

# Nghiên cứu nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của dung dịch Nano bạc đối với một số chủng vi khuẩn

Trương Thu Hiền\*; Nguyễn Như Lâm\*

## TÓM TẮT

Nghiên cứu nồng độ diệt khuẩn tối thiểu theo phương pháp pha loãng bậc hai nồng độ nano bạc 400 ppm do Viện Công nghệ Môi trường sản xuất trên chủng vi khuẩn (VK) quốc tế *P.aeruginosa* ACCT27853, *S.aureus* ACCT25923 và *E.coli* ACCT25922. Kết quả: nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của nano bạc đối với *P.aeruginosa* là 100 mg/l sau 2 giờ, 50 mg/l sau 6 giờ và 3,125 mg/l sau 24 giờ tiếp xúc. Đối với *S.aureus*, nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của nano bạc là 12,5 mg/l, 6,25 mg/l và 0,781 mg/l sau 2 giờ, 6 giờ và 24 giờ tiếp xúc. Dung dịch nano bạc có tác dụng diệt khuẩn hoàn toàn *E.coli* sau 2 giờ tiếp xúc ở nồng độ 3,125 mg/l, 0,391 mg/l sau 6 giờ và 0,195 mg/l sau 24 giờ tiếp xúc.

\* Từ khóa: Nano bạc; Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu; Vi khuẩn vết bỏng.

## Study of minimum bacterial concentration of nano Ag in some bacterial species

### SUMMMARY

Minimum bacterial concentration (MBC) of 400 ppm nano Ag at variable diluted solutions was determined for *P.aeruginosa* ACCT27853, *S.aureus* ACCT25923 and *E.coli* ACCT25922. Result: MBCs of nano Ag solution for *P.aeruginosa* after exposed time of 2h, 6h and 24h were 100 mg/l, 50 mg/l and 3.125 mg/l respectively. For *S.aureus*, the MBCs were 12.5 mg/l, 6.25 mg/l and 0.781 mg/l respectively. For *E.coli*, the MBCs after exposed time of 2h, 6h and 24h were 3.125 mg/l, 0.391 mg/l and 0.195mg/l, respectively.

\* Key word: Nano Ag; MBC; Burn wound.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Bạc và các sản phẩm từ bạc đã được sử dụng trong đời sống và y học từ xa xưa. Hiện nay, công nghệ nano phát triển đã mở ra những triển vọng ứng dụng mới cho các sản phẩm từ bạc. Trong lĩnh vực điều trị vết thương bỏng, băng nano bạc dưới các dạng thương mại như acticoat, aquacel Ag, băng anson... đã được ứng dụng nhiều tại các trung tâm bỏng trên thế giới với những

ưu điểm vượt trội và khắc phục được nhiều khiếm khuyết của các sản phẩm chứa bạc trước đây [1, 2, 5]. Tuy nhiên, giá thành của những sản phẩm này còn cao.

Tại Việt Nam, nano bạc do Viện Công nghệ và Môi trường đã được bào chế thành công và ứng dụng vào một số lĩnh vực của đời sống xã hội. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào về vai trò của nano bạc trong điều trị bỏng. Do vậy, chúng tôi tiến hành đề tài

\* Viện Bỏng Quốc gia

Phân biện khoa học: TS. Nguyễn Thái Sơn

này với mục tiêu nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của dung dịch nano bạc sản xuất

trong nước trên một số chủng VK quốc tế thường gặp ở bệnh nhân (BN) bỏng.

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu tiến hành tại Labo vi sinh vật, Viện Bông Quốc gia theo phương pháp pha loãng nồng độ trong môi trường lỏng với các bước như sau: tạo đĩa thạch chuẩn: VK 24 giờ tuổi, chủng quốc tế gồm *P.aeruginosa* ACCT27853, *S.aureus* ACCT25923 và *E.coli* ACCT25922 với số lượng  $10^8$ CFU/ml được pha loãng theo tỷ lệ 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10.000, 1/100.000, 1/1000.000, 1/10.000.000 tương đương với đậm độ từ  $10^8$  đến  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  VK/ml. Kê mặt sau đĩa thạch thành 7 đường có độ dài 5 cm. Mỗi đường ghi ký hiệu thứ tự từ  $10^8$  đến  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ . Cấy VK theo ký hiệu, ủ ấm  $37^{\circ}\text{C}$  trong 24 giờ. Tạo đĩa thạch thử nghiệm: thạch nutrient agar hấp ở  $121^{\circ}\text{C}$  trong 15 phút, để nguội  $45 - 50^{\circ}\text{C}$ , đổ đĩa petri dày 4 mm, để đông tự nhiên. Mặt sau các đĩa petri kẻ những đường có độ dài 5 cm, mỗi đường ghi các ký hiệu từ 1/2 đến 1/4096.

Dung dịch nano bạc 400 ppm do Viện Công nghệ Môi trường cung cấp làm dung

dịch mẹ, pha loãng bậc 2 với nước cất để có nồng độ 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048 và 1/4096 với nồng độ tương đương là 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,563; 0,781; 0,391; 0,195 và 0,0925 ppm.

VK thử nghiệm 24 giờ tuổi đậm độ  $10^8$  CFU/ml cho tiếp xúc với nồng độ từ 1/2 đến 1/4096 của dung dịch nano bạc trong ống nghiệm, sau đó đưa vào tủ ấm  $37^{\circ}\text{C}$ . Sau mỗi thời điểm 2 giờ, 6 giờ và 24 giờ, lấy hỗn dịch các loài VK đã được tiếp xúc với dung dịch nano bạc ở những nồng độ khác nhau, cấy trên thạch nutrient agar thành đường cấy dài 5 cm, mỗi nồng độ thành một đường cấy riêng biệt trên thạch theo các vị trí đã được đánh dấu, ủ ở  $37^{\circ}\text{C}$  trong 24 giờ. Đọc kết quả theo đĩa thạch chuẩn.

Đánh giá kết quả bằng kiểm tra hoạt tính diệt khuẩn dung dịch nano bạc ở các thời điểm so với đĩa thạch chuẩn, xem mỗi nồng độ nano bạc ứng với nồng độ nào của VK. Nếu không mọc VK, kết luận: dung dịch nano bạc ở nồng độ đó sau thời gian tiếp xúc 2 giờ, 6 giờ hoặc 24 giờ đã diệt khuẩn hoàn toàn. Xử lý số liệu theo chương trình Intecool 9.0,  $p \leq 0,05$  được coi có ý nghĩa thống kê.

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

*Bảng 1: Hoạt tính kháng khuẩn đối với P.aeruginosa.*

ĐỘ PHA LOÃNG NANO BẠC		MỨC ĐỘ GIẢM NỒNG ĐỘ VK (so với nồng độ chuẩn)		
Tỷ lệ	Nồng độ (mg/l)	2 giờ tiếp xúc	6 giờ tiếp xúc	24 giờ tiếp xúc
$\geq 1/4$	100	Diệt hoàn toàn	Diệt hoàn toàn	Diệt hoàn toàn
1/8	50	$10^2$	Diệt hoàn toàn	Diệt hoàn toàn
1/16	25	$10^3$	$10^2$	Diệt hoàn toàn
1/32	12,5	Không giảm	Không giảm	Diệt hoàn toàn
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
1/64	6,25	Không giảm	Không giảm	Diệt hoàn toàn

1/128	3,125	Không giảm	Không giảm	Diệt hoàn toàn
1/256	1,563	Không giảm	Không giảm	10 <sup>2</sup>
1/512	0,781	Không giảm	Không giảm	10 <sup>3</sup>
≤ 1/2048	0,391	Không giảm	Không giảm	Không giảm

*P. aeruginosa* bị tiêu diệt hoàn toàn khi tiếp xúc với dung dịch nano bạc ở nồng độ 100 mg/l sau 2 giờ tiếp xúc, 50 mg/l sau 6 giờ tiếp xúc và 3,125 mg/l sau 24 giờ tiếp xúc.

**Bảng 2:** Hoạt tính kháng khuẩn đối với *E.coli*.

ĐỘ PHA LOÃNG NANO BẠC		MỨC ĐỘ GIẢM NỒNG ĐỘ VK (so với nồng độ chuẩn)		
Tỷ lệ	Nồng độ (mg/l)	2 giờ tiếp xúc	6 giờ tiếp xúc	24 giờ tiếp xúc
≥ 1/128	3,125	Diệt hoàn toàn	Diệt hoàn toàn	Diệt hoàn toàn
1/256	1,563	10 <sup>2</sup>	Diệt hoàn toàn	Diệt hoàn toàn
1/512	0,781	10 <sup>3</sup>	Diệt hoàn toàn	Diệt hoàn toàn
1/1024	0,391	Không giảm	Diệt hoàn toàn	Diệt hoàn toàn
≤ 1/2048	0,195	Không giảm	10 <sup>2</sup>	Diệt hoàn toàn

Dung dịch nano bạc có tác dụng diệt hoàn toàn VK *E.coli* sau 2 giờ tiếp xúc ở nồng độ 3,125 mg/l, sau 6 giờ tiếp xúc ở nồng độ 0,391 mg/l và sau 24 giờ tiếp xúc ở nồng độ 0,195 mg/l.

**Bảng 3:** Hoạt tính kháng khuẩn đối với *S.aureus*.

ĐỘ PHA LOÃNG NANO BẠC		MỨC ĐỘ GIẢM NỒNG ĐỘ VK (so với nồng độ chuẩn)		
Tỷ lệ	Nồng độ (mg/l)	2 giờ tiếp xúc	6 giờ tiếp xúc	24 giờ tiếp xúc
≥ 1/16	25	Diệt hoàn toàn	Diệt hoàn toàn	Diệt hoàn toàn
1/32	12,5	Diệt hoàn toàn	Diệt hoàn toàn	Diệt hoàn toàn
1/64	6,25	10 <sup>2</sup>	Diệt hoàn toàn	Diệt hoàn toàn
1/128	3,125	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	Diệt hoàn toàn
1/256	1,563	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	Diệt hoàn toàn
1/512	0,781	Không giảm	10 <sup>4</sup>	Diệt hoàn toàn
≤ 1/1024	0,391	Không giảm	Không giảm	10 <sup>2</sup>

Dung dịch nano bạc có tác dụng diệt hoàn toàn *S.aureus* sau 2 giờ tiếp xúc ở nồng độ 12,5 mg/l, sau 6 giờ tiếp xúc ở nồng độ 6,25 mg/l và sau 24 giờ tiếp xúc ở nồng độ 0,781 mg/l.

### **BÀN LUẬN**

Đã có nhiều nghiên cứu xác nhận bạc dưới bất kỳ dạng nào, dù là dạng keo, dạng ion hoặc dạng hạt nano kim loại, đều thể

hiện khả năng kháng khuẩn theo cơ chế ức chế quá trình hô hấp của tế bào VK. Ngoài ra, các ion bạc còn có khả năng ức chế quá trình phát triển của VK bằng cách sản sinh ra oxy hoạt tính trên bề mặt của hạt bạc [1, 3, 4].

Để có được tính năng khử trùng tối ưu đòi hỏi các ion  $Ag^+$  tự do phải có mặt trong dung dịch và tiếp cận với bề mặt của tế bào VK, vì phân tử bạc phải có một hệ thống cho phép giải phóng từ từ các ion bạc vào trong dung dịch phản ứng. Bạc dưới dạng muối hòa tan ( $AgNO_3$ ) và sulfadiazine bạc không có khả năng giải phóng ion bạc một cách từ từ, vì hầu như ngay sau khi xuất hiện trong môi trường phản ứng, mặc dù với nồng độ rất cao có thể tới 3.200 ppm chúng thường bị bất hoạt sớm do liên kết với những ion trái dấu khác (clorua hoặc protein) để trở thành phân tử trung hòa, còn các ion bạc dưới dạng keo, không thể thoát nhanh ra khỏi hạt keo. Chỉ có các hạt nano bạc với diện tích bề mặt cực lớn mới có khả năng điều tiết quá trình giải phóng ion bạc với tốc độ cao và liên tục [1, 2].

Sản phẩm chứa nano bạc được ứng dụng nhiều trên thế giới để điều trị vết thương, vết bỏng hoặc dùng để tráng bề mặt dụng cụ y tế như các catheter tĩnh mạch trung tâm, dụng cụ khám chữa bệnh. Nghiên cứu tại Canada (2003), đánh giá tính năng khử trùng đối với 5 loài VK bệnh viện của 4 loại băng gạc là acticoat (băng nano bạc), dung dịch  $AgNO_3$ , kem sulphadiazin bạc và mafenit acetat. Kết quả cho thấy acticoat có nồng độ ức chế VK tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) nhỏ nhất và có vùng ức chế tương đương với  $AgNO_3$ , trong khi mafenit acetat có vùng ức chế VK

lớn nhất, nhưng lại có nồng độ MIC và MBC lớn nhất [6]. Một nghiên cứu khác cho thấy, nồng độ VK tụ cầu vàng đã kháng kháng sinh giảm rất nhanh tới  $10^2$  CFU/ml chỉ sau 30 phút tiếp xúc với nano bạc, trong khi với các tác nhân chứa bạc khác, nồng độ VK này chỉ giảm tới mức  $10^5$  CFU/ml [1]. Nghiên cứu của Tredget và CS (1998) thấy tỷ lệ nhiễm khuẩn toàn thân ở nhóm dùng băng nano bạc thấp hơn nhiều so với nhóm chứng [7]. Theo Huang và CS (2007), băng nano bạc có khả năng diệt khuẩn mạnh đối với tụ cầu vàng đã kháng kháng sinh (33% vết thương sạch VK) so với nhóm chứng (20% vết thương sạch VK) sau 6 ngày điều trị [3]. Nghiên cứu của Wright và CS (1998) cho thấy nano bạc có khả năng ức chế sự phát triển của trực khuẩn mủ xanh và tụ cầu vàng tới 9 ngày, cao hơn nhiều so với các sản phẩm chứa bạc khác [1]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của dung dịch nano bạc tương đối thấp, phù hợp với các kết quả nghiên cứu nêu trên.

## KẾT LUẬN

Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của nano bạc đối với *P.aeruginosa* ACTT27853 là 100 mg/l sau 2 giờ, 50 mg/l sau 6 giờ và 3,125 mg/l sau 24 giờ tiếp xúc. Đối với *S.aureus* ACTT 25923, nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của nano bạc là 12,5 mg/l, 6,25 mg/l và 0,781 mg/l sau 2 giờ, 6 giờ và 24 giờ tiếp xúc. Dung dịch nano bạc có tác dụng diệt khuẩn hoàn toàn *E.coli* ACTT 25922 sau 2 giờ tiếp xúc ở nồng độ 3,125 mg/l, 0,391 mg/l sau 6 giờ và 0,195 mg/l sau 24 giờ tiếp xúc.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. [Dunn K](#), [Edwards-Jones V](#). The role of acticoat with nanocrystalline silver in the management of burns. *Burns*. 2004, Suppl 1, pp.1-9.

2. [Fraser JF](#), [Bodman J](#), *et al*. An in vitro study of the anti-microbial efficacy of a 1% silver sulphadiazine and 0.2% chlorhexidine digluconate cream, and a silver coated dressing. *Burns*. 2004. 30 (1), pp.35-41.

3. [Huang Y](#), [Li X](#), [Liao Z](#). *et al*. A randomised comparative trial between acticoat and SD - Ag in the treatment of residual burn wounds, including safety analysis. *Burns*. 2007, 33 (2), pp.161-166.

4. [Khundkar R](#), [Malic](#), [Burge T](#). Use of acticoat dressing in burns: What is the evidence. *Burns*. 2010, 36, pp.751-758.

5. [O'Neill MA](#), [Vine GJ](#), *et al*. Antimicrobial properties of silver-containing wound dressings: a microcalorimetric study. *Int J Pharm*. 2003, 16, pp.61-68.

6. [Thomas S](#), [McCubbin P](#). A comparison of the antimicrobial effects of four silver-containing dressings on three organisms. *J Wound Care*. 2003. 12 (3), pp.101-107.

7. [Tredget EE](#), [Shankowsky HA](#), [Groenveld A](#). *Et al*. A matched - pair, randomized study evaluating the efficacy and safety of acticoat silver - coated dressing for the treatment of burn wound. *J Burn Care Rehabil*. 1998, 19 (6), pp.531-537.

