



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0002665

(51) **A01N 59/00; G01N 33/00**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00084

(22) 28/08/2018

(67) 1-2018-03786

(45) 25/07/2021 400

(43) 26/11/2018 368A

(73) Viện Công nghệ môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam (VN)
Nhà A30, số 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Hoài Châu (VN); Đào Trọng Hiền (VN); Ngô Quốc Bru (VN); Đoàn Quang
Hà (VN).

(54) **QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ CHẾ PHẨM KHÁNG KHUẨN CHỨA NANO BẠC, NANO
CHITOSAN VÀ HYDRO PEROXIT DÙNG TRONG THÚ Y VÀ CHẾ PHẨM THU
ĐƯỢC BỞI QUY TRÌNH NÀY**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình điều chế chế phẩm kháng khuẩn chứa nano
bạc, nano chitosan và hydro peroxit dùng trong thú y, bao gồm các bước:

(i) Điều chế nano bạc bằng phương pháp khử hóa học muối bạc bằng borohydrid với chất
phân tán và ổn định để thu được dung dịch nano bạc nồng độ 500-1500 ppm và kích thước
hạt nano bạc nằm trong khoảng 5 nm đến 20 nm;

(ii) điều chế nano chitosan bằng cách hòa tan chitosan trong axit metacrylic (MMA, nồng
độ 1,95 ml MMA/1000 ml nước deion), sau đó kali persulfat được thêm từ từ vào dung dịch
trên sao cho tỷ lệ khối lượng của chitosan và kali persulfat từ 30 đến 40, thu được nano
chitosan có nồng độ là 1500 ppm, kích thước hạt nano chitosan thu được nằm trong khoảng
40 nm đến 60 nm; và

(iii) phối trộn dung dịch nano bạc thu được ở bước (i), nano chitosan thu được ở bước (ii),
hydro peroxit nồng độ 30% và nước deion theo tỷ lệ lần lượt là
33,3%:33,3%:10,0%:23,4% được khuấy đều bằng máy khuấy cơ học để thu được chế
phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit.

Ngoài ra, giải pháp hữu ích còn đề cập đến chế phẩm kháng khuẩn thu được bởi quy
trình theo giải pháp hữu ích dùng để phòng và trị bệnh viêm đường sinh dục trong thú y, cụ
thể là phòng ngừa và điều trị viêm tử cung ở bò sữa. Nhờ vậy việc chăn nuôi bò sữa mang
lại hiệu quả kinh tế cao hơn, giúp đàn bò sinh trưởng và phát triển bền vững hơn.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình điều chế chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit với hàm lượng nhỏ để thay thế hóa chất thường dùng là dung dịch iodine 2% trong phòng và điều trị bệnh viêm nhiễm trên gia súc nhằm khắc phục tình trạng lạm phát dư lượng kháng sinh các nhà nghiên cứu đã sử dụng dung dịch iodine 2% để xịt rửa tử cung nhằm tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh. Giải pháp hữu ích còn đề cập đến chế phẩm kháng khuẩn thu được từ quy trình điều chế này.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Viêm tử cung là một trong những bệnh viêm đường sinh dục, thường gặp ở gia súc sinh sản nói chung và bò sữa nói riêng. Đây là quá trình bệnh lý ở tử cung gây ra bởi các loại vi khuẩn. Viêm tử cung ở bò sữa chủ yếu xảy ra ở khoảng thời gian 7 ngày sau khi đẻ, tuy nhiên nó cũng có thể xảy ra ở giai đoạn khác. Bệnh làm kéo dài thời gian động dục lại sau đẻ, tăng hệ số phối, tăng tỉ lệ loại thải, giảm sản lượng sữa, giảm số con sinh ra trong một đời bò mẹ, từ đó làm giảm năng suất sinh sản, gây thiệt hại lớn về kinh tế cho người chăn nuôi. Bệnh viêm tử cung được cho là làm ảnh hưởng đến từ 10 - 20% bò sữa tại Canada và Mỹ. Tại Việt Nam, tỷ lệ mắc bệnh viêm tử cung trên đàn bò sữa sau đẻ khá cao tùy thuộc vào từng địa phương: 21,32% tại Hà Nội và Bắc Ninh (Nguyễn Văn Thanh và Lê Trần Tiến 2007), 13,91% tại Nghệ An (Cao Viết Dương, 2011). Trong suốt quá trình mang thai, trong tử cung không có vi khuẩn. Khi đẻ, cổ tử cung mở ra, tạo điều kiện cho bê ra đời và duy trì như vậy trong nhiều ngày sau đẻ. Trong thời gian này, các loại vi khuẩn có mặt ở đường sinh dục sẽ có cơ hội xâm nhập vào trong tử cung của hơn 95% bò (Sheldon và Dobson, 2004). Có nhiều loại vi khuẩn có thể được phân lập từ môi trường tử cung sau khi đẻ bao gồm *E. coli*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Arcanobacterium pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella melaninogenicus* và *Clostridium* spp. Ngoài ra, các loại vi khuẩn như *Bacillus* spp., *Klebsiella* spp. và *Campylobacter fetus* cũng có thể xuất hiện trong tử cung của bò bị viêm. Trên cơ sở đó người ta đã nghiên cứu ứng dụng thuốc kháng sinh để tiêu diệt mầm bệnh hồi phục chức năng cho bò nhưng đồng thời cùng với việc hiệu quả rõ rệt cũng đi đôi với việc sử dụng quá dư thừa kháng sinh gây ảnh hưởng đến chất lượng sữa. Khắc phục tình trạng giảm phát dư lượng kháng sinh các nhà nghiên cứu đã sử dụng dung dịch iodine 2% để xịt rửa tử cung nhằm tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh.

Bệnh viêm tử cung tuy tỷ lệ tử vong thấp nhưng có ảnh hưởng lớn đến sản lượng sữa, khả năng sinh sản của bò cũng như thu nhập của người chăn nuôi bởi không tiêu thụ được sữa do tồn dư kháng sinh trong quá trình điều trị. Thiệt hại kinh tế lớn hơn khi bệnh không được phát hiện và điều trị kịp thời dẫn đến hiện tượng chậm sinh và vô sinh ở bò. Với những yếu tố tích cực của nano bạc, nano chitosan và hydro peroxid việc ứng dụng trong phòng và điều trị bệnh viêm đường sinh dục ở bò sữa bước đầu thay thế việc sử dụng thuốc kháng sinh nhằm hạn chế hiện tượng kháng thuốc.

Povidone-iodine có khả năng sát trùng tốt trong chữa trị các vết thương cục bộ và chống lây nhiễm rộng. Được dùng đầu tiên với những vết cắt nhỏ, vết sây xước, vết bỏng và chỗ phỏng giộp. Vì vậy ngành chăn nuôi đặc biệt là chăn nuôi bò sữa ở Việt Nam đã ứng dụng iodine vào việc phòng và làm sạch vết thương, sát trùng vi khuẩn, nấm trong đó có bệnh viêm đường sinh dục đã được sử dụng từ nhiều năm nay. Tuy nhiên bên cạnh đó iodine khi tiếp xúc trực tiếp với da có thể gây thương tổn, do đó cần phải cẩn thận khi thao tác với nguyên tố hóa học này. Hơi iodine có thể gây khó chịu cho mắt và các màng nhầy. Do vậy việc tìm kiếm phương pháp mới nhằm hỗ trợ việc phòng và điều trị bệnh viêm đường sinh dục an toàn thân thiện hơn, giúp cải thiện tình trạng đau rát cho bò và hàm lượng sử dụng được giảm tới mức thấp nhất.

Chitosan là một polysaccharide bắt nguồn từ chitin tự nhiên. Tính độc đáo của nó làm cho nó trở nên hấp dẫn trong nhiều ứng dụng công nghiệp và y sinh học (bao gồm thuốc giảm sốt, chữa lành vết thương, bổ sung dinh dưỡng, làm sạch nước, loại bỏ chất độc, giàn giáo cho kỹ thuật mô và màng bán thấm). Do sự hòa tan phụ thuộc vào độ pH, nó tạo thành các màng ổn định trên các bề mặt khác nhau trong các điều kiện pH trung hòa và cơ bản. Các nhóm amin của nó thể hiện cho sự liên kết cộng hóa trị của các phân tử sinh học, và nó có thể được lắng đọng cùng với các polyme khác hoặc các hạt nano. Bao gồm 2-amino-2-deoxy- β -D-glucan kết hợp với các liên kết glycosidic, chitosan được xem như là một chất liệu hoàn hảo để phát triển vi/hạt nano. Chitosan, là một dạng linh hoạt hơn của polysaccharide này, loại polyme tự nhiên phong phú nhất trên trái đất sau khi xenlulo. Vật liệu nanochitosan có tính ổn định tương đối cao, vẫn duy trì được một số tính chất của chitosan ban đầu, đặc biệt do có kích thước nhỏ, bề mặt riêng lớn nên có khả năng hấp phụ cao. Dựa vào tính chất này, nanochitosan được sử dụng làm chất mang, đặc biệt là làm chất mang cho các loại thuốc, ví dụ các thuốc chống ung thư. Nano chitosan được sử dụng như một phương tiện đưa thuốc và gen vào cơ thể. Trong số các ứng dụng của công nghệ nano trong y sinh học thì ứng dụng trong ngành dược được coi là những ứng dụng lâm sàng quan trọng nhất và đã có rất nhiều ứng dụng trong lĩnh vực này. Các ứng dụng này sử dụng các đặc điểm đặc biệt của các hạt nano để dùng làm thuốc hoặc các thành phần của thuốc hoặc được sử dụng cho các mục đích như kiểm soát tốc độ giải phóng thuốc. Công nghệ nano có

tiềm năng lớn trong việc cải thiện sinh khả dụng của thuốc (tức là tỷ lệ thuốc thực sự phát huy tác dụng được lý so với tổng lượng thuốc được đưa vào cơ thể). Trong trường hợp này, các nang polyme có khả năng giáng hoá sinh học, làm tăng sinh khả dụng của thuốc.

Chitosan trong công nghệ mô: hai trong số các ứng dụng công nghệ nano đã có những thành công bước đầu có thể kể đến là ứng dụng trong tạo xương nhân tạo và da nhân tạo.

Chitosan phá huỷ tế bào ung thư: đầu tiên là ứng dụng phá huỷ các khối u và tế bào ung thư ở nông trên bề mặt da nơi các tia sáng có bước sóng tia hồng ngoại gần có thể tới được. Trường hợp khối u ở sâu nơi tia sáng hồng ngoại gần không tới được thì người ta điều chế các hạt Au kích thước nano có hoạt tính phóng xạ. Các hạt vàng đồng vị phóng xạ này được gắn vào các phân tử dẫn đường sẽ tiếp cận các tế bào ung thư và thâm nhập vào khối u, từ đó tiêu diệt khối u theo phương thức phá huỷ từ bên trong ra. Dựa vào các tính chất đặc thù vốn có của hạt nano chitosan tiến hành nghiên cứu ứng dụng chúng trong việc phòng và điều trị bệnh viêm tử cung ở bò sữa. Vì khả năng bám chặt vào màng sinh học và các phân tử sinh học cùng với điện tích dương, chitosan cung cấp khả năng làm lành vết thương nhanh chóng khi có tổn hại cơ học hay mầm bệnh tấn công. Chitosan hoạt hóa quá trình tổng hợp và hình thành một loạt các protein PR và các protein bảo vệ trong đó có phenylalanine ammonia-lyase và peroxidase. Hai enzyme này giúp tổng hợp và xây dựng lên ma trận lignin và hình thành tylose, những chất đóng vai trò quan trọng trong làm lành vết thương. Đối với vi khuẩn gram dương, oligo chitosan (nano chitosan) có thể phá huỷ thành tế bào (cytoderm) của vi khuẩn thông qua sự kết hợp của nhóm amino n-acetyl thành tế bào và các axit glutamic và teichoic. Màng tế bào của vi khuẩn bị tác động trực tiếp bởi áp suất thẩm thấu của môi trường bên ngoài, gây rò rỉ các thành phần quan trọng trong tế bào chất và cuối cùng dẫn đến cái chết của vi khuẩn. Còn vi khuẩn gram âm có một lớp polysaccharide béo, protein, và 2 lớp kim loại hóa trị bên ngoài cytoderm peptidoglycan, chúng liên kết với nhau bởi lực tĩnh điện. Oligo chitosan (nano chitosan) liên kết với oligosaccharide trên bề mặt vi khuẩn, ngăn cản sự tiếp nhận khoáng chất của tế bào, vì vậy vi khuẩn chết do thiếu chất dinh dưỡng. Bằng các tính chất ưu việt trên đã tiến hành nghiên cứu điều chế ứng dụng kết hợp giữa nano chitosan và nano bạc nhằm tận dụng tối đa khả năng phòng và trị bệnh viêm tử cung.

Một vài năm trở lại đây các công trình nghiên cứu tìm cách thay thế việc sử dụng kháng sinh ảnh hưởng chất lượng sữa của bò sữa và phát thải ra môi trường bằng các hợp chất thân môi trường có tính kháng khuẩn cao như các hợp chất polysaccharite, các hạt nano có tính kháng khuẩn như bạc, đồng, kẽm,... trên cơ sở khoa học đó các nhà

nghiên cứu mỹ của đại học Folida đã tìm cách ứng dụng chitosan trong việc hạn chế các bệnh viêm đường sinh dục ở bò (Clinical response after chitosan microparticle administration and preliminary assessment of efficacy in preventing metritis in lactating dairy cows/ August 2016). Nhưng các công bố này mới chỉ dừng lại ở việc sử dụng chitosan kích thước micro chứ chưa nghiên cứu tính chất của hạt từ đó hướng tới việc tìm cách điều chế hạt nano chitosan có kích thước nhỏ sử dụng với nồng độ thấp kết hợp với nano bạc trong việc phòng và điều trị bệnh viêm tử cung ở bò sữa. Hạt nano chitosan được điều chế dựa trên phản ứng polimer hóa cắt mạch đa phân tử thành đơn phân tử đồng thời được hạt có kích cỡ nanomet.

Trong nghiên cứu của R. Stoica và cộng sự năm 2013 về điều chế hạt nano chitosan-TTP bằng việc tách chiết tripolyphosphat từ nụ hoa tầm xuân để tạo phản ứng cắt mạch. Kết quả thu được hạt nano chitosan với kích thước trung bình từ 50-100nm, tuy nhiên hiệu suất của phản ứng còn thấp chỉ dao động 25-46%. Đến năm 2014 Mohamed N. A. Hasaneen và cộng sự đã nghiên cứu điều chế hạt nano chitosan bằng phương pháp polymer hóa phân tử chitosan với metylacrylic acid dưới tác dụng của kali persulfat ở nhiệt độ 75°C trong 2 giờ. Kết quả thu được hạt nano hình cầu có kích thước từ 30-50 nm. Dung dịch iodine sử dụng ở đây với nồng độ 2% được pha loãng từ sản phẩm thương mại trên thị trường.

Hydro peroxit, công thức hóa học là H_2O_2 . Đây là peroxit đơn giản (Hợp chất có một liên kết đơn O-O) và ở dạng nguyên chất là một chất lỏng không màu, hơi nhớt hơn nước. Hydro peroxit là một chất oxy hóa mạnh mẽ và được sử dụng như một chất tẩy trắng và khử trùng. Khoảng 60% sản lượng hydro peroxit trên thế giới được sử dụng để tẩy trắng bột giấy và giấy. Các ứng dụng công nghiệp lớn thứ hai là sản xuất natri percarbonate và natri perborate được sử dụng như chất tẩy nhẹ trong bột giặt. Nó còn được sử dụng trong sản xuất các hợp chất peroxit hữu cơ nào đó như dibenzoyl peroxit, được sử dụng như là chất khởi mồi gốc tự do trong các phản ứng trùng hợp và các phản ứng hóa học khác. Hydro peroxit được sử dụng trong một số quá trình xử lý nước thải để loại bỏ các tạp chất hữu cơ. Điều này đạt được bởi quá trình oxy hóa nâng cao, chẳng hạn như phản ứng Fenton, mà sử dụng nó để tạo ra các gốc hydroxyl có hoạt tính cao ($-OH$). Nó thể phá hủy chất bẩn hữu cơ “cứng đầu” như các hợp chất thơm hoặc halogen. Nó cũng có thể oxy hóa các hợp chất lưu huỳnh có trong các chất thải, ứng dụng này thường được sử dụng để làm giảm mùi hôi.

Trong y tế, hydro peroxit được sử dụng như là chất khử trùng và chất khử khuẩn trong nhiều năm. Trong khi việc sử dụng nó đã bị suy giảm trong những năm gần đây do sự phổ biến của các sản phẩm OTC có mùi vị dễ chịu hơn và có sẵn hơn thì nó vẫn được nhiều bệnh viện, bác sĩ và nha sĩ sử dụng trong việc vô trùng, làm sạch và xử lý

mọi thứ từ sàn nhà đến các phẫu thuật chân răng. Hydro peroxit 35% được gọi là “nước oxy già”, với các giá trị y học hay trị liệu được coi như là liệu pháp hydro peroxit. Những người chủ trương sử dụng sản phẩm này cho rằng nó có thể hòa loãng và sử dụng trong “liệu pháp siêu oxy hóa” để điều trị AIDS, ung thư và nhiều bệnh khác. Gần đây, các nhà thực hành y học khác cũng sử dụng các liều hydro peroxit tiêm tĩnh mạch trong nồng độ cực thấp (nhỏ hơn 1%) trong liệu pháp hydro peroxit – một hướng điều trị y học gây tranh cãi đối với bệnh ung thư.

Nano bạc giải phóng ra các ion bạc có tác dụng tiêu diệt vi khuẩn, nấm gây bệnh. Nó làm thay đổi enzym của tế bào vi khuẩn, nấm bằng cách liên kết với nhóm thiol của chúng tạo thành kết tủa sulfur bạc dẫn đến bất hoạt vi khuẩn và nấm. Việc bổ sung nano bạc vào hydro peroxit làm chậm sự phân hủy của H_2O_2 giải phóng ra oxy, giúp kéo dài thời gian tác dụng của hydro peroxit và nâng cao hiệu quả khử trùng. Ngoài ra, nano bạc và hydro peroxit diệt khuẩn theo các cơ chế khác nhau giúp chúng hỗ trợ cho nhau, do vậy hiệu quả khử trùng sẽ tăng lên nhiều lần. Nano chitosan có trong dung dịch giúp phân tán và ổn định nano bạc trong hỗn hợp, giúp các hạt bạc ổn định hơn và kéo dài thời gian sử dụng. Do vậy nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit có một số ưu điểm chính sau: khử trùng ở nhiệt độ phòng (không cần tăng nhiệt độ), phổ diệt vi khuẩn và nấm rộng, sản phẩm thân thiện môi trường do không có màu, mùi và dễ phân hủy sinh học trong môi trường, có thể ứng dụng rộng rãi trong nhiều môi trường như đất, nước, không khí, bề mặt vật liệu, hoạt động trong dải pH rộng, tác dụng khử trùng nhanh, độ bền nhiệt cao, tác dụng khử trùng kéo dài và không có dư lượng hóa chất độc hại.

Nguyên tố bạc được đưa vào sử dụng từ những năm cuối của thế kỷ XIX và đầu những năm của thế kỷ XX với mục đích làm tăng độ tươi của sữa, điều trị các vết bỏng và khử trùng vết thương. Sau đó với sự phát minh ra thuốc kháng sinh có hiệu quả cao, nguyên tố bạc không còn được sử dụng nữa. Việc nhờn thuốc kháng sinh trong những năm gần đây, đã đặt câu hỏi cho các nhà khoa học và việc ứng dụng tác dụng của nguyên tố bạc đã được đề cập trở lại, đặc biệt là bạc dưới dạng hạt có kích thước rất nhỏ 5-15 nm (nano bạc). Có khả năng tiêu diệt phổ rộng các loài vi sinh vật gây bệnh tuy nhiên nano bạc không gây ra các tác dụng độc hại đối với cơ thể con người và động vật với liều lượng phù hợp. Các đặc tính kháng khuẩn của bạc bắt nguồn từ tính chất hóa học của các ion Ag^+ , nano bạc ở kích thước 5-15nm có tỷ lệ phần trăm số nguyên tử nằm trên bề mặt rất lớn (hầu hết các nguyên tử tập trung tại bề mặt của hạt nano bạc). Có một số ít các nguyên tử nằm phía trong, các nguyên tử nằm ở bề mặt với số lượng lớn và hầu hết chúng không bị che chắn bởi các lớp, vì thế các nguyên tử rất dễ tách ra và các hạt nano bạc dễ dàng giải phóng các ion bạc mang điện dương (Ag^+), các ion Ag^+ này có tác dụng diệt nấm, vi khuẩn gây bệnh theo cơ chế đặc thù. Các lĩnh

vực được ứng dụng: thủy sản, trồng trọt và chăn nuôi trong việc sát khuẩn, khử mùi hôi chuồng trại.

Trước khi có công nghệ nano, trong điều trị bệnh người ta sử dụng bạc dưới dạng hợp chất (ví dụ sunfadiazin), do đó không tránh khỏi các hiệu ứng phụ, ảnh hưởng xấu đến kết quả điều trị. Công nghệ nano đã tạo ra các hạt nano kim loại bạc có khả năng giải phóng ion bạc theo ý muốn, nên loại trừ được hầu hết các phản ứng phụ. Vì vậy nano bạc đã được nghiên cứu rất nhiều trong y học. Năm 2005 một nhóm tác giả Trung Quốc đã chứng minh bằng thực nghiệm khả năng của nano bạc bảo vệ các tế bào lành khỏi tác dụng của các tế bào nhiễm HIV-1, đồng thời cho thấy khả năng bảo vệ đó phụ thuộc vào nồng độ nano bạc. Phải nói rằng các công trình nghiên cứu về khả năng điều trị vết thương của nano bạc còn tương đối hiếm và cơ chế tác dụng của chúng còn chưa sáng tỏ. Nhưng mới đây các nhà khoa học thuộc trường Đại học Hồng Kông đã khẳng định khả năng nano bạc rút ngắn quá trình điều trị vết thương và hạn chế sự hình thành sẹo, và cho thấy các khả năng đó phụ thuộc vào nồng độ nano bạc được sử dụng. Kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả này cũng cho thấy nano bạc còn có thể làm thay đổi mức độ viêm của vết thương bằng cách điều chỉnh sự xuất hiện của các cytokin kháng viêm như IL-10, IFN- γ , VEGF (tương ứng Interleukin-10, Interferon- γ , Vascular endothelial growth factor) ... Trên ảnh lát cắt có thể thấy ở mẫu được xử lý với nano bạc số bạch cầu trung tính giảm đáng kể (các chấm màu đỏ sẫm) so với mẫu được xử lý bằng sunfadiazin và đối chứng không qua xử lý (hình 1).

Tuy nhiên, tất cả các chế phẩm kháng khuẩn dùng trong thú y nêu trên không chứa các thành phần là nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit nên hiệu quả điều trị trong thú y kém. Do vậy, giải pháp hữu ích này đề xuất quy trình điều chế chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit có khả năng diệt khuẩn cao và hiệu quả trong phòng và trị bệnh thú y.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất quy trình điều chế chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit thay thế cho dung dịch khử trùng truyền thống trong phòng và điều trị bệnh thú y nhằm khắc phục tình trạng lạm phát dư lượng kháng sinh các nhà nghiên cứu đã sử dụng dung dịch iodine 2% để xịt rửa tử cung nhằm tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh.

Quy trình điều chế chế phẩm kháng khuẩn theo giải pháp hữu ích, bao gồm các bước:

(i) điều chế nano bạc bằng phương pháp khử hóa học muối bạc bằng borohydrid với chất phân tán và ổn định để thu được dung dịch nano bạc nồng độ 500-1500 ppm và kích thước hạt nano bạc nằm trong khoảng 5 nm đến 20 nm:

nước deion được sử dụng để tiến hành phản ứng, dung dịch muối bạc chứa 0,79-2,36 g/l ion Ag^+ được khuấy bằng thiết bị khuấy cơ học IKA tốc độ 2000 vòng/phút tới khi đồng nhất sau đó tiến hành phản ứng khử từ từ bằng NaBH_4 ở nhiệt độ phòng, thu được dung dịch nano bạc 1500 ppm có kích thước hạt nano bạc trung bình từ 5-20 nm;

(ii) điều chế nano chitosan bằng cách hòa tan chitosan trong axit metacrylic (MMA, nồng độ 1,95 ml MMA/1000 ml nước deion), tiến hành khuấy trong 12 giờ cho đến khi dung dịch đồng nhất; sau đó kali persulfat được thêm từ từ vào dung dịch trên sao cho tỷ lệ khối lượng của chitosan và kali persulfat từ 30 đến 40, nâng nhiệt độ lên 75°C và khuấy mạnh trong 2 giờ để phản ứng de-polyme hóa diễn ra hoàn toàn; dung dịch thu được tiếp tục mang ngâm trong nước đá làm lạnh để giảm về nhiệt độ phòng, thu được nano chitosan có nồng độ là 1500 ppm, kích thước hạt nano chitosan thu được nằm trong khoảng 40 nm đến 60 nm; và

(iii) phối trộn dung dịch nano bạc thu được ở bước (i), nano chitosan thu được ở bước (ii), hydro peroxit nồng độ 30% và nước deion theo tỷ lệ lần lượt là 33,3%:33,3%:10,0%:23,4% được khuấy đều bằng máy khuấy cơ học để thu được chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit.

Mục đích khác của giải pháp hữu ích là điều chế chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit dùng trong thú y từ phương pháp nêu trên, trong đó:

- cỡ hạt nano bạc trong chế phẩm nằm trong khoảng 5 nm đến 20 nm, và nồng độ nano bạc trong chế phẩm kháng khuẩn là 166-500 ppm; và

- cỡ hạt nano chitosan trong chế phẩm nằm trong khoảng 40 nm đến 60 nm, và nồng độ nano chitosan trong chế phẩm kháng khuẩn là 500 ppm; và

- nồng độ hydro peroxit trong chế phẩm kháng khuẩn là 3%.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là vết thương so sánh khi được chữa trị bằng nano bạc, sunfadiazi và không sử dụng

Hình 2 là ảnh chụp TEM kích thước hạt nano bạc

Hình 3 là ảnh FE-SEM của hạt nano chitosan và phân tử polyme chitosan đã được de-acetyl hóa

Hình 4 là ảnh vòng kháng khuẩn của dung dịch nano bạc (A) *E.coli*, (B) *Coliform*, (C) *Staphylococcus aureus*, (D) *Pseudomonas sp.*

Hình 5 là ảnh vòng kháng khuẩn của dung dịch bình xịt chế phẩm nano bạc và nano chitosan trên 2 chủng *E.coli* và *Staphylococcus aureus*

Hình 6 là ảnh so sánh dung dịch chế phẩm nano bạc, nano chitosan với dung dịch iodine

Hình 7 là ảnh kết quả định lượng vi khuẩn *E.coli* trên PCA

(A) Đối chứng pha loãng 1000 lần

(B) Sau tiếp xúc chế phẩm nano 100 ppm sau 30 phút pha loãng 10 lần

Hình 8 là ảnh lấy dịch nhầy từ cung bò thí nghiệm

Hình 9 là ảnh kết quả định lượng *E.coli* trong dịch từ cung trước và sau khi tiếp xúc chế phẩm chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit trong 1 giờ

Hình 10 là ảnh thực rửa từ cung bò

Hình 11 là ảnh đánh giá kết quả sau khi thực, xịt rửa từ cung bằng nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit nồng độ 100 ppm trước và sau khi thử nghiệm

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, quy trình điều chế chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit trong phòng và trị bệnh viêm đường sinh dục trên thú y theo giải pháp hữu ích sẽ được mô tả chi tiết.

Quy trình theo giải pháp hữu ích này bao gồm các bước:

(i) điều chế nano bạc bằng phương pháp khử hóa học muối bạc bằng borohydrid với chất phân tán và ổn định để thu được dung dịch nano bạc nồng độ 500-1500 ppm và kích thước hạt nano bạc nằm trong khoảng 5 nm đến 20 nm:

nước deion được sử dụng để tiến hành phản ứng, dung dịch muối bạc chứa 0,79-2,36 g/l ion Ag^+ được khuấy bằng thiết bị khuấy cơ học IKA tốc độ 2000 vòng/phút tới khi đồng nhất sau đó tiến hành phản ứng khử từ từ bằng $NaBH_4$ ở nhiệt độ phòng, thu được dung dịch nano bạc 1500 ppm có kích thước hạt nano bạc trung bình từ 5-20 nm;

(ii) điều chế nano chitosan bằng cách hòa tan chitosan trong axit metacrylic (MMA, nồng độ 1,95 ml MMA/1000 ml nước deion), tiến hành khuấy trong 12 giờ cho đến khi dung dịch đồng nhất; sau đó kali persulfat được thêm từ từ vào dung dịch trên sao cho tỷ lệ khối lượng của chitosan và kali persulfat từ 30 đến 40, nâng nhiệt độ lên 75°C và khuấy mạnh trong 2 giờ để phản ứng de-polyme hóa diễn ra hoàn toàn; dung dịch thu được tiếp tục mang ngâm trong nước đá làm lạnh để giảm về nhiệt độ phòng, thu

được nano chitosan có nồng độ là 1500 ppm, kích thước hạt nano chitosan thu được nằm trong khoảng 40 nm đến 60 nm; và

(iii) phối trộn dung dịch nano bạc thu được ở bước (i), nano chitosan thu được ở bước (ii), hydro peroxit nồng độ 30% và nước deion theo tỷ lệ lần lượt là 33,3%:33,3%:10,0%:23,4% được khuấy đều bằng máy khuấy cơ học để thu được chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit.

Theo đó, chế phẩm kháng khuẩn thu được bởi quy trình theo giải pháp hữu ích có:

- Nồng độ nano bạc trong chế phẩm kháng khuẩn ở bước (iii) là 166-500 ppm.
- Nồng độ nano chitosan trong chế phẩm kháng khuẩn là 500 ppm.
- Nồng độ hydro peroxit trong chế phẩm là 3%.

Chế phẩm kháng khuẩn được điều chế bởi quy trình theo giải pháp hữu ích dùng để phòng và trị bệnh viêm đường sinh dục trong thú y.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Để điều chế 1000 ml dung dịch kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit trong phòng và trị bệnh viêm đường sinh dục trên bò theo giải pháp hữu ích:

(i) Điều chế 1000 ml dung dịch nano bạc bằng phương pháp khử hóa học muối bạc bằng borohydrid với chất phân tán và ổn định để thu được dung dịch nano bạc nồng độ 1500 ppm và kích thước hạt nano bạc trung bình từ 5-20 nm:

nước deion được sử dụng để tiến hành phản ứng, dung dịch muối bạc chứa 2,36 g/l ion Ag^+ được khuấy bằng thiết bị khuấy cơ học IKA tốc độ 2000 vòng/phút tới khi đồng nhất sau đó tiến hành phản ứng khử từ từ bằng 20 ml $NaBH_4$ (0,05M) ở nhiệt độ phòng, thu được dung dịch nano bạc 1500 ppm có kích thước hạt nano bạc trung bình từ 5-20 nm;

(ii) Điều chế nano chitosan bằng cách sử dụng các thiết bị, vật liệu, hóa chất gồm: chitosan (TLPT 71,3 kDa, de-acetyl hóa 85%), axit metacrylic, kali persulfat, máy khuấy cơ học tốc độ cao (2000 vòng/phút), máy khuấy từ gia nhiệt; các bước điều chế nano chitosan tiến hành như sau: hòa tan chitosan (1,5 g) trong 1 lít nước deion có bổ sung 1,95 ml axit metacrylic (MAA) tiến hành khuấy 12 giờ đến dung dịch đồng nhất, sau đó sử dụng 0,15 mmol kalipenesunfat thêm vào dung dịch rất từ từ và khuấy mạnh đồng thời nâng nhiệt độ $75^{\circ}C$ trong 2 giờ để phản ứng de-polyme hóa diễn ra hoàn toàn, thuận lợi; hỗn hợp mang ngâm trong nước đá làm lạnh về nhiệt độ phòng, thu

được sản phẩm mong muốn với nồng độ chitosan 1500 ppm, kích thước hạt nano thu được từ 40-60 nm;

(iii) Điều chế chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit:

nguyên liệu bán thành phẩm sử dụng gồm nano bạc 1500 ppm, nano chitosan 1500 ppm và hydro peroxit 30%. Hỗn hợp gồm 334 ml nano bạc 1500 ppm, 334 ml nano chitosan (1500 ppm), 100 ml dung dịch H_2O_2 và 232 ml nước deion được khuấy đều bằng máy khuấy cơ học để thu được 1000 ml dung dịch nano bạc 500 ppm.

Kết quả phân tích:

Như được thể hiện trên ảnh TEM (Hình 2) và ảnh FE-SEM (Hình 3), cỡ hạt nano bạc nằm trong khoảng 5 nm đến 20 nm, trung bình 15 nm, và cỡ hạt nano chitosan nằm trong khoảng 40 nm đến 60 nm, trung bình 50 nm.

- Nồng độ nano bạc trong chế phẩm kháng khuẩn là 166-500 ppm.
- Nồng độ nano chitosan trong chế phẩm kháng khuẩn là 500 ppm.
- Nồng độ hydro peroxit trong chế phẩm là 3%.

Ví dụ 2. Hiệu lực diệt khuẩn của chế phẩm kháng khuẩn theo giải pháp hữu ích trên các chủng vi sinh *E.coli* (ATCC 14169), *Staphylococcus aureus* (VTCCB 658), *Pseudomonas* sp. (VTCCB 657), *Coliforms* thường gặp trên bò

Bảng 1. Kích thước vòng kháng khuẩn dung dịch nano bạc 50-500 ppm

Nồng độ nano bạc (ppm)	Đường kính vòng kháng khuẩn (D-mm)			
	<i>E.coli</i>	<i>Coliforms</i>	<i>Sta</i>	<i>Pseu</i>
50	7	+	12	12
100	7	+	13	12
150	7	+	14	12
200	8	+	16	12
250	8	+	16	13
500	8	+	16	20

Ghi chú:

Sta: *Staphylococcus aureus*

Pseu: *Pseudomonas* sp.

+: Vòng kháng nhỏ

Bảng 2. Kích thước vòng kháng khuẩn của chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit

Nồng độ nano bạc chứa nano chitosan và hydro peroxit (ppm)	Đường kính vòng kháng khuẩn (D-mm)
--	------------------------------------

	<i>E. coli</i>	<i>Sta</i>
50	15	13
100	17	14
150	18	14
200	19	15
250	20	16

Từ kết quả bảng 1 và bảng 2 trên có thể thấy, dung dịch nano bạc có khả năng kháng khuẩn tốt (bảng 1- hình 4). Nhưng khi sử dụng dung dịch chế phẩm chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit ở tất cả các nồng độ từ 50-250 ppm trong thí nghiệm đều cho vòng kháng khuẩn lớn hơn đáng kể đối với các chủng khảo nghiệm nếu so sánh vòng kháng khuẩn đối với chủng *E.coli* và chủng *Staphylococcus aureus* ở bảng 1 và bảng 2. Kích thước vòng kháng khuẩn của chế phẩm hỗn hợp nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit tốt hơn nhiều so với chế phẩm chỉ chứa một nano bạc (bảng 2, hình 4 và 5).

Ví dụ 3. Đánh giá hiệu quả của việc sử dụng chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit so với dung dịch iodine 2% với 2 chủng vi sinh vật *E. coli*, *Staphylococcus* spp.

- Tiến hành nuôi cấy phòng thí nghiệm trên 2 chủng vi sinh vật *E.coli*, *Staphylococcus* spp.
- Sử dụng chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit có nồng độ nano bạc 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 250 ppm so sánh với iodine 2%.
- Kết thúc thí nghiệm tiến hành đo vòng kháng khuẩn.

Bảng 3. Kích thước vòng kháng khuẩn của chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit

Nồng độ chế phẩm nano (ppm)	Đường kính vòng kháng khuẩn (D-mm)	
	<i>E.coli</i>	<i>Sta</i>
iodine 2%	12	15
50	16	13
100	18	20
150	20	22
250	22	24

Kết quả ở bảng 3 cho thấy khả năng kháng khuẩn của chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit ở các nồng độ nano bạc trên 50 ppm so sánh với iodine 2% thường sử dụng trước đây tốt hơn. Kích thước vòng kháng khuẩn chênh lệch rõ rệt (hình 6) từ đó có thể nhận thấy việc sử dụng chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit đem lại hiệu quả rõ rệt so với sử dụng riêng rẽ từng loại nano. Với *E.coli*, iodine 2% có vòng kháng khuẩn với đường kính 12

mm. So sánh với chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit, ta thấy đường kính vòng kháng của chế phẩm nano lớn hơn, điều đó chứng tỏ hoạt lực diệt khuẩn của chúng cao hơn của iodine 2%. Với nồng độ chế phẩm nano 50 ppm, đường kính vòng kháng đạt 16 mm; với nồng độ chế phẩm nano 100 ppm là 18 mm; với nồng độ chế phẩm nano 150 ppm là 20 mm và với nồng độ chế phẩm nano 250 ppm là 22 mm – kích thước này gần gấp đôi kích thước đường kính vòng kháng của iodine 2%.

Với *S. aureus*, đường kính vòng kháng của iodine 2% là 15 mm, lớn hơn so với vòng kháng của nồng độ chế phẩm nano 50 ppm chỉ đạt 13 mm. Qua đó, ta thấy khả năng diệt khuẩn *S.aureus* của iodine 2% cao hơn so với nồng độ chế phẩm nano 50 ppm. Điều này xảy ra do hai vi khuẩn *E.coli* và *S.aureus* có cấu tạo khác nhau dẫn đến hiệu ứng diệt khuẩn của nano bạc trên hai loại vi khuẩn này không giống nhau. Tuy nhiên ở nồng độ nano bạc cao hơn thì hoạt lực kháng khuẩn tăng lên: với nồng độ nano bạc trong chế phẩm kháng khuẩn là 100 ppm thì đường kính vòng kháng là 20 mm, với nồng độ nano bạc trong chế phẩm 150 ppm là 22 mm, với nồng độ nano bạc trong chế phẩm 250 ppm là 24 mm.

Qua thí nghiệm trên, ta thấy chế phẩm kháng khuẩn nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit có hoạt lực kháng khuẩn mạnh hơn sản phẩm iodine 2% đang sử dụng trên thị trường và mạnh hơn chế phẩm chỉ chứa một mình nano bạc.

Ví dụ 4. Đánh giá hiệu lực kháng khuẩn của chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit với dung dịch iodine 2% đối với dịch nhày từ cung bò, khảo sát trên tổng vi khuẩn hiếu khí và *E.coli*

Thử nghiệm 1: Đánh giá hiệu lực diệt khuẩn bằng phương pháp tiếp xúc trực tiếp. So sánh giữa dung dịch iodine 2%, nano bạc 100 ppm và 150 ppm, Chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit có nồng độ nano bạc là 100 ppm và 150 ppm

- Dịch vi khuẩn được cấy và nhân lên qua đêm, thu sinh khối vào dung dịch nước cất vô trùng (khoảng $1-1,5.10^8$ cfu/ml tương đương độ đục chuẩn McFarland 0,5).
- Hút 9,9 ml dung dịch nano bạc/iodine 2%/chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit vào các ống nghiệm sạch (sấy khử trùng ở 160°C trong 3 giờ)
- Chuyển 0,1ml dịch vi khuẩn vào ống nghiệm chứa dung dịch nano bạc/ iodine 2%/chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit, lắc nhẹ và để trong 15 phút, 30 phút sau đó định lượng bằng nước muối sinh lý (phương pháp đổ đĩa).

Thí nghiệm lặp lại 3 lần, lấy kết quả trung bình:

Bảng 4. Hiệu lực diệt *E.coli* của dung dịch iodine 2%, nano bạc 100ppm, nano bạc 150ppm, chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit với nồng độ nano bạc 100 ppm và 150 ppm sau 15 và 30 phút tiếp xúc

Công thức sử dụng	Thời gian tiếp xúc			
	15 phút		30 phút	
	Mật độ (CFU/ml)	Hiệu lực diệt khuẩn (%)	Mật độ (CFU/ml)	Hiệu lực diệt khuẩn (%)
0	$1,5.10^6$	0	$1,5.10^6$	0
iodine 2%	$1,5.10^5$	90,12	$1,3.10^5$	91,03
Nano bạc-100ppm	$7,4.10^4$	95,10	$2,6.10^4$	98,21
Nano bạc-150ppm	$5,4.10^4$	96,43	$1,4.10^4$	99,03
*CP nano 100ppm	$7,6.10^2$	99,95	$2,3.10^1$	99,99
CP nano 150ppm	$4,3.10^2$	99,97	$1,1.10^1$	99,99

*CP – chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit

Qua bảng 4 có thể thấy thời gian tiếp xúc 15 phút của nano bạc 100 ppm, 150 ppm; chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit có nồng độ nano bạc là 100 ppm, 150 ppm đã đạt hiệu quả diệt từ 95% đến trên 99%, trong khi của dung dịch iodine 2% chỉ đạt khoảng 91%. Kết quả cũng cho thấy thời gian xịt rửa từ cung bò cần cho chế phẩm kháng khuẩn tiếp xúc với nguồn bệnh 15 phút là thu được hiệu quả tốt nhất.

Thử nghiệm 2: Đánh giá hiệu lực diệt khuẩn của chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit so sánh với dung dịch iodine 2% trong phòng thí nghiệm đối với dịch nhày từ cung bò bị bệnh.

Bổ sung chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit (100 ppm) và dung dịch iodine 2% vào dịch từ cung của bò trong thời gian 30 phút, 1 giờ để đánh giá hiệu lực diệt khuẩn của chế phẩm nano.

- Mẫu dịch từ cung được lấy trong từ cung bò cái sau đẻ. Ống ghen sạch được đưa vào trong từ cung bò cái, dịch từ cung được hút ra nhờ xilanh và được chuyển vào ống nghiệm sạch. Mẫu được bảo quản lạnh 4°C.
- Định lượng vi khuẩn *E.coli* trong dịch từ cung bằng phương pháp pha loãng thập phân trên môi trường
- Bổ sung chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit vào ống nghiệm (1:1), để trong 30 phút, 1 giờ
- Định lượng lại vi khuẩn *E.coli* trong dịch từ cung bằng nước muối sinh lý trên môi trường chromocult agar, ủ 37°C trong 24±2 giờ

- Đọc kết quả và tính hiệu lực diệt *E.coli* của dung dịch nano bạc

Bảng 5. Hiệu lực diệt khuẩn *E.coli* trong dịch tử cung của chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit với dung dịch iodine 2%

		Chế phẩm kháng khuẩn nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit, 100 ppm				Dung dịch iodine 2%			
TT	<i>E. coli</i> ban đầu (CFU/ml)	<i>E. coli</i> sau 30 phút		<i>E. coli</i> sau 1 giờ		<i>E. coli</i> sau 30 phút		<i>E. coli</i> sau 1 giờ	
		Cfu/ml	(%) diệt	Cfu/ml	(%) diệt	Cfu/ml	(%) diệt	Cfu/ml	(%) diệt
1	$5,3.10^5$	$4,2.10^4$	92,1	$2,2.10^3$	97,56	$4,9.10^4$	90,7	$2,2.10^3$	95,5
2	$2,8.10^3$	5.10^1	98,2	$1,6.10^1$	99,99	9.10^2	96,7	$1,6.10^1$	99,4
3	$4,8.10^6$	$3,2.10^5$	93,3	$8,6.10^4$	98,2	$4,8.10^5$	90,1	$2,2.10^5$	95,4
4	6.10^2	2	99,7	0	100	4	99,3	0	100

Kết quả trên cho thấy chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit có nồng độ nano bạc 100 ppm có hiệu lực diệt *E.coli* đạt >97% sau một giờ tiếp xúc (hình 9), không thua kém so với iodine 2%.

Hiệu lực của chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit trên nền dịch tử cung bò có giảm đi so với thử nghiệm 1, tuy nhiên kết quả đạt được vẫn cho thấy hiệu quả diệt khuẩn cao khi chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit được đưa vào tử cung bò.

Ví dụ 5. Đánh giá quả sử dụng của chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit với dung dịch iodine 2% thực tế trên bò tại Trung tâm nghiên cứu Bò và đồng cỏ Ba Vì

Lựa chọn 90 bò cái lai HF sau khi đẻ 30 ngày. Nhóm bò đẻ bình thường 45 con, Nhóm bò đẻ có nguy cơ viêm đường sinh dục cao (đẻ khó, sót và sát nhau) 45 con. Thí nghiệm được thiết kế chia lô ngẫu nhiên được bố trí thí nghiệm theo bảng 6 (hình 10).

Bảng 6. Sơ đồ thí nghiệm

Chỉ tiêu	Nhóm bò đẻ bình thường			Nhóm bò có nguy cơ cao bị viêm đường sinh dục		
	Lô 1 (ĐC)	Lô 2	Lô 3	Lô 1-1 (ĐC)	Lô 2-2	Lô 3-3
Số lượng (con)	15	15	15	15	15	15
Dung dịch thực rửa	iodine 2%	CP nano 100 ppm	CP nano 150 ppm	iodine 2%	CP nano 100 ppm	CP nano 150 ppm

*CP – chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit

Bảng 7. Ảnh hưởng của chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit so sánh với dung dịch iodine 2% đến độ sạch dịch trong tử cung bò sữa sau khi đẻ

Chỉ tiêu	ĐVT	iodine 2%		CP nano 100ppm		CP nano 150ppm	
		Lô 1	Lô 1-1	Lô 2	Lô 2-2	Lô 3	Lô 3-3
Số bò tham gia thí nghiệm	con	15	15	15	15	15	15
Số bò sạch dịch sau 3-4 lần thụt	con	7	5	10	15	12	11
Tỷ lệ bò sạch dịch sau 3-4 lần thụt	%	46,67	33,33	66,67	100	80	73,33
Thời gian trung bình bò sạch dịch sau khi thụt bảo tồn	ngày	8	12	12	12	8	8

*CP – chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit

Nhìn từ bảng 7 có thể nhận thấy ảnh hưởng của chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit với hai nồng độ nano bạc trong chế phẩm là 100 ppm và 150 ppm so sánh với dung dịch iodine 2% đến độ sạch dịch trong tử cung bò sữa sau khi đẻ có sự khác biệt rõ rệt. Cụ thể sau 3 đến 4 lần thụt xịt rửa tử cung của bò thuộc nhóm bò đẻ bình thường thì tỉ lệ sạch dịch của iodine 2% là 46,67% thấp hơn so với khi sử dụng chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit ở 2 nồng độ thử nghiệm tương ứng là 66,67% và 80%; sang nhóm bò đẻ có nguy cơ cao bị viêm đường sinh dục thì tỷ lệ sạch dịch sau khi thụt xịt của nhóm iodine giảm còn 33,33% trong khi đó đối với nano là trên 70%. Bên cạnh đó còn tiết kiệm được chi phí, thời gian sạch dịch sau khi thụt bảo tồn của chế phẩm kháng khuẩn theo giải pháp hữu ích là 8-12 ngày.

Bảng 8. Ảnh hưởng của chế phẩm chứa kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit so sánh với dung dịch iodine 2% đến thời gian động dục lại của bò

Chỉ tiêu	Đơn Vị	Iodin 2%		CP Nano 100ppm		CP nano 150ppm	
		Lô 1	Lô 1-1	Lô 2	Lô 2-2	Lô 3	Lô 3-3
Số bò tham gia thí nghiệm	con	15	15	15	15	15	15
Số bò động dục lại	con	13	7	15	15	13	12
Tỷ lệ số bò động dục lại	%	86,67	46,67	100	100	86,67	80

Số ngày bò động dục lại trung bình	ngày	91,83	90,01	89,4	84,6	94,25	86
------------------------------------	------	-------	-------	------	------	-------	----

*CP – chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit

Qua bảng 8 có thể nhận thấy việc sử dụng chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit để thụ xít tử cung đem lại hiệu quả cao trong quá trình động dục trở lại của bò. Cụ thể, ở nhóm bò có nguy cơ mắc bệnh viêm đường sinh dục ở lô 1-1 đối chứng (iodine 2%) thì tỉ lệ bò động dục lại là 46,67% sau thời gian trung bình là 90 ngày thấp hơn so với trường hợp sử dụng chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit với nồng độ nano bạc là 150 ppm ở lô 3-3 trong đó tỉ lệ bò động dục lại là 80% sau thời gian trung bình 86 ngày. Đồng thời ở nhóm chế phẩm kháng khuẩn với nồng độ nano là 100 ppm (lô 2-2) có thể thấy tỉ lệ bò động dục lại 100% sau thời gian trung bình là 84,6 ngày. Qua đó có thể thấy việc thay thế dung dịch iodine 2% bằng chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit đem lại lợi ích rõ rệt trong việc rút ngắn thời gian động dục và tỷ lệ động dục cao ở bò sữa.

Qua bảng 9, kết quả thu được cho thấy tỷ lệ thụ thai lần đầu phối giống đối với nhóm bò đẻ bình thường ở các lô 1, 2, 3 được thụ xít bằng dung dịch iodine 2% và chế phẩm kháng khuẩn ở 2 nồng độ nano bạc là 100 ppm và 150 ppm tương ứng là 15,38%; 20%; 30,77%. Từ đó có thể thấy việc sử dụng thay thế dung dịch iodine bằng chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit cho hiệu quả thụ thai lần đầu tăng từ 5-15%.

Bảng 9. Ảnh hưởng của chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit và dung dịch iodine 2% đến tỷ lệ thụ thai tại lần đầu phối giống của bò

Chỉ tiêu	Đơn vị	Iodin 2%		CP Nano 100ppm		CP nano 150ppm	
		Lô 1	Lô 1-1	Lô 2	Lô 2-2	Lô 3	Lô 3-3
Số bò được phối phối	Con	13	7	15	15	13	12
Số con phối có chữa ở lần đầu phối giống	Con	2	1	3	3	4	3
Tỷ lệ bò chữa ở lần đầu phối giống	%	15,38	14,28	20,0	20,0	30,77	25,00

*CP – chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit

Quy trình thụ rửa tử cung bò bằng chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit với nồng độ nano bạc là 100 ppm:

- Xác định danh tính bò bị bệnh cách li theo dõi.

- Tiến hành thụt rửa vào tử cung bò 100 ml/con bằng chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit với nồng độ xác định nano bạc là 100 ppm, chế phẩm kháng khuẩn được đưa vào bên trong tử cung bò thông qua ống ghen vô trùng.

- Thời gian tiếp xúc 15 phút.

- Mỗi lần thụt rửa dung dịch vào tử cung của bò cách nhau 3 ngày.

- Cứ mỗi lần thụt tiếp theo, lấy mẫu dịch cổ tử cung nuôi cấy vi sinh trong phòng thí nghiệm nếu âm tính với vi sinh vật dùng điều trị. Nếu mẫu nuôi cấy dịch tử cung cho kết quả dương tính, tiếp tục lặp lại quá trình điều trị để thu được hiệu quả mong muốn.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Nhờ việc sử dụng chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit với nồng độ nano bạc 500 mg/l để phòng ngừa và điều trị viêm tử cung ở bò sữa thay thế dung dịch iodine 2% đã nâng cao hiệu quả chăn nuôi bò sữa với các chỉ số chăn nuôi đều được cải thiện đáng kể: độ sạch dịch tử cung sau khi bò đẻ, thời gian động dục trở lại, tỷ lệ thụ thai tại lần đầu phối giống, hạn chế dịch bệnh. Nhờ vậy việc chăn nuôi bò sữa mang lại hiệu quả kinh tế cao hơn, giúp đàn bò sinh trưởng và phát triển bền vững hơn so với kỹ thuật sử dụng dung dịch iodine 2%. Ngoài ra, nhờ sử dụng chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit rất thấp (nano bạc 500 ppm, nano chitosan 500 ppm, hydro peroxit 3%) nên đã hạn chế đáng kể sự phát thải ra môi trường trong quá trình chăn nuôi.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình điều chế chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit dùng trong thú y, bao gồm các bước:

(i) điều chế nano bạc bằng phương pháp khử hóa học muối bạc bằng borohydrid với chất phân tán và ổn định để thu được dung dịch nano bạc nồng độ 500-1500 ppm và kích thước hạt nano bạc nằm trong khoảng 5 nm đến 20 nm:

nước deion được sử dụng để tiến hành phản ứng, dung dịch muối bạc chứa 0,79-2,36 g/l ion Ag^+ được khuấy bằng thiết bị khuấy cơ học IKA tốc độ 2000 vòng/phút tới khi đồng nhất sau đó tiến hành phản ứng khử từ từ bằng NaBH_4 ở nhiệt độ phòng, thu được dung dịch nano bạc 1500 ppm có kích thước hạt nano bạc trung bình từ 5-20 nm;

(ii) điều chế nano chitosan bằng cách hòa tan chitosan trong axit metacrylic (MMA, nồng độ 1,95 ml MMA/1000 ml nước deion), tiến hành khuấy trong 12 giờ cho đến khi dung dịch đồng nhất; sau đó kali persulfat được thêm từ từ vào dung dịch trên sao cho tỷ lệ khối lượng của chitosan và kali persulfat từ 30 đến 40, nâng nhiệt độ lên 75°C và khuấy mạnh trong 2 giờ để phản ứng de-polyme hóa diễn ra hoàn toàn; dung dịch thu được tiếp tục mang ngâm trong nước đá làm lạnh để giảm về nhiệt độ phòng, thu được nano chitosan có nồng độ là 1500 ppm, kích thước hạt nano chitosan thu được nằm trong khoảng 40 nm đến 60 nm; và

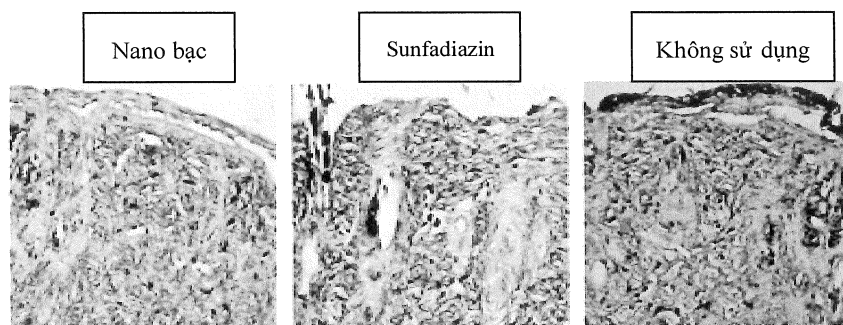
(iii) phối trộn dung dịch nano bạc thu được ở bước (i), nano chitosan thu được ở bước (ii), hydro peroxit nồng độ 30% và nước deion theo tỷ lệ lần lượt là 33,3%:33,3%:10,0%:23,4% được khuấy đều bằng máy khuấy cơ học để thu được chế phẩm kháng khuẩn chứa nano bạc, nano chitosan và hydro peroxit.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó nồng độ nano bạc trong chế phẩm kháng khuẩn ở bước (iii) là 166-500 ppm.

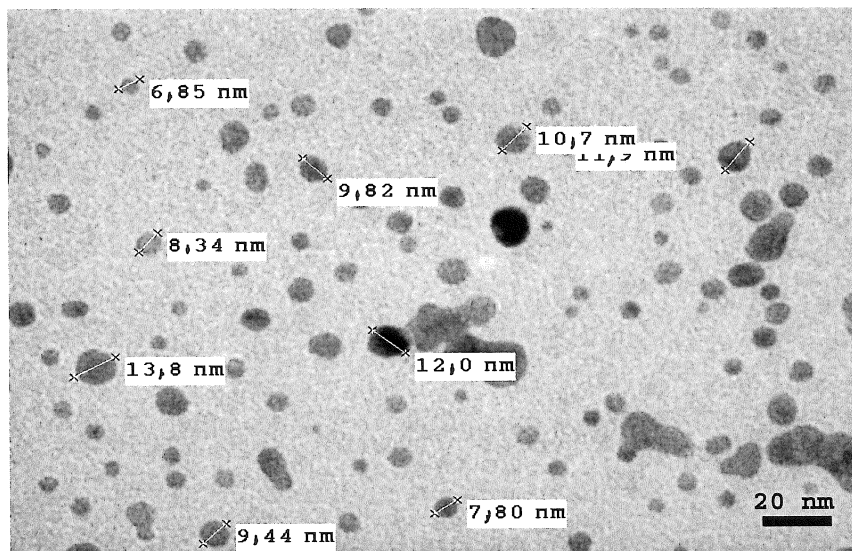
3. Quy trình theo điểm 1 hoặc 2, trong đó nồng độ nano chitosan trong chế phẩm kháng khuẩn là 500 ppm.

4. Quy trình theo các điểm từ 1 đến 3, trong đó nồng độ hydro peroxit trong chế phẩm kháng khuẩn là 3%.

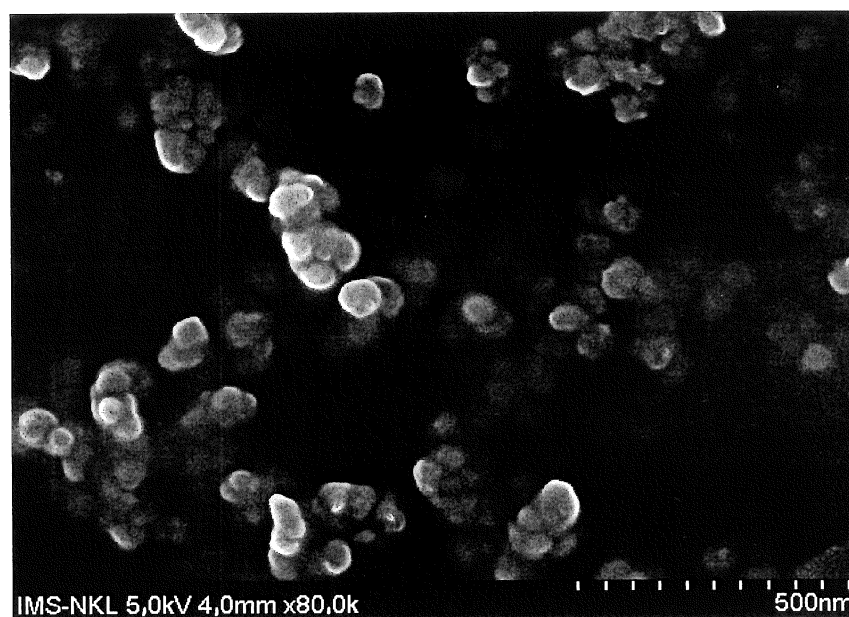
5. Chế phẩm kháng khuẩn thu được bởi quy trình theo điểm 1 dùng để phòng và trị bệnh viêm đường sinh dục trong thú y.



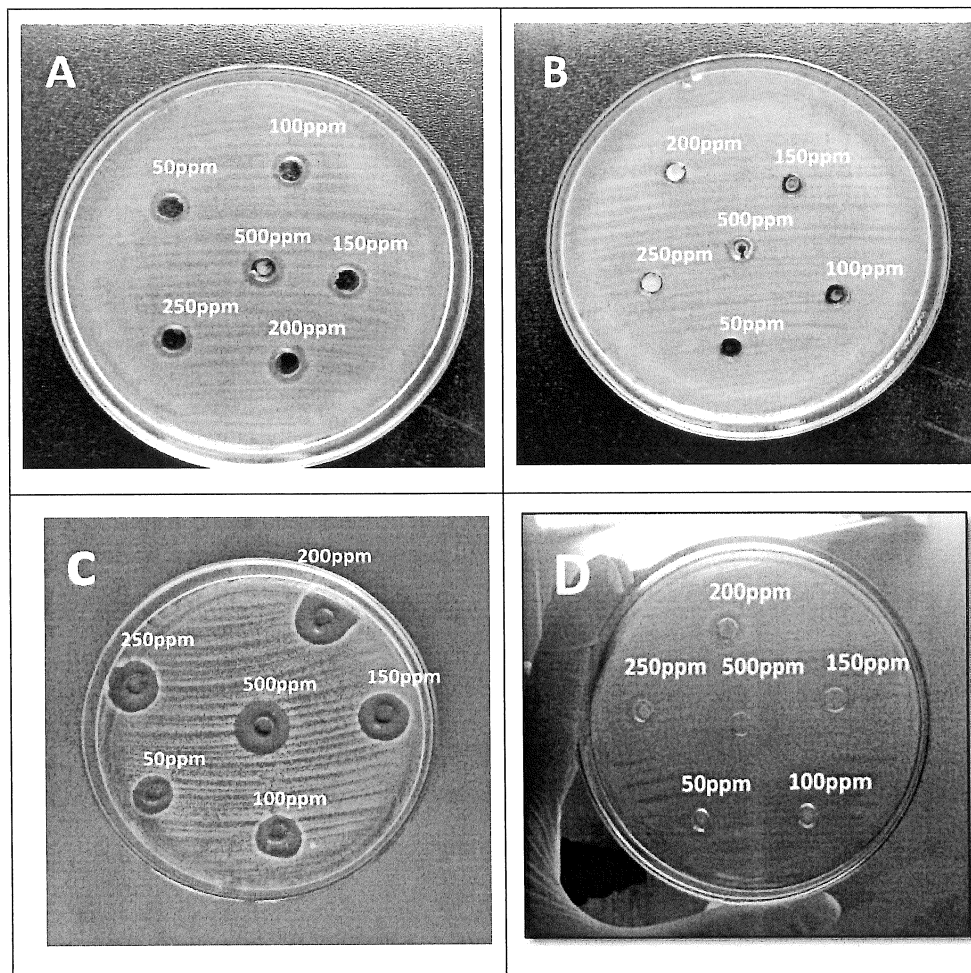
Hình 1



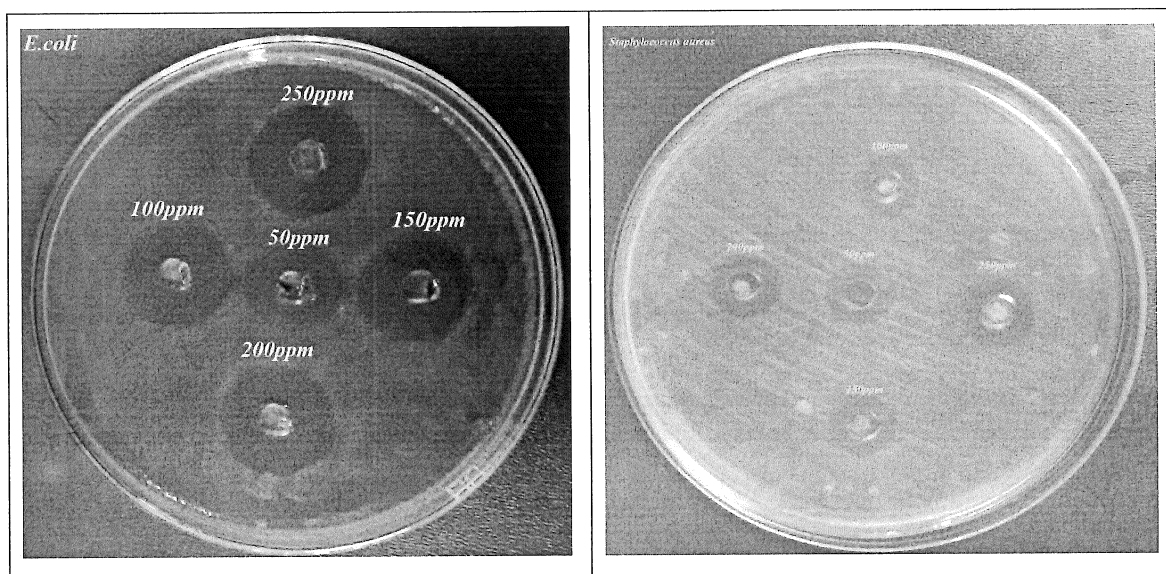
Hình 2



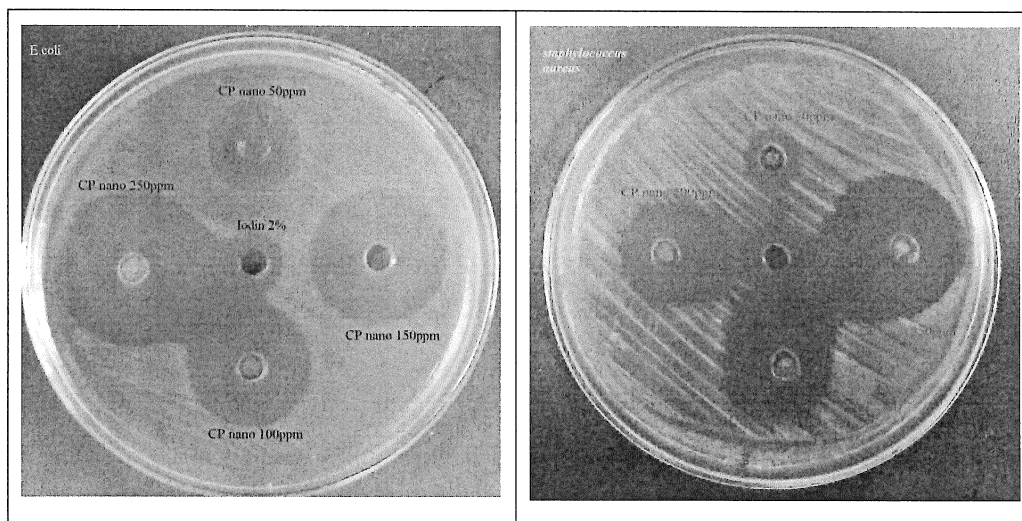
Hình 3



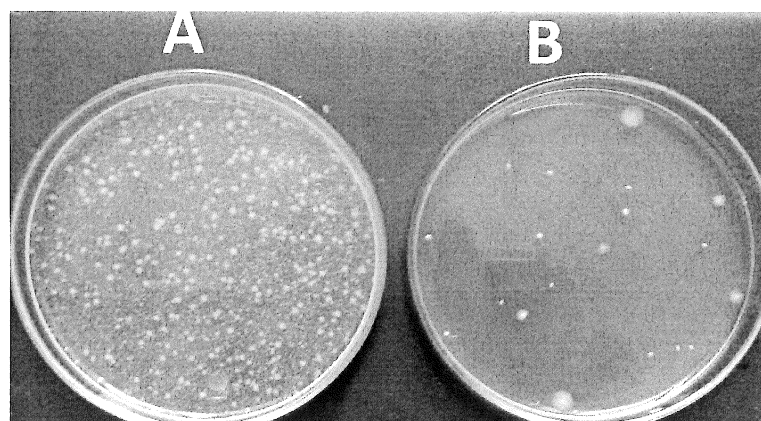
Hình 4



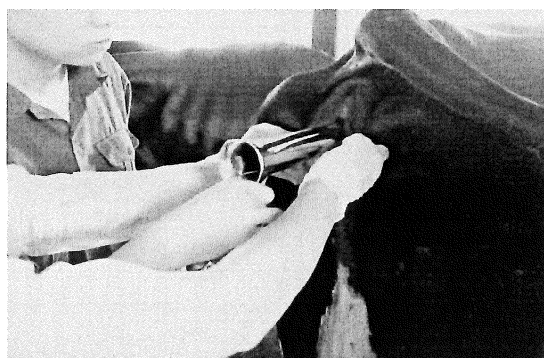
Hình 5



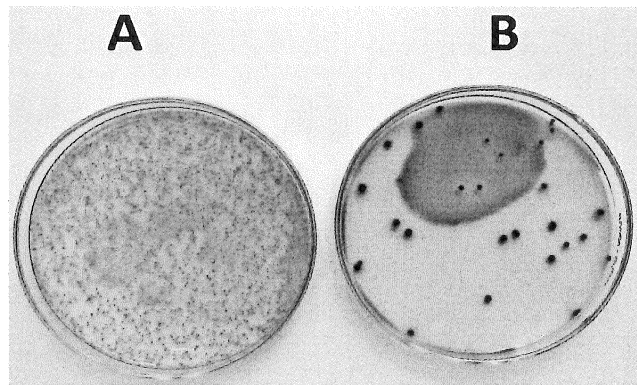
Hình 6



Hình 7



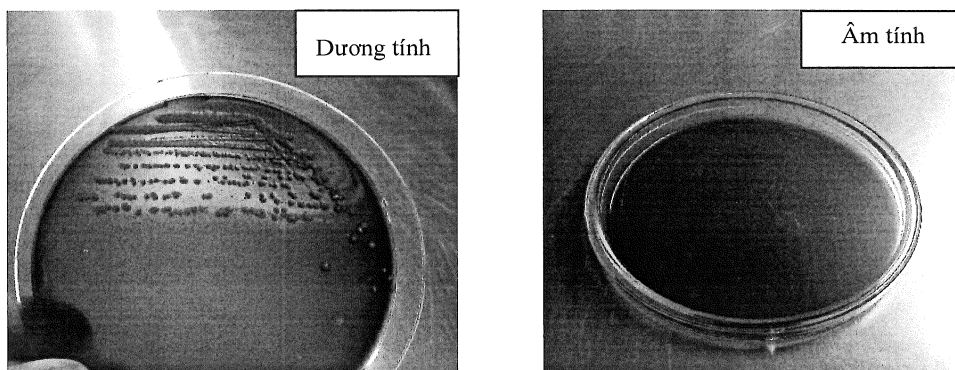
Hình 8



Hình 9



Hình 10



Hình 11