ. Chứng minh được, phức hệ nano là phức hệ tiềm năng trong việc sử dụng làm chất khử trùng chống lại virus hiệu quả ứng dụng trong ngành chăn nuôi.

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Đề tài đã đạt được các kết quả như sau:

Phức hệ nano kết hợp giữa nano bạc, chitosan và axit peracetic đã được tổng hợp thành công, thể hiện hiệu quả kháng khuẩn và kháng virus vượt trội nhờ cơ chế hiệp đồng giữa các thành phần. Vật liệu thu được có kích thước hạt bạc trung bình khoảng 15 nm, ổn định và phân tán tốt nhờ chitosan. Axit peracetic đóng vai trò là chất oxy hóa mạnh, giúp hình thành các dạng bạc đa hóa trị (Ag_2O , AgO , và Ag_4O_4), qua đó nâng cao khả năng diệt khuẩn của hệ vật liệu.

Phức hệ nano có khả năng ức chế hoàn toàn sự phát triển của *Staphylococcus aureus* (Gram dương) và *Escherichia coli* (Gram âm) chỉ với nồng độ bạc 0,078 ppm – thấp hơn đáng kể so với nồng độ cần thiết khi sử dụng nano bạc đơn thuần. Kết quả từ phương pháp checkerboard cho thấy hiệu ứng hiệp đồng rõ rệt giữa nano bạc và axit peracetic, góp phần nâng cao hiệu quả kháng khuẩn ngay cả ở nồng độ rất thấp.

Thêm vào đó, phức hệ nano còn cho thấy khả năng bất hoạt hoàn toàn virus Dịch tả lợn châu Phi ở nồng độ bạc 0,5 ppm và duy trì hiệu quả trong suốt thời gian xử lý, cho thấy tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát dịch bệnh nguy hiểm trong chăn nuôi.

Trong điều kiện thực tế tại trang trại, phức hệ nano tiếp tục khẳng định hiệu quả khi làm giảm tới 99% mật độ vi sinh vật trong không khí chuồng kín chỉ với nồng độ bạc 0,17 ppm, đồng thời góp phần cải thiện chất lượng không khí và giảm mùi hôi – yếu tố quan trọng trong quản lý môi trường chăn nuôi.

Với hiệu quả kháng khuẩn, kháng virus, độ ổn định cao và tiềm năng ứng dụng thực tiễn, phức hệ nano hứa hẹn là một vật liệu hữu ích trong nhiều lĩnh vực như nông nghiệp, y tế, công nghệ thực phẩm và xử lý môi trường.

Tuy nhiên, để có thể sử dụng vật liệu trong thực tiễn một cách an toàn và hiệu quả, cần tiếp tục thực hiện các nghiên cứu chuyên sâu để tối ưu hóa vật liệu và đảm bảo tính an toàn sinh học.

Dựa trên cơ sở các kết quả nghiên cứu đã thu được, đề tài xin kiến nghị Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam xem xét:

- **Nghiên cứu cơ chế tác động của phức hệ :**
 - o Làm rõ cơ chế tương tác giữa phức hệ nano bạc – PAA với vi khuẩn và virus, từ đó tối ưu hóa hiệu quả diệt khuẩn và phát triển các chế phẩm phù hợp với từng loại vi sinh vật cụ thể.
- **Đánh giá độ an toàn sinh học:**
 - o Tiến hành đánh giá độc tính cấp tính và mạn tính của phức hệ nano trên tế bào và mô sinh học.
- **Thử nghiệm trong điều kiện thực tế:**
 - o Xác định khả năng ứng dụng phức hệ nano trong các môi trường cụ thể như: bề mặt thiết bị y tế, dung dịch sát khuẩn, hệ thống xử lý nước và sản phẩm bảo quản thực phẩm.
 - o Đánh giá hiệu quả diệt khuẩn trong điều kiện môi trường phức tạp và kiểm tra độ ổn định của phức hệ theo thời gian.
- **Tối ưu hóa công nghệ sản xuất**

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

Tran Thi Ngoc Dung, Nguyen Thi Yen Chi, Dang Viet Quang, Nguyen Thanh Cong, Thi Ngoc Ha Lai, Van Phan Le, "Effective Foot-and-Mouth Disease Virus Control Using Silver Nanoparticles." *ChemistrySelect* 9.20 (2024): e202400143.

ChemistrySelect

Research Article
doi.org/10.1002/slct.202400143

Chemistry
Europe
European Chemical
Societies Publishing

Please check the marked (■) text passages carefully, if any are present.

www.chemistryselect.org

Effective Foot-and-Mouth Disease Virus Control Using Silver Nanoparticles

Tran Thi Ngoc Dung,^{*[a]} Nguyen Thi Yen Chi,^[a] Dang Viet Quang,^{*[b]} Nguyen Thanh Cong,^[b] Thi Ngoc Ha Lai,^[c] and Van Phan Le^{*[c]}

This study investigates the antiviral efficacy of chitosan-stabilized silver nanoparticles (AgNPs) against the Foot-and-Mouth Disease virus (FMDV), a highly contagious pathogen affecting cloven-hoofed animals. In vitro experiments demonstrated that AgNPs effectively inhibited FMDV replication in a dose-dependent manner. At a concentration of 1.56 µg/ml,

AgNPs exhibited no cytotoxicity to baby hamster kidney 21 (BHK21) cells while achieving complete deactivation of FMDV at a titer of 10^3 TCID₅₀ and inhibiting viral growth at a titer of 10^4 TCID₅₀. These findings suggest the potential of silver nanoparticles as a novel disinfectant for controlling FMDV transmission and preventing disease outbreaks.

Introduction

Foot-and-mouth disease virus (FMDV) is a highly contagious viral pathogen that affects domestic and wild cloven-hoofed animals, such as cattle, pigs, sheep, and goats.^[1] The disease is characterized by the formation of vesicles and erosions on the mouth, nose, and feet of infected animals.^[2] Airborne transmission has also been implicated in the spread of disease over both long (considered to be up to 50 km over land and 200 km over water) and short distances (within premises and neighboring premises within 2 km proximity of each other).^[3–5]

FMDV, belonging to the Picornaviridae family, has a structure similar to other single-stranded RNA viruses. It has a single-stranded RNA genome encapsulated by a protein shell.^[6] The FMDV particle is roughly spherical in shape and about 25–30 nm in diameter. It consists of the RNA genome surrounded by a protein shell or capsid. The capsid is composed of 60 copies of the capsomers. Each capsomer comprises four structural polypeptides, VP1, VP2, VP3, and VP4. The VP1, VP2, and VP3 are exposed on the virus's surface while VP4 is located internally.^[1] The special structure of the protein shell helps FMDV resist the attack of the host animal's immune system and may explain why this virus easily spreads during the disease outbreak. Ideal conditions for virus survival are temperatures below 50 °C, relative humidity above 55%, and a neutral pH.^[7–9]

FMDV exists in seven different serologically distinct types. Serotypes O and A were initially discovered by Vallee and Carre.^[10] Their work was extended by Waldmann and Trautwein^[11] with the discovery of a third serotype which was named serotype C. Later, three additional serotypes were identified in samples originating from South Africa, and they were named Southern African Territories 1, 2, and 3 (SAT1, SAT2, SAT3).^[12] The seventh serotype, Asia-1, was initially detected in a sample collected from a water buffalo at Okara, Punjab, Pakistan, in 1954.^[13] In the Southeast Asian region, FMDV of serotypes O, A, and Asia-1 have been identified as the main cause of major outbreaks in Cambodia, Laos, Malaysia, Myanmar, the Philippines, Thailand, and Vietnam in recent years.^[13–17] Studies on FMDV have shown that the isolates obtained from these countries have high similarity in nucleotide sequences. FMDV is transmitted through direct contact with infected animals, their secretions, or contaminated objects, as well as through airborne transmission over short distances.^[4,18–21]

The virus has a high mutation rate, which allows it to evolve rapidly and generate new strains that can evade the host immune response and cause outbreaks in previously unaffected populations. Outbreaks of (Foot-and-mouth disease) FMD can devastate the agricultural industry due to the expense of implementing control measures and the consequent trade restrictions that prevent the export of animals and animal products.^[16] It is estimated that FMD costs between US\$6.5–21 billion annually in endemic regions.^[4]

Vaccination is a key tool in controlling and preventing FMDV, however, it can protect animals from infection for a short period of time and new virus variants may arise and reduce vaccine effectiveness. Therefore, biosecurity measures such as quarantine, surveillance, movement restrictions, and using antiviral agents to clean the farming environment become important to constrain the disease.^[22–24]

Silver nanoparticles (AgNPs) have been evaluated as one of the potent disinfectant agents against a wide variety of pathogens including bacteria,^[25,26] viruses,^[27–30] fungi, and yeasts.^[31,32] Thanks to the ability to inhibit and kill viruses,

[a] T. T. N. Dung, N. T. Y. Chi
Institute of Environmental Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam
E-mail: tndzung@gmail.com

[b] D. Viet Quang, N. Thanh Cong
Faculty of Biotechnology, Chemistry and Environmental Engineering,
Phenikaa University, Hanoi 12116, Vietnam
E-mail: quang.dangviet@phenikaa-un.edu.vn

[c] T. N. H. Lai, V. P. Le
Faculty of Veterinary Medicine, Vietnam National University of Agriculture,
Hanoi, Vietnam
E-mail: letranphan@vnua.edu.vn

Supporting information for this article is available on the WWW under
<https://doi.org/10.1002/slct.202400143>

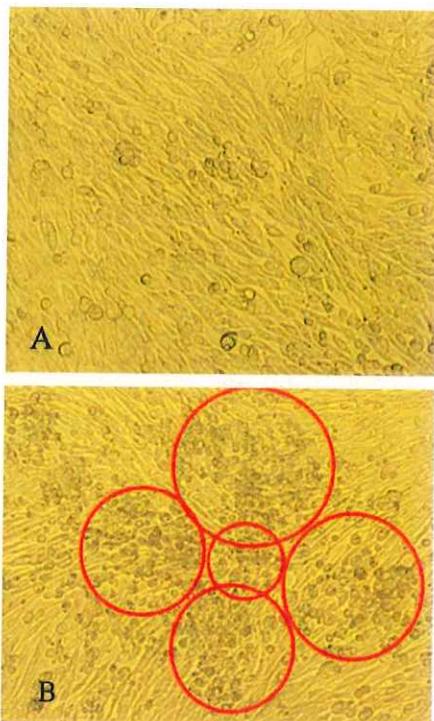


Figure 7. Representative microscopic images of un-infected (A) and infected (B) BHK-21 cells with FMDV. Images were taken on a Leica DM ILLED microscope. Red circles indicated the detection of CPE.

concentrations could inactivate the FMDV prior to entry into the cell or during penetration.^{163,64} AgNPs likely bind to virus via the interaction with oligomer disulfides resulting in the blockage of cell attachment, cell entry and protein/genome injection, which inhibit viral infection and replication. Moreover, AgNPs generate reactive species that can degrade viral capsid receptor and genetic materials causing the viral capsid breakdown.

The unique attribute of AgNPs is that they can attach to walls and floor when they are sprayed on animal farm and thereby their antiviral activity can last for a long time. The success of this work therefore could open a new way to prevent FMDV spread based on AgNPs and thereby provides more choices for biosecurity in animal farms.

Conclusions

Our study showed that silver nanoparticles (AgNPs) have highly antiviral activity against FMDV. The antiviral activity of AgNPs was found to be concentration dependent, with complete inactivation of FMDV observed at a titer of 10^3 TCID₅₀ at a safe

concentration of 1.56 ppm, while partially inhibited FMDV at 10^3 TCID₅₀. Obviously, the usage of AgNPs at 1.56 ppm can result in three-fold reduction in FMDV titer. AgNPs, therefore, have high potential to be used as a novel antiviral agent against FMDV. The success of the work could provide an effective biosecurity measure for livestock farms, however, it may require further investigation on the application of AgNPs in different farm systems.

Ethical Statement

The animal study protocol was approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of Vietnam National University of Agriculture.

Acknowledgements

This work is financially supported by a grant from Vietnam Academy of Science and Technology, No KHCBS.02/22–24.

Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interest.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Keywords: Foot-and-mouth disease virus (FMDV) · Silver nanoparticles · Disinfectant · Antiviral · and Cytotoxicity

- [1] S. M. Jamal, G. J. Belsham, *Vet. Res.* **2013**, *44*, 116.
- [2] M. J. Grubman, B. Baxt, *Clin. Microbiol. Rev.* **2004**, *17*, 465–493.
- [3] J. Arzi, J. M. Pacheco, C. Stenfeldt, L. L. Rodriguez, *Vet. J.* **2017**, *14*, 89.
- [4] T. J. D. Knight-Jones, J. Rushton, *Preven. Vet. Med.* **2013**, *112*, 161–173.
- [5] S. Alexandersen, M. Quan, C. Murphy, J. Knight, Z. Zhang, *J. Comp. Pathol.* **2003**, *129*, 268–282.
- [6] T. J. Tuthill, E. Groppelli, J. M. Hogle, D. J. Rowlands, *Picornaviruses*, In: J. E. Johnson (Ed.), *Cell Entry by Non-Enveloped Viruses*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2010**, 43–69.
- [7] C. Colenutt, E. Brown, N. Nelson, D. J. Paton, P. Eblé, A. Dekker, J. L. Gonzales, S. Gubbins, *mbi* **2020**, *11*, e00381–00320.
- [8] C. Colenutt, E. Brown, N. Nelson, J. Wadsworth, J. Maud, B. Adhikari, S. Chapagain Kalle, M. Upadhyaya, S. Kalle Pandey, D. J. Paton, K. Sumption, S. Gubbins, *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*, e00686–00618.
- [9] L. M. Bartley, C. A. Donnelly, R. M. Anderson, *Vet. Record* **2002**, *151*, 667–669.
- [10] H. Vallée, H. Carré, *CR Acad. Sci. Paris* **1922**, *174*, 1498–1500.
- [11] O. Waldmann, K. Trautwein, *Berl. Tierärztl. Wschr* **1926**, *42*, 569–571.
- [12] J. B. Brooksby, *Adv. Virus Res.* **1958**, *1–37*. ■■■ Please provide volume number for reference [12]. ■■■
- [13] L. J. Gleeson, *Rev. Sci. Tech. OIE* **2002**, *21*, 465–475.
- [14] S. Khounsy, J. V. Conlan, L. J. Gleeson, H. A. Westbury, A. Colling, D. J. Paton, N. P. Ferris, J.-F. Valarcher, J. Wadsworth, N. J. Knowles, S. D. Blacksell, *Vet. Microbiol.* **2009**, *137*, 178–183.
- [15] N. J. Knowles, A. R. Samuel, P. R. Davies, R. J. Midgley, J.-F. Valarcher, *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 1887–1893.

Bằng độc quyền sáng chế "Quy trình điều chế chế phẩm diệt vi khuẩn và virus chứa phức hệ nano bạc và axit peraxetic", số 42765 do Cục Sở hữu trí tuệ cấp theo Quyết định số 152615/QĐ-SHTT ngày 24/12/2024.

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ				CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM Độc lập – Tự do – Hạnh phúc	
BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ SỐ: 42765					
Tên sáng chế:	QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ CHẾ PHẨM DIỆT VI KHUẨN VÀ VIRUT CHỨA PHỨC HỆ NANO BẠC VÀ AXIT PERAXETIC				
Chủ Bằng độc quyền:	Viện Công nghệ môi trường - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN) 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội				
Tác giả:	1. Trần Thị Ngọc Dung (VN) Nhà A30, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội 2. (Danh sách kèm theo)				
Số đơn:	1-2022-07536				
Ngày nộp đơn:	18/11/2022				
Số điểm yêu cầu bảo hộ:	02		Số trang mô tả: 13		
Cấp theo Quyết định số: 152615/QĐ-SHTT, ngày: 24/12/2024					
Có hiệu lực từ ngày cấp đến hết 20 năm tính từ ngày nộp đơn (Hiệu lực bảo hộ cần duy trì hàng năm).					
		KT. CỤC TRƯỞNG PHÓ CỤC TRƯỞNG  CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ Huy Anh			
 VN 42765					

BẢNG DỤC QUYỀN SÁNG CHẾ SỐ: 42765

Tác giả khác:

2. NGUYỄN THỊ YÊN CHI (VN)

110 Hải Thượng Lãn Ông, Phúc Thiện, Phúc Thành, thành phố Ninh Bình

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Blome, S., K. Franzke, and M. Beer, 2020, African swine fever—A review of current knowledge. *Virus research*. 287: p. 198099.
2. Zhao, D., et al., 2019, Replication and virulence in pigs of the first African swine fever virus isolated in China. *Emerging microbes & infections*. 8(1): p. 438-447.
3. Kedkovid, R., C. Sirisereewan, and R. Thanawongnuwech, 2020, Major swine viral diseases: an Asian perspective after the African swine fever introduction. *Porcine health management*. 6(1): p. 20.
4. Gosling, R., 2018, A review of cleaning and disinfection studies in farming environments. *Livestock*. 23(5): p. 232-237.
5. Linh, N., *Mức tiêu thụ thịt lợn của Việt Nam tăng dần qua các năm*, in *Báo điện tử Đầu tư*. 2024.
6. Hương, Đ., *Chung tay đẩy lùi dịch tả lợn châu Phi*, in *Báo điện tử Chính phủ*. 2024.
7. Pandey, S., et al., 2024, Antibiotic resistance in livestock, environment and humans: One Health perspective. *Journal of animal science and technology*. 66(2): p. 266.
8. Chuong, V.D., et al., 2025, African Swine Fever Epidemic in Vietnam: A Scoping Review.
9. Orosco, F.L., 2023, Current progress in diagnostics, therapeutics, and vaccines for African swine fever virus. *Veterinary Integrative Sciences*. 21(3): p. 751-781.
10. Mazur-Panasiuk, N., J. Żmudzki, and G. Woźniakowski, 2019, African swine fever virus—persistence in different environmental conditions and the possibility of its indirect transmission. *Journal of veterinary research*. 63(3): p. 303.
11. Brown, V.R. and S.N. Bevins, 2018, A review of African swine fever and the potential for introduction into the United States and the possibility of subsequent establishment in feral swine and native ticks. *Frontiers in veterinary science*. 5: p. 11.
12. Zhang, H., et al., 2023, Vaccines for African swine fever: An update. *Frontiers in microbiology*. 14: p. 1139494.
13. Tran, X.H., et al., 2022, African swine fever virus vaccine candidate ASFV-G-ΔII177L efficiently protects European and native pig breeds against circulating Vietnamese field strain. *Transboundary and emerging diseases*. 69(4): p. e497-e504.
14. Auer, A., et al., 2024, Challenges in the Application of African Swine Fever Vaccines in Asia. *Animals*. 14(17): p. 2473.
15. Diep, N.V., et al., 2024, Genotype II Live-Attenuated ASFV Vaccine Strains Unable to Completely Protect Pigs against the Emerging

- Recombinant ASFV Genotype I/II Strain in Vietnam. *Vaccines*. 12(10): p. 1114.
16. Orosco, F.L., 2023, Host immune responses against African swine fever virus: Insights and challenges for vaccine development. *Open Veterinary Journal*. 13(12): p. 1517.
 17. Juskiewicz, M., M. Walczak, and G. Woźniakowski, 2019, Characteristics of selected active substances used in disinfectants and their virucidal activity against ASFV. *Journal of veterinary research*. 63(1): p. 17.
 18. Sonnenwirth, A., 1981, The enteric bacilli and bacteroides. *Microbiology*. 3rd ed. New York: Harper & Row: p. 659-660.
 19. Ramón, B.S., 2024, ECETOC-European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals.
 20. Luppi, A., et al., 2016, Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe. *Porcine Health Management*. 2: p. 1-6.
 21. Dubreuil, J.D., R.E. Isaacson, and D.M. Schifferli, 2016, Animal enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*. 7(1): p. 10.1128/ecosalplus. ESP-0006-2016.
 22. Achaupharm, *Tiêu chảy trên heo sau cai sữa - Giải pháp kiểm soát bệnh hiệu quả 2023*.
 23. Bau, V.V., 2017, *Bệnh E.coli heo và biện pháp điều trị*: Hội Nông dân tỉnh Kiên Giang,
 24. Frana, T., *Staphylococcosis In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ and Stevenson GW editors. Diseases of Swine*. 2012, Sussex: John Wiley & Sons.
 25. Turner, G., 1982, A microbiological study of polyarthritis in slaughter pigs. *Journal of the South African Veterinary Association*. 53(2): p. 99-101.
 26. Liljegren, C.H., et al., 2003, Some new aspects of the pathology, pathogenesis, and aetiology of disseminated lung lesions in slaughter pigs. *Apmis*. 111(5): p. 531-538.
 27. Huệ, V.T.K., et al., 2020, Xác định tỷ lệ nhiễm và mức độ kháng kháng sinh của vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Staphylococcus aureus* kháng Methicillin (MRSA) phân lập trên lợn. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*(2).
 28. Chào, N.V., N.X. Hoà, and L.V. Phước, 2023, MỨC ĐỘ KHÁNG KHÁNG SINH CỦA VI KHUẨN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* VÀ *STREPTOCOCCUS SP.* PHÂN LẬP TỪ LỢN NUÔI Ở HUYỆN SƠN TINH, TỈNH QUẢNG NGÃI. *Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp*. 7(2): p. 3626–3637.
 29. Thuận, N.K., T.T.L. Triệu, and L.T.L. Khai, 2024, Sự vấy nhiễm và nhạy cảm đối với kháng sinh của vi khuẩn *Staphylococcus aureus* phân lập tại

- cơ sở giết mổ heo tỉnh An Giang. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*. 60(5): p. 101-110.
30. Jurado, C., et al., 2018, Relevant measures to prevent the spread of African swine fever in the European Union domestic pig sector. *Frontiers in veterinary science*. 5: p. 77.
 31. Hamzeh, M. and G.I. Sunahara, 2013, In vitro cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in Chinese hamster lung fibroblast cells. *Toxicology in Vitro*. 27(2): p. 864-873.
 32. Tran Thi, N.D., D.H. Nguyen, and T.H. Le, *Nano bạc điều chế, đặc tính và ứng dụng*. 2019: Khoa học tự nhiên và công nghệ.
 33. Furxhi, I., et al., 2024, Design rules applied to silver nanoparticles synthesis: A practical example of machine learning application. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 25: p. 20-33.
 34. Ahmad, S.A., et al., 2020, Bactericidal activity of silver nanoparticles: A mechanistic review. *Materials science for energy technologies*. 3: p. 756-769.
 35. Siddiqi, K.S., A. Husen, and R.A. Rao, 2018, A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *Journal of nanobiotechnology*. 16: p. 1-28.
 36. Kalishwaralal, K., et al., 2010, Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 79(2): p. 340-344.
 37. Salleh, A., et al., 2020, The potential of silver nanoparticles for antiviral and antibacterial applications: A mechanism of action. *Nanomaterials*. 10(8): p. 1566.
 38. Kumar, C.S., J. Hormes, and C. Leuschner, *Nanofabrication towards biomedical applications: techniques, tools, applications, and impact*. 2006: John Wiley & Sons.
 39. Jeremiah, S.S., et al., 2020, Potent antiviral effect of silver nanoparticles on SARS-CoV-2. *Biochemical and biophysical research communications*. 533(1): p. 195-200.
 40. Rafiei, S., et al., 2018, Restrictive influence of silver nanoparticles on the life cycle of the foot-and-mouth disease virus. *Nanoscience & Nanotechnology-Asia*. 8(2): p. 248-254.
 41. Luceri, A., et al., 2023, Silver nanoparticles: review of antiviral properties, mechanism of action and applications. *Microorganisms*. 11(3): p. 629.
 42. Dung, T.T.N., et al., 2020, Silver nanoparticles as potential antiviral agents against African swine fever virus. *Materials Research Express*. 6(12): p. 125099.
 43. Dash, M., et al., 2011, Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in polymer science*. 36(8): p. 981-1014.

44. Goy, R.C., D.d. Britto, and O.B. Assis, 2009, A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*. 19: p. 241-247.
45. Buu, N.Q., et al., 2011, Studies on manufacturing of topical wound dressings based on nanosilver produced by aqueous molecular solution method. *Journal of Experimental Nanoscience*. 6(4): p. 409-421.
46. Dung, T.T.N., et al., 2022, Potential application of chitosan stabilized silver nanoparticles for simultaneous control of dengue virus and mosquito vectors. *Nanotechnology*. 34(2): p. 025101.
47. da Silva, W.P., et al., 2020, Peracetic acid: Structural elucidation for applications in wastewater treatment. *Water Research*. 168: p. 115143.
48. Brinkworth, G.D., et al., 2009, Comparative effects of very low-carbohydrate, high-fat and high-carbohydrate, low-fat weight-loss diets on bowel habit and faecal short-chain fatty acids and bacterial populations. *British journal of nutrition*. 101(10): p. 1493-1502.
49. Kunigk, L., et al., 2014, Influence of temperature and pH on the decomposition kinetics of peracetic acid in aqueous solutions. *Latin American applied research*. 44: p. 195-201.
50. Ao, X.-w., et al., 2021, Peracetic acid-based advanced oxidation processes for decontamination and disinfection of water: A review. *Water Research*. 188: p. 116479.
51. Ordinola-Zapata, R., et al., 2013, The antimicrobial effect of new and conventional endodontic irrigants on intra-orally infected dentin. *Acta Odontologica Scandinavica*. 71(3-4): p. 424-431.
52. Eckert, K., 2013, Disinfection Performance of Peracetic Acid in Florida Wastewater Reuse Applications.
53. Stearns, R., A. Freshour, and C. Shen, 2022, Literature review for applying peroxyacetic acid and/or hydrogen peroxide to control foodborne pathogens on food products. *Journal of Agriculture and Food Research*. 10: p. 100442.
54. Ratan, Z.A., et al., 2021, Silver nanoparticles as potential antiviral agents. *Pharmaceutics*. 13(12): p. 2034.
55. de Velasquez, M.T.O., et al., 2008, Adding silver and copper to hydrogen peroxide and peracetic acid in the disinfection of an advanced primary treatment effluent. *Environmental technology*. 29(11): p. 1209-1217.
56. Lalueza, P., et al., 2012, Strong bactericidal synergy between peracetic acid and silver-exchanged zeolites. *Microporous and Mesoporous Materials*. 156: p. 171-175.
57. Carmona, D., et al., 2012, Mesoporous silica loaded with peracetic acid and silver nanoparticles as a dual-effect, highly efficient bactericidal agent. *Microporous and Mesoporous Materials*. 161: p. 84-90.
58. Lee, K., et al., 2024, Molecular characterization of emerging recombinant African swine fever virus of genotype I and II in Vietnam, 2023. *Emerg Microbes Infect.* 13(1): p. 2404156.

59. Kitahara, T., et al., 2006, In vitro activity of lauric acid or myristylamine in combination with six antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *International journal of antimicrobial agents*. 27(1): p. 51-57.
60. Trinh, T.B.N., et al., 2024, Antiviral activity of SAFER®, a commercial acidifying desiccant powder, against African swine fever virus. *Frontiers in Veterinary Science*. 11: p. 1245569.
61. Zhang, L., et al., 2020, Efficient inactivation of African swine fever virus by ozonized water. *Veterinary Microbiology*. 247.
62. Zhang, Y.J., 2011, Investigation of gold and silver nanoparticles on absorption heating and scattering imaging. *Plasmonics*. 6: p. 393-397.
63. Mollick, M.M.R., et al., 2012, Green synthesis of silver nanoparticles using *Paederia foetida* L. leaf extract and assessment of their antimicrobial activities. *International Journal of Green Nanotechnology*. 4(3): p. 230-239.
64. Shameli, K., et al., 2012, Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Curcuma longa* tuber powder. *International journal of nanomedicine*: p. 5603-5610.
65. Briancesco, R., et al., 2005, Peracetic acid and sodium hypochlorite effectiveness in reducing resistant stages of microorganisms. *Central european journal of public health*. 13(3): p. 159.
66. Veschetti, E., et al., 2003, Pilot-plant comparative study of peracetic acid and sodium hypochlorite wastewater disinfection. *Water research*. 37(1): p. 78-94.
67. Meng, F., X. Zhu, and P. Miao, 2015, Study of autocatalytic oxidation reaction of silver nanoparticles and the application for nonenzymatic H₂O₂ assay. *Chemical Physics Letters*. 635: p. 213-216.
68. Seifert, R., H.B. Keller, and H. Kohler. *Innovative sensor system and evaluation procedure for monitoring of food processing*. in *22nd Euro-Global Summit on Food and Beverages (2019)*, London, *Vereinigtes Königreich*, 28.02. 2019–01.03. 2019. 2019.
69. Dellasega, D., et al., 2008, Nanostructured Ag₄O₄ films with enhanced antibacterial activity. *Nanotechnology*. 19(47): p. 475602.
70. Luna-Pabello, V., et al., 2009, Effectiveness of the use of Ag, Cu and PAA to disinfect municipal wastewater. *Environmental technology*. 30(2): p. 129-139.
71. Abbas, R., et al., 2024, Silver nanoparticles: Synthesis, structure, properties and applications. *Nanomaterials*. 14(17): p. 1425.
72. Cha, J.-D., et al., 2007, Antibacterial activity of sophoraflavanone G isolated from the roots of *Sophora flavescens*. *Journal of microbiology and biotechnology*. 17(5): p. 858-864.
73. Climo, M.W., R.L. Patron, and G.L. Archer, 1999, Combinations of vancomycin and β -lactams are synergistic against staphylococci with

- reduced susceptibilities to vancomycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 43(7): p. 1747-1753.
74. Liu, J. and R.H. Hurt, 2010, Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environmental science & technology*. 44(6): p. 2169-2175.
 75. Jia, N., et al., 2017, Roles of African swine fever virus structural proteins in viral infection. *Journal of veterinary research*. 61(2): p. 135.