

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ LOẠI HÓA CHẤT VÀ THUỐC LÊN VI BÀO TỬ TRÙNG (*microsporidia*) NHIỄM TRONG CƠ CÁ TRA (*pangasianodon hypophthalmus*)

Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 28/07/2015

Ngày chấp nhận: 25/05/2016

Title:

The effects of some drugs and chemicals to Microsporidiosis impacted on Striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Từ khóa:

Vi bào tử trùng, thuốc, hóa chất, điều trị

Keywords:

Microsporidia, drug, chemical, treatment

ABSTRACT

The effect of some chemicals and drugs impacted on spores of microsporidia was identified to be prerequisite for experiments in prevention and treatment of diseases caused by Microsporidiosis disease on pond catfish. Spores in cysts collected from infected fish were cleaned, determined the density of 10^7 spores/mL then the spores were exposed to drugs and chemicals at different levels. The results showed that the chemicals were commonly used as formalin and alcohol (40-70% concentration), chlorine dioxide, hydrogen peroxide, iodine, chlorine (0.1-0.7% concentration) killing effectively microsporidia spores. However, the time that spores were killed, was identical in all treatments ranging from 1.05-39.50 minutes depending on the concentration and type of chemicals. Three antibiotics such as albendazole, fumagillin and TNP-470 also showed the ability to destroy spores of microsporidia in the concentrations of 0.1; 0.2; 1; 2; 3; 4; 5 $\mu\text{g/mL}$. The time that spores were killed from 3.20 to 11.75 hours, 4.03 to 13.67 hours and 5.37 to 13.75 hours corresponding to albendazole, fumagillin and TNP-4 used.

TÓM TẮT

Nghiên cứu ảnh hưởng của một số loại hóa chất và thuốc lên vi bào tử trùng *Microsporidia* được thực hiện trong phòng thí nghiệm làm tiền đề cho thí nghiệm phòng và điều trị bệnh gạo gây ra trên cá tra nuôi trong ao. Vi bào tử trùng trong bào nang thu từ cá tra bệnh gạo được tinh sạch, sau đó xác định mật độ 10^7 bào tử/mL và cho bào tử tiếp xúc trực tiếp với thuốc và hóa chất ở nhiều nồng độ khác nhau. Kết quả cho thấy các hóa chất được sử dụng phổ biến như alcohol, formalin nồng độ 40-70%; chlorine dioxide, hydrogen peroxide, chlorine, iodine nồng độ 0,1-0,7% có tác động ảnh hưởng đến vi bào tử trùng *Microsporidia*. Tuy nhiên, thời gian hóa chất tác động đến vi bào tử trùng ở các nghiệm thức dao động từ 1,05-39,50 phút phụ thuộc vào nồng độ hóa chất. Ba loại kháng sinh là albendazole, fumagillin và TNP-470 cũng có khả năng tác động đến *Microsporidia* ở các nồng độ từ 0,1; 0,2; 1; 2; 3; 4; 5 $\mu\text{g/mL}$. Thời gian để thuốc tác động làm bất hoạt vi bào tử trùng từ 3,20-11,75 giờ, 4,03-13,67 giờ và 5,37-13,75 giờ tương ứng với albendazole, fumagillin và TNP-470 được sử dụng.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2016. Ảnh hưởng của một số loại hóa chất và thuốc lên vi bào tử trùng (*Microsporidia*) nhiễm trong cơ cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 43b: 125-132.

1 GIỚI THIỆU

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là đối tượng nuôi phổ biến và có giá trị kinh tế ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long. Nghề nuôi cá tra đã mang lại nhiều lợi nhuận đáng kể cho nền kinh tế đất nước. Tuy nhiên, việc nuôi cá tra cũng gặp nhiều khó khăn do dịch bệnh xảy ra trong quá trình nuôi. Một trong những bệnh thường xuyên xuất hiện trong ao nuôi là bệnh gao, bệnh gây thiệt hại cho người nuôi cá tra ở các giai đoạn cá hương, cá giống và cá thương phẩm. Theo kết quả nghiên cứu gần đây của Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh (2011, 2012) cho thấy vi bào tử trùng *Microsporidia* là nguyên nhân gây ra bệnh gao trên cá tra giống và cá tra nuôi thương phẩm. Tỷ lệ nhiễm bào nang gao trong cơ cá từ 40-85,7%, cường độ nhiễm dao động từ 3-49 bào nang/cá. Bệnh xảy ra ở giai đoạn cá có trọng lượng 10-400 g làm giảm tỉ lệ sống ở cá giống và giảm chất lượng thịt ở cá thương phẩm.

Trên thế giới đã có rất nhiều công trình nghiên cứu về vi bào tử trùng *Microsporidia* ký sinh trên một số loài cá có giá trị kinh tế như cá hồi, cá bơn, cá chêm, cá cảnh (Lom và Nilsen, 2003; Woo, 2006). Bên cạnh đó, để hạn chế dịch bệnh do *Microsporidia* gây ra trên cá thì các biện pháp phòng và trị bệnh bằng hóa chất và thuốc kháng ký sinh trùng đã được nghiên cứu, kết quả đạt được một số thành công ban đầu. Do vi bào tử trùng *Microsporidia* nội ký sinh ở dạng bào nang, nằm ẩn ở nhiều vị trí trong cơ, xương, dưới da và các cơ quan nội tạng của cá, nên khi cá nhiễm bệnh nặng thì việc điều trị bệnh rất khó đạt được hiệu quả tối đa. Việc phòng bệnh cho cá bằng hóa chất là biện pháp thường được áp dụng. Các hóa chất như chlorine, hydrogen peroxide, formalin đã được ghi nhận là có hiệu quả diệt *Microsporidia* (Santillana-Hayat *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2003; Ferguson *et al.*, 2007). Ngoài ra, một số nghiên cứu khác cũng cho thấy hiệu quả của các loại thuốc kháng ký sinh trùng. Điển hình là các thuốc fumagillin, toltrazuril, TNP-470, benzimidazole có tác dụng kìm hãm và tiêu diệt sự phát triển của các bào tử loài *Glugea anomala*, *G. plecoglossi*, *Kabatana takedai*, *Loma salmonae*, *Enterocytozoon bieneusi* (Schmahl *et al.*, 1990; Woo, 2006; Athanassopoulou *et al.*, 2009).

Tại Việt Nam, vi bào tử trùng *Microsporidia* đã được ghi nhận là nguyên nhân gây ra bệnh gao trên cá tra. Tuy nhiên, các nghiên cứu vẫn còn dừng lại ở mức khảo sát tác nhân gây bệnh bằng phương pháp soi tươi, mô bệnh học, PCR (Nguyễn Thị Thu

Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2011). Những nghiên cứu về thuốc và hóa chất để phòng và điều trị bệnh gao còn hạn chế. Chính vì vậy, đề tài nghiên cứu: “Ảnh hưởng của một số loại thuốc và hóa chất lên vi bào tử trùng (*Microsporidia*) nhiễm trong cơ cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*)” được thực hiện.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 8-12/2014 tại Phòng thí nghiệm Bệnh học Thủy sản - Khoa Thủy sản - Trường Đại học Cần Thơ.

2.2 Phương pháp phân tích mẫu

2.2.1 Thu vi bào tử *Microsporidia* trong mô bệnh phẩm

Phương pháp thực hiện được thực hiện theo Estevez *et al.* (1992). Thu mẫu cá nhiễm bào nang gao trong cơ. Tách các bào nang ra khỏi lớp cơ. Cho bào nang vào ống eppendorf có chứa ít nước cất tiệt trùng. Dùng que nghiền mẫu. Cho dung dịch qua lưới lọc (kích thước lưới $\leq 40\mu\text{m}$) để lọc các bào tử *Microsporidia*. Lấy dung dịch vừa lọc được ly tâm ở 2000 vòng/phút trong 30 phút. Giữ phần viên và loại bỏ phần trong bên trên. Sau đó, thêm nước cất tiệt trùng và hòa tan phần viên. Ly tâm dung dịch ở 2000 vòng/phút trong 30 phút. Quá trình rửa mẫu được thực hiện 2 lần để thu các bào tử không chứa tạp chất.

2.2.2 Thí nghiệm *in vitro* với hóa chất và thuốc kháng sinh

Phương pháp thực hiện được thực hiện theo Thomas, V. (2013) được mô tả như sau:

Chuẩn bị dung dịch bào tử *Microsporidia*

Cho dung dịch vi bào tử vừa được tinh sạch vào ống nghiệm chứa nước muối sinh lý 0,85%. Dung dịch bào tử chuẩn bị thử nghiệm với thuốc và hóa chất được xác định mật độ bằng cách đếm số lượng bào tử trong buồng đếm hồng cầu. Sau đó pha loãng mẫu với nước muối sinh lý để được các mật độ thí nghiệm là 10^7 bào tử/ml. Quan sát vi bào tử trùng dưới kính hiển vi ở vật kính 100X để kiểm tra độ tinh sạch trước khi bắt đầu thí nghiệm.

Chuẩn bị hóa chất

Các loại hóa chất được hòa tan theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Pha loãng dung dịch hóa chất theo các nồng độ: 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70% đối với alcohol (Merck) và formalin 37% (Merck). Pha ở nồng độ 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7% đối với

chlorine, iodine, chlorine dioxide, hydrogen peroxide (Merck).

Chuẩn bị thuốc kháng sinh

Kháng sinh albendazole (C₁₂H₁₅N₃O₂S), fumagillin (C₂₆H₃₄O₇) và TNP-470 (C₁₉H₂₈ClNO₆) được hòa tan trong dimethyl sulfoxide (DMSO - Prolabo) và ethanol (Merck) ở nồng độ gốc là 10 mg/ml. Các nồng độ thuốc dùng trong thí nghiệm gồm 7 nồng độ: 0,1; 0,5; 1; 2; 3; 4; và 5 µg/ml. Các thuốc kháng sinh sử dụng của SIGMA - ALDRICH.

Tiến hành thí nghiệm

Cho dung dịch bào tử đã được tinh sạch vào các đĩa 24 giếng, sau đó cho dung dịch thuốc hoặc hóa chất khác nhau vào từng giếng gồm thể tích thuốc/hóa chất với thể tích dung dịch bào tử sao cho đạt nồng độ cần thử nghiệm. Mỗi thí nghiệm có 1 giếng đối chứng (chỉ có dung dịch bào tử), các giếng có nồng độ thuốc hoặc hóa chất sẽ được lặp lại 3 lần cho mỗi nồng độ thử nghiệm. Kiểm tra tác động ảnh hưởng của hóa chất lên bào tử sau 1 phút và 30 phút đối với thuốc kháng sinh. Các thí nghiệm đánh giá thuốc và hóa chất làm bất hoạt bào tử

trùng được quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 100X-200X và bằng phương pháp chụp dưới kính hiển vi điện tử SEM.

2.2.3 Xử lý số liệu

Số liệu thu thập được chuyển đổi về dạng số thập phân. Sự khác biệt giữa các thí nghiệm được xác định thông qua phân tích phương sai một nhân tố (ANOVA) bằng phần mềm SPSS 16.0, ở mức ý nghĩa p=0,05.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Tác dụng của hóa chất đối với vi bào tử trùng

Kết quả thử nghiệm ảnh hưởng của các loại hóa chất đến vi bào tử trùng *Microsporidia* được trình bày trong Bảng 1 và 2. Thí nghiệm được thực hiện với 6 loại hóa chất thuộc nhóm tẩy rửa và diệt trùng đang được sử dụng phổ biến trên thị trường. Đánh giá hiệu quả của các hóa chất dựa vào kết quả quan sát sự bất hoạt của bào tử dưới kính hiển vi. Các bào tử tiếp xúc với hóa chất cho đến khi bị bất hoạt thường thay đổi hình thái, qua quan sát bào tử dưới kính hiển vi vật kính 100-200X, lớp vỏ kitin bên ngoài bào tử bị biến dạng (Hình 1 và 2).

Bảng 1: Thời gian và nồng độ gây bất hoạt bào tử của alcohol và formalin

Hóa chất	Nồng độ (%)						
	70	65	60	55	50	45	40
Alcohol	3,44 ^a ±0,15	3,90 ^a ±0,22	4,05 ^a ±0,21	6,18 ^b ±0,25	7,26 ^c ±0,31	9,09 ^d ±0,40	28,63 ^e ±0,48
Formalin	3,30 ^a ±0,15	5,88 ^b ±0,23	12,25 ^c ±0,23	13,75 ^d ±0,24	15,33 ^e ±0,30	16,90 ^f ±0,40	31,95 ^g ±0,47

Ghi chú: thời gian thí nghiệm thể hiện bằng phút, được tính đến khi bào tử bất hoạt và chết ở các giếng thí nghiệm. Các số liệu trong cùng một hàng có chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p>0,05)

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy vi bào tử trùng ở các thí nghiệm có thời gian bất hoạt dao động từ 3,30 - 31,95 phút. Trong khi đó, ở thí nghiệm đối chứng vi bào tử vẫn còn hoạt động bình thường. Hợp chất diệt trùng nhóm rượu là alcohol có tác dụng đến *Microsporidia* khá tốt trong thời gian ngắn. Trong 7 thí nghiệm thí nghiệm, alcohol ở nồng độ 70% làm bất hoạt bào tử nhanh nhất trong thời gian 3,44 phút. Ở các nồng độ thấp hơn thì ảnh hưởng của alcohol đến bào tử càng thấp, alcohol nồng độ 40% làm bất hoạt *Microsporidia* chậm nhất là 28,63 phút. Các thí nghiệm có nồng độ và thời gian bất hoạt bào tử khác nhau có ý nghĩa thống kê (p<0,05), riêng thí nghiệm 70, 65, 60% khác biệt không có ý nghĩa (p>0,05). Theo nghiên cứu của Li và Fayer (2006), ethanol 70% có tác dụng đối với các loài vi bào tử trùng *E. cuniculi*, *E. intestinalis*, *E. hellem* và *Glugea stephani*. Dung dịch bào tử với mật độ 15x10⁴ bào tử/ml được tiếp xúc với ethanol 70% trong thời gian 5, 10, 20 phút

ở 22oC. Kết quả ghi nhận mức độ ảnh hưởng của ethanol lên các loài vi bào tử trùng khác nhau. Bào tử của loài *E. cuniculi*, *E. intestinalis* và *G. stephani* đã bị phá hủy hoàn toàn sau 5 phút thử nghiệm. Riêng bào tử của loài *E. hellem* thì sau 20 phút thử nghiệm mới có thể bị tiêu diệt hoàn toàn. Một kết quả nghiên cứu khác cũng cho rằng alcohol diệt vi sinh vật tốt nhất ở nồng độ 60-70%, nồng độ cao sẽ cho hiệu quả kém hơn do sự đông vón của các protein bên ngoài của thành tế bào, làm ngăn chặn sự xâm nhập của alcohol vào trong tế bào, dẫn đến làm giảm tác dụng của alcohol (Thomas, V. 2013).

Các hợp chất thuộc nhóm aldehyde cũng được nhiều nghiên cứu ghi nhận là có tác dụng tiêu diệt vi sinh vật rất tốt. Trong đó, formalin là hợp chất aldehyde được sử dụng rộng rãi trong nhiều chế phẩm thương mại để diệt vi sinh vật trong môi trường. Formalin tác động tiêu diệt vi sinh vật bằng cơ chế liên kết ngang với các protein trên màng tế

bào hoặc ức chế tổng hợp DNA, RNA và các đại phân tử khác trong tế bào vi sinh vật. Nhiều nghiên cứu đã ghi nhận tác động của formalin lên các loài bào tử trùng như *Acanthamoeba* sp., *Cryptosporidium* sp., *Toxoplasma* sp. Ở nồng độ 2-2,5%, formalin có khả năng tiêu diệt phần lớn các bào tử động của các loài bào tử trùng này trong khoảng 2-3 giờ tiếp xúc (Thomas, V. 2013). Đối với bào tử *Microsporidia* trong nang gạo trên cá tra nuôi, formalin cũng có tác động đến vi bào tử trùng. Kết quả cho thấy ở nồng độ 70%, formalin có thể làm bất hoạt 100% bào tử trong thời gian 3,3 phút. Nồng độ càng giảm thì formalin tác dụng càng thấp lên bào tử, với thời gian tiếp xúc lâu hơn để có thể bất hoạt hoàn toàn các bào tử. Các nghiệm thức nồng độ có thời gian tác động bào tử khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Các hợp chất halogen thường được sử dụng rộng rãi diệt vi sinh vật gồm chlorine và iodine. Kết quả thí nghiệm cho thấy 2 hợp chất này có tác dụng lên bào tử *Microsporidia* với nồng độ từ 0,1-

0,7%. Ở nồng độ 0,7% thời gian bất hoạt bào tử của chlorine là 6,29 phút. Tác dụng của chlorine giảm đáng kể khi nồng độ hóa chất giảm, chlorine 0,1% cần thời gian 39,5 phút mới hoàn toàn làm các bào tử ngừng hoạt động. Tương tự, iodine cũng có tác dụng bất hoạt bào tử khá tốt ở nồng độ 0,6%-0,7%. Tuy nhiên, tác dụng của iodine thấp hơn chlorine, ở nồng độ 0,7% iodine bất hoạt bào tử trong thời gian tiếp xúc là 7,29 phút. Nhìn chung, nồng độ hóa chất cao thì thời gian tiêu diệt bào tử ngắn hơn, có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với các nồng độ thấp.

Đối với chlorine, hiệu quả tiêu diệt vi sinh vật cũng được nhiều nghiên cứu ghi nhận. Khi hòa tan trong nước, các hoạt chất tạo ra các phản ứng oxy hóa mạnh giúp tiêu diệt các vi sinh vật. Tuy nhiên, cần chú ý đến mật độ các phân tử hữu cơ và vô cơ hiện diện trong nước, vì chúng sẽ làm giảm hiệu quả diệt vi sinh vật của các halogen (Mogoa, 2010; Thomas, V. 2013).

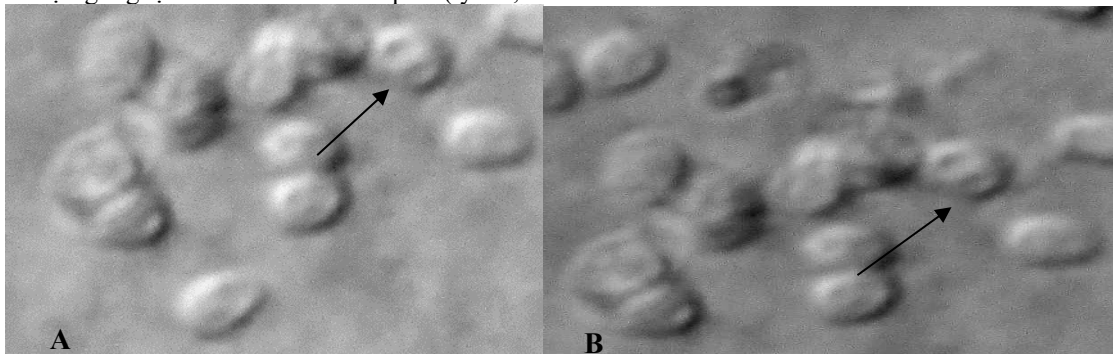
Bảng 2: Thời gian và nồng độ gây bất hoạt bào tử của 4 loại hóa chất

Hóa chất	Nồng độ (%)						
	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Chlorine	6,29 ^a ±0,12	6,92 ^b ±0,21	12,00 ^c ±0,20	15,43 ^d ±0,35	16,91 ^e ±0,35	17,65 ^f ±0,42	39,50 ^g ±0,58
Iodine	7,29 ^a ±0,25	10,05 ^b ±0,32	15,36 ^c ±0,24	17,5 ^d ±0,55	19,08 ^e ±0,21	21,9 ^f ±0,50	31,75 ^g ±0,38
Chlorine dioxide	1,45 ^a ±0,26	5,13 ^b ±0,22	6,86 ^c ±0,14	10,42 ^d ±0,35	12,03 ^e ±0,41	15,02 ^f ±0,20	17,25 ^g ±0,48
Hydrogen peroxide	1,05 ^a ±0,35	2,55 ^b ±0,14	4,03 ^c ±0,23	10,42 ^d ±0,35	12,26 ^e ±0,41	12,65 ^f ±0,52	15,08 ^g ±0,28

Ghi chú: thời gian gây chết thể hiện bằng phút và được tính đến khi bào tử bất hoạt và chết ở các giếng thí nghiệm. Các số liệu trong cùng một hàng có chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$)

Nghiên cứu của Mogoa, E. (2010) ghi nhận kích thước của các bào tử động loài *Acanthamoeba* sp. đã giảm đáng kể khi tiếp xúc với 5 mg/ml chlorine làm 90% các bào tử bị hoại tử. Quan sát dưới kính hiển vi điện tử cho thấy các tế bào này xảy ra sự ngưng tụ và mất dần các bào quan (ty thể,

hạt nhân). Liều lượng chlorine từ 1-7 ppm có thể diệt hiệu quả các nhóm ký sinh trùng tạo bào nang trong 5-30 phút tiếp xúc. Các nghiên cứu ghi nhận nồng độ chlorine tiêu diệt bào tử phụ thuộc vào loài vi bào tử trùng và giá trị pH của môi trường.



Hình 1: Cấu trúc bên ngoài của bào tử *Microsporidia* sau khi thí nghiệm với (A) C₂H₅OH 50% ở 7,26 phút và (B) H₂O₂ 0,6% ở 2,55 phút (200X)

Theo Athanassopoulou *et al.* (2009), những nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng iodine có

thể ức tăng trưởng của các bào tử động của bào tử trùng, đối với các bào nang thì tác động rất hạn

chế, nồng độ ức chế tối thiểu 50% dao động từ 90-370 ppm iodine đơn chất hoặc từ 60-195 ppm iodine hợp chất.

Một số hợp chất khác thuộc nhóm oxy hóa tiêu diệt vi sinh vật thường được sử dụng rộng rãi bao gồm chlorine dioxide (ClO₂) và hydrogen peroxide (H₂O₂). Kết quả nghiên cứu cho thấy 2 loại hợp chất này có tác dụng bất hoạt bào tử *Microsporidia* rất tốt, thời gian tiếp xúc để bất hoạt bào tử ngắn, có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức hóa chất khác (p<0,05). Chlorine dioxide có tác dụng bất hoạt bào tử rất nhanh ở nồng độ 0,7%. Theo đó, trong thời gian tiếp xúc với ClO₂ khoảng 1,45 phút, các bào tử đã bị bất hoạt và mất cấu trúc hoàn toàn ở các nghiệm thức thí nghiệm. Ngoài ra, H₂O₂ cũng có tác dụng rất tốt để bất hoạt bào tử *Microsporidia*, thời gian tác dụng của H₂O₂ cũng thấp hơn so với ClO₂. Ở nồng độ từ 0,5%-0,7%, H₂O₂ cho thời gian bất hoạt (1,05 phút ở nồng độ 0,7%) ngắn hơn so với ClO₂. Tương tự, nồng độ ClO₂ và H₂O₂ cao thì thời gian tiêu diệt bào tử ngắn, có ý nghĩa thống kê (p<0,05) so với các nồng độ thấp.

Theo Thomas, V. (2013), các hợp chất oxy hóa có khả năng giải phóng các phân tử hoạt động phản ứng với bề mặt tế bào và có khả năng thâm nhập vào bên trong tế bào, gây ra các tổn thương cho nội bào từ đó tiêu diệt vi sinh vật. Trong đó, ClO₂ là một chất khử trùng mới với phổ diệt trùng rất rộng và được ứng dụng rộng rãi (Zhengyong *et al.*, 2010). Nghiên cứu của Ortega *et al.* (2007) ghi nhận khả năng diệt bào tử trùng *Encephalitozoon intestinalis* của ClO₂. Kết quả cho thấy ở nồng độ 4,1 mg/ml, ClO₂ đã tiêu diệt bào tử của *E. intestinalis* trong thời gian 20 phút. Những biến đổi trong cấu trúc của vi bào tử trùng được ghi nhận gồm sự phá hủy cấu trúc của sợi cực, cực nang và các không bào. Ngoài ra, lớp màng của bào tử đã bị phá hủy cấu trúc dẫn đến hoại tử các bào quan bên trong. Một số nghiên cứu gần đây ghi nhận giá trị nồng độ của ClO₂ khá cao khi tác dụng với loài vi bào tử trùng *Nosema bombycis* (Zhengyong *et al.*, 2010). Các kết quả cho thấy, nồng độ 15 mg/ml, ClO₂ cho hiệu quả tiêu diệt các bào tử tốt nhất

(100%) trong thời gian 30 phút tiếp xúc. Ngoài ra, kết quả quan sát dưới kính hiển vi điện tử cho thấy các bào quan của bào tử bị phá hủy bao gồm protein, DNA, polysaccharide trong một thời gian ngắn sau khi được xử lý với ClO₂ (Zhengyong *et al.*, 2010).

Bên cạnh đó, H₂O₂ cũng là hóa chất được sử dụng diệt vi bào tử trùng hiệu quả. Nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của H₂O₂ lên bào tử của vi bào tử trùng của Waller (1980) chứng minh tính hiệu quả của hóa chất này. Có 11 loại hóa chất tác dụng lên bào tử của vi bào tử trùng *E. cuniculi*. Trong đó, H₂O₂ là một trong 9 loại hóa chất có hiệu quả tiêu diệt hoàn toàn các bào tử thử nghiệm. Dung dịch bào tử trùng ở mật độ 8x10⁹ bào tử/ml được thử nghiệm với dung dịch H₂O₂ nồng độ 1% trong thời gian 30 phút. Sau khoảng thời gian tiếp xúc với hóa chất này, 100% bào tử *E. cuniculi* đã bị tiêu diệt.

Nghiên cứu của Ortega *et al.* (2007) cũng chứng minh tác dụng của H₂O₂ tiêu diệt vi bào tử trùng. Nghiên cứu tiền hành thử nghiệm trên bào tử *E. intestinalis* được nuôi bằng dòng tế bào RK-23 đối với 4 loại hóa chất trong thời gian 1, 5 và 15 phút. Kết quả cho thấy H₂O₂ đã tiêu diệt hoàn toàn bào tử *E. intestinalis* hiệu quả nhất ở thời gian 1 phút và nồng độ 0,5%.

Qua kết quả nghiên cứu thử nghiệm 6 loại hóa chất formalin, chlorine dioxide, hydrogen peroxide, iodine, chlorine và alcohol cho thấy các hóa chất có tác động bất hoạt mầm bệnh vi bào tử trùng *Microsporidia*. Tuy nhiên, thời gian làm chúng bất hoạt phụ thuộc vào nồng độ từng loại hóa chất.

3.2 Tác dụng của thuốc kháng sinh đối với vi bào tử trùng

Bên cạnh những hóa chất tiêu diệt vi bào tử trùng *Microsporidia* cũng có một số loại thuốc có khả năng ức chế chúng trong thủy sản. Thí nghiệm thực hiện với 3 loại thuốc kháng sinh là albendazole, fumagillin, TNP-470 cũng cho những kết quả khả quan (Bảng 3).

Bảng 3: Thời gian và nồng độ gây bất hoạt vi bào tử của albendazole, fumagillin và TNP-470

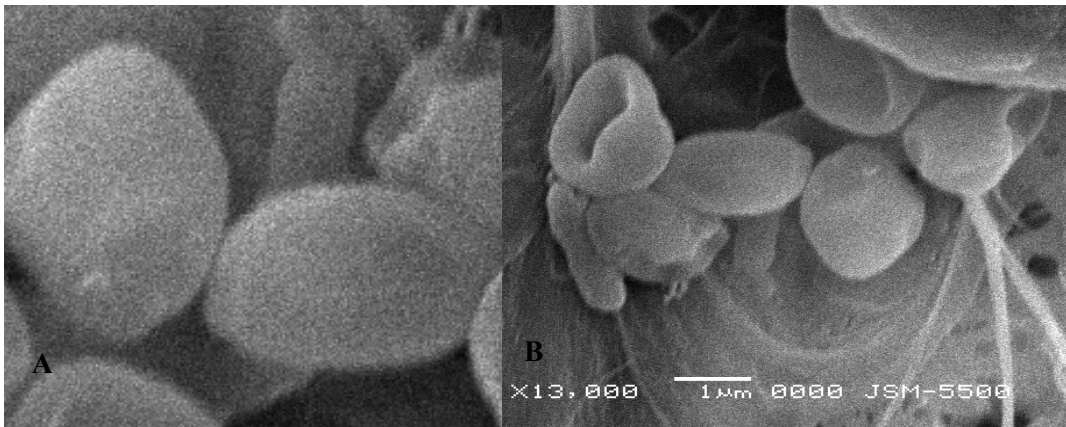
Hóa chất	Nồng độ (µg/ml)						
	5	4	3	2	1	0,5	0,1
Albendazole	3,20 ^a ±0,25	3,47 ^a ±0,24	3,03 ^a ±0,33	5,42 ^b ±0,15	6,48 ^c ±0,42	7,07 ^d ±0,32	11,75 ^e ±0,38
Fumagillin	4,03 ^a ±0,22	5,38 ^b ±0,15	5,53 ^b ±0,22	5,13 ^b ±0,32	6,98 ^c ±0,42	11,98 ^d ±0,42	13,67 ^e ±0,35
TNP-470	5,37 ^a ±0,30	5,55 ^a ±0,34	6,28 ^b ±0,33	7,05 ^c ±0,32	7,48 ^c ±0,31	8,90 ^d ±0,42	13,75 ^e ±0,48

Ghi chú: thời gian gây chết thể hiện bằng giờ và được tính đến khi bào tử bất hoạt và chết ở các giếng thí nghiệm. Các số liệu trong cùng một hàng có chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p>0,05)

Kết quả Bảng 3 cho thấy các loại thuốc kháng sinh có thời gian gây bất hoạt cho vi bào tử trùng *Microsporidia* (dao động từ 3,20 - 13,75 giờ) dài hơn các nghiệm thức sử dụng hóa chất. Ở nghiệm thức đối chứng thì vi bào tử trùng vẫn hoạt động bình thường và chúng ngưng hoạt động sau 2 tuần. Ở nghiệm thức sử dụng albendazole nồng độ 5 µg/ml cho kết quả bất hoạt bào tử nhanh nhất trong thời gian 3,2 giờ. Ở các nồng độ thấp hơn thì hiệu quả càng thấp, albendazole nồng độ 0,1 µg/ml có tác dụng bất hoạt *Microsporidia* chậm nhất với thời gian tiếp xúc lên đến 11,75 giờ. Các nghiệm thức nồng độ có thời gian bất hoạt bào tử khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), riêng nghiệm thức 3, 4, 5 µg/ml khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$).

Benzimidazole là nhóm thuốc có phổ diệt ký sinh trùng khá rộng nên được sử dụng rộng rãi, gồm albendazole, mebendazole, thiabendazole, oxiabendazole, flubendazole. Các loại thuốc này có tác dụng ngăn chặn sự hình thành các vi ống của bào tử *Microsporidia*. Khi các vi ống này bị phá

hủy, các chức năng vận chuyển, chuyển hóa và hấp thụ glucose và glycogen của bào tử bị ức chế dẫn đến bị tiêu diệt hoàn toàn (Kappagoda *et al.*, 2011). Khả năng tác dụng của albendazole phụ thuộc vào tùy giống loài vi bào tử *Microsporidia* và liều lượng thuốc sử dụng. Theo nghiên cứu của Schmahl và Benini (1998), khảo sát ảnh hưởng của albendazole lên vi bào tử *Glugea anomala* gây bệnh trên loài cá gai *Gasterosteus aculeatus* cho thấy nồng độ thuốc sử dụng rất cao so với kết quả của đề tài. Albendazole được thử nghiệm với các nồng độ 1, 5, 10, 15 và 50 µg/ml trong thời gian 2-6 giờ. Tương tự với những kết quả của đề tài, mức độ ảnh hưởng khá nghiêm trọng của nhóm kháng sinh này lên cấu trúc của các bào tử *G. anomala*. Đó là sự xuất hiện những cấu trúc bị phá hủy dẫn đến hình thành các bào tử khiếm khuyết các bào quan, màng tế bào tạo nên cấu trúc của bào tử trưởng thành bị phá vỡ, từ đó làm mất cấu trúc của bào tử. Các kết quả ghi nhận được đã chứng tỏ khả năng phòng và trị lây nhiễm bệnh do *Microsporidia* gây ra trên cá.



Hình 2: Bào tử *Microsporidia* trước (A) và sau thí nghiệm (B) với fumagilin 2 µg/ml ở thời điểm 5 phút (Mẫu quan sát dưới kính hiển vi điện tử, SEM)

Đối với kháng sinh nhóm fumagillin là fumagillin và TNP-70, kết quả đề tài ghi nhận tác dụng bất hoạt bào tử *Microsporidia* khá tốt, tuy nhiên thời gian tác dụng chậm hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với albendazole. Trong các nghiệm thức thí nghiệm, fumagillin và TNP-470 nồng độ càng cao thì có thời gian tiếp xúc để bất hoạt bào tử càng thấp và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Riêng nghiệm thức TNP-470: 4-5 µg/ml và 1-2 µg/ml; nghiệm thức fumagillin 2, 3, 4 µg/ml thì khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$). Ở nồng độ thấp (0,1 µg/ml) thời gian tác dụng của TNP-470 cao hơn gấp đôi so với các nghiệm thức có nồng độ cao (4-5 µg/ml). Bên cạnh đó, ở nồng độ thấp (0,1 µg/ml) thời gian tác dụng của fumagillin cao hơn

gấp ba lần so với các nghiệm thức có nồng độ cao (4-5 µg/ml). Quan sát dưới kính hiển vi có thể thấy được sự tác động của thuốc lên các bào tử *Microsporidia* làm chúng bị bất hoạt và dần dần bị tiêu diệt do màng bào tử bị mất cấu trúc, dẫn đến sự thoái hóa bên trong tế bào chất, vỏ bào tử dần bị tạo lại (Hình 2B).

Theo Athanassopoulou *et al.* (2009), nhóm thuốc kháng sinh fumagillin được điều chế từ loài nấm *Aspergillus fumigatus* và đã được sử dụng vào những năm 1950 để điều trị bệnh do *Microsporidia* gây ra. Fumagillin có tác dụng ức chế sự sao chép DNA và RNA của các loài vi bào tử trùng *Microsporidia*. Nhóm thuốc kháng sinh này gồm có

Fumagillin và 1 dẫn xuất khác có tên là TNP-470. Tương tự như albendazole, khả năng tác dụng của TNP-470 phụ thuộc vào loài vi bào tử *Microsporidia* và ký chủ cá.

Nghiên cứu của Beauvais *et al.* (1994) cũng khẳng định hiệu quả điều trị bệnh do vi bào tử trùng gây ra bằng kháng sinh TNP-70. Các thí nghiệm thực hiện cảm nhiễm loài vi bào tử trùng *E. cuniculi* trên các dòng tế bào thận thỏ. Các tế bào này sau 3 ngày điều trị với TNP-470, với nồng độ thấp nhất 0,0001 µg/ml, các bào tử *E. cuniculi* chỉ bị giảm 20% số lượng bào tử. Mặt khác, ở nồng độ 0,0005 µg/ml, TNP-470 hạn chế sự phát triển của 80% các bào tử *E. cuniculi*. Ở các nồng độ cao hơn từ 0,002-5 µg/ml, các bào tử *E. cuniculi* đã bị phá hủy hoàn toàn (100%). Từ đó ngăn chặn sự lây nhiễm sang các tế bào chủ khác.

Tuy nhiên, theo nghiên cứu của Speare *et al.* (1999) ghi nhận thì kết quả có sự khác biệt trên cá hồi vân nhiễm *Loma salmonae*. Nghiệm thức thử nghiệm tác dụng của các loại thuốc: fumagillin (0,1 µg/ml) và TNP-470 (0,005 µg/ml), kết quả cho thấy ở cả hai nghiệm thức đều có tác dụng kiểm chế và giảm dần sự hình thành và phát triển các khối tế bào không lồ (xenomas). Trong đó fumagillin làm giảm số lượng các xenomas đáng kể trong 10 tuần điều trị ($p < 0,01$). Kết quả nghiên cứu cho rằng cả hai loại thuốc fumagillin có thể có giá trị tiềm năng trong việc kiểm soát *L. salmonae* gây bệnh trên cá hồi. Từ những kết quả ghi nhận được, nghiên cứu đưa đến kết luận fumagillin và TNP-470 có thể là các loại thuốc mới đầy hứa hẹn cho việc điều trị bệnh do vi bào tử trùng gây ra. Vì fumagillin và TNP-470 có tác dụng bất hoạt *Microsporidia*.

4 KẾT LUẬN

Các loại hóa chất có tác động bất hoạt vi bào tử *Microsporidia* hiệu quả trong khoảng thời gian từ 1,05-39,50 phút. Trong đó, hydrogen peroxide (H_2O_2) ở nồng độ 0,7% có thời gian bất hoạt vi bào tử *Microsporidia* ngắn nhất là 1,05 phút.

Kháng sinh albendazole, fumagillin và TNP-470 đều có khả năng bất hoạt vi bào tử *Microsporidia* ở nồng độ 5 µg/ml. Thời gian để thuốc bất hoạt vi bào tử trùng hiệu quả trong thời gian ngắn nhất (3,20 giờ) là kháng sinh albendazole.

5 ĐỀ XUẤT

Thử nghiệm điều trị bệnh gao do vi bào tử trùng *Microsporidia* bằng phương pháp cho cá ăn thức ăn có trộn thuốc kháng fumagillin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Athanassopoulou, F., I.S. Pappas and K. Bitchava, 2009. An overview of the treatments for parasitic disease in Mediterranean aquaculture. In: Rogers C. (ed.), Basurco B. (ed.). The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture. Zaragoza CIHEAM. p. 65-83.
- Beauvais, B., C. Sarfati, S. Challier and F. Derouin, 1994. In vitro model to assess effect of antimicrobial agents on *Encephalitozoon cuniculi*. Antimicrobial agents and Chemotherapy. 38: 2440-2448.
- Estevez, J., R. Iglesias, J. Leiro, F.M. Ubeira and M.L. Sanmartin, 1992. An unusual site of infection by a microsporean in the turbot *Scophthalmus maximus*. Diseases of Aquatic Organisms. 13: 139-142.
- Ferguson, J.A., V. Watral, A.R. Schwindt and M.L. Kent, 2007. Spores of two fish microsporidia (*Pseudoloma neurophilia* and *Glugea anomala*) are highly resistant to chlorine. Diseases of Aquatic Organisms. 76: 205-214.
- Johnson, C.H., M.M. Marshall, L.A. DeMaria, J.M. Moffet and D.G. Korich, 2003. Chlorine inactivation of spores of *Encephalitozoon* spp. Applied and Environmental Microbiology. 69: 1325-1326.
- Kappagoda, S.M.D., S.M.U. Singh, and B.G. Blackburn, 2011. Antiparasitic Therapy. Mayo Clin Proc. 86: 561-583.
- Li, X. and R. Fayer, 2006. Infectivity of microsporidian spores exposed to temperature extremes and chemical disinfectants. Journal Eukaryotic Microbio. 53: 77-79.
- Lom, J. and F. Nilsen, 2003. Fish microsporidia: fine structural diversity and phylogeny. International Journal for Parasitology. 33: 107-127.
- Mogoa, E., 2010. *Acanthamoeba castellanii*: cellular changes induced by chlorination. Experimental Parasitology, 126, 97-102.

- Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2011. Kết quả nghiên cứu bước đầu về bệnh gao ở cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Kỷ yếu Hội nghị khoa học thủy sản lần 4, Đại học Cần Thơ. trang 262-269.
- Nguyễn Thị Thu Hằng và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2012. Xác định nhóm ký sinh trùng tạo bào nang trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ. 22c: 155-164.
- Ortega, Y.R., M.P. Torres, S.V. Exel, L. Moss and V. Cama, 2007. Efficacy of a sanitizer and disinfectants to inactivate *Encephalitozoon intestinalis* spores. *Journal Food Protection*. 70: 681-4.
- Santillana-Hayat, M., C. Sarfati, S. Fournier, F. Chau, R. Porcher, J.M. Molina and F. Derouin, 2002. Effects of chemical and physical agents on viability and infectivity of *Encephalitozoon intestinalis* determined by cell culture and flow cytometry. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 46: 2049-2051.
- Schmahl, G, A. Toukhy and F.A. Ghaffar, 1990. Transmission electron microscopic studies on the effects of toltrazuril on *Glugea anomala*, Moniez, 1887 (Microsporidia) infecting the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Parasitol Resistance*. 76: 700-706.
- Schmahl, G. and J. Benini, 1998. Treatment of fish parasites. II. Effects of different benzimidazole derivatives (albendazole, mebendazole, fenbendazole) on *Glugea anomala*, Moniez, 1887 (Microsporidia) : ultrastructural aspects and efficacy studies. *Journal of Parasitology Research*. 84: 41-49.
- Speare, D.J., F. Athanassopoulou, J. Daley and J.G. Sanchez, 1999. A Preliminary Investigation of Alternatives to Fumagillin for the Treatment of *Loma salmonae* Infection in Rainbow Trout. *J. Comp. Path.* 121: 241-248.
- Thomas, V., 2013. Sensitivity and Resistance of Protozoa to Microbicides. In: Fraiese, A.P. (ed), J.Y. Maillard and S.A. Sattar. *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*. A John Wiley & Sons Publication.
- Waller, T., 1980. Sensitivity of *Encephalitozoon cuniculi* to various temperatures, disinfectants and drugs. *Lab. Anim. Sci.* 13:277-285.
- Woo, P.T.K., 2006. Fish diseases and disorders, Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections University of Guelph Canada. pp 205-230.
- Zhengyong, W., W. Zhengyong, L. Fupin, L. Jianrong, L. Wenchu, Z. Yangsheng, T. Peichan and H. Ziran, 2010. Inactivation and mechanisms of chlorine dioxide on *Nosema bombicis*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 104: 134-139.