

Đánh giá khả năng kháng khuẩn của dung dịch chứa Nano bạc trong Ethanol các nồng độ khác nhau

INVESTIGATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF NANO SILVER SOLUTION IN ETHANOL AT DIFFERENT CONCENTRATIONS

Trần Văn Thanh, Nguyễn Phương Dung, Đặng Thị Nga

Học viện Y Dược học cổ truyền Việt Nam

TÓM TẮT

Mục tiêu: Khảo sát khả năng kháng khuẩn của dung dịch Nano bạc trong ethanol sẽ giúp lựa chọn nồng độ Nano bạc và ethanol thấp nhất cho hiệu quả kháng khuẩn cao nhất.

Phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu thực nghiệm bằng cách pha loãng nồng độ nano bạc và nồng độ ethanol, đánh giá khả năng diệt khuẩn trên 3 chủng *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 và *E. coli* ATCC 11775.

Kết quả: Dung dịch Nano bạc 1,53 ppm trong ethanol nồng độ trong nước từ 40,4 %- 70,3 % có khả năng diệt khuẩn 100% ở mọi thời gian ủ được thực hiện. Dung dịch Nano bạc 1,53 ppm trong ethanol 30,4% chỉ diệt khuẩn 100% VK *P. aeruginosa* ATCC 27853 và *S. aureus* ATCC 25923 khi ủ trong thời gian 1h, 2 h hoặc 4h và diệt 100 % *E.coli* ATCC 11775 ở mọi thời gian ủ được thực hiện. Dung dịch Nano bạc 1,53 ppm trong ethanol 20,4%, 10,5% không có hiệu quả diệt khuẩn đáng kể. Dung dịch Nano bạc các nồng độ 1,02; 0,51; 0,26 ppm trong ethanol 40,4% đều có khả năng diệt khuẩn 100% ở mọi thời gian ủ được thực hiện.

Kết luận: Nano bạc 0,26 ppm kết hợp ethanol 40,4% là nồng độ thấp nhất có khả năng diệt khuẩn hoàn toàn với cả 3 chủng VSV nghiên cứu: *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 và *E. coli* ATCC 11775

ABSTRACT

Objectives: Survey the antibacterial ability of Nano silver and ethanol solution to help select the lowest concentration of silver Nano and ethanol for the highest antibacterial effect.

Methods: This research conducted by method of dilute concentrations of other silver nanoparticles solution and ethanol using *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 and *E. coli* ATCC 11775.

Results: Nano silver solution of 1.53 ppm in ethanol with concentration in water from 40.4% to 70.3% has the ability to kill bacteria 100% at all incubation times. Nano silver solution of 1.53 ppm in 30.4% ethanol only kills 100% of bacteria VK *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *S. aureus* ATCC 25923 when incubated for 1h, 2h

Ngày nhận bài: 20/01/2022

Ngày phản biện: 25/01/2022

Ngày chấp nhận đăng: 15/2/2022



or 4h and kills 100% of E.coli ATCC 11775 at all incubation times were performed. Nano silver solution of 1.53 ppm in 20.4% ethanol, 10.5% didn't have significant bactericidal effect. Silver Nano solution with concentrations of 1.02; 0.51; 0.26 ppm in 40.4% ethanol were 100% bactericidal at all incubation times.

Conclusion: Nano silver 0.26 ppm combined with ethanol 40.4% was the lowest concentration with totally bactericidal activity against all 3 strains of microorganisms studied: *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 and *E. coli* ATCC 11775

Keyword: nano silver, antibacterial effect.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở kích thước nano, phân tử bạc có kích thước rất nhỏ, làm tăng diện tích bề mặt của bạc và nhờ đó khả năng diệt khuẩn được tăng lên gấp nhiều lần [6]. Nhiều kết quả nghiên cứu cho thấy, nano bạc có hoạt tính kháng khuẩn cao trên cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm như *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholera*. Tuy nhiên, các đề tài này sử dụng dung dịch nano bạc với nồng độ cao, lâu dài có nguy cơ ảnh hưởng đến sức khỏe con người [1], [2]. Vì vậy nhu cầu thực tiễn đặt ra là cần tạo dung dịch nano bạc với nồng độ thấp nhất và khả năng kháng khuẩn cao nhất.

Ngoài nano bạc, một dung môi hữu cơ thông dụng, an toàn và có hiệu quả kháng khuẩn mạnh đó là ethanol. Ethanol có khả năng diệt vi khuẩn tốt nhưng cần thời gian từ 10 giây tới 1 giờ tùy loại vi khuẩn. Ethanol không diệt hoàn toàn vi khuẩn khi sử dụng như nước sát khuẩn tay vì thời gian bay hơi dưới 10 giây [5]. Khi đó, việc kết hợp ethanol và nano bạc sẽ giúp các hạt nano bạc đọng lại bám trên vi khuẩn tiếp xúc tiêu diệt vi khuẩn. Việc khảo sát khả năng kháng khuẩn của dung dịch Nano bạc trong ethanol sẽ giúp lựa chọn nồng độ Nano bạc và ethanol thấp nhất cho hiệu quả kháng khuẩn cao nhất.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Hóa chất

- Hóa chất thực nghiệm: dung dịch nano bạc 1020,726 mg/lít (Viện công nghệ xạ hiếm- Viện

Năng lượng Nguyên tử Quốc gia), Ethanol 99,7% (Merck- Đức).

- Chúng vi khuẩn: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* cung cấp bởi Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh.

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị dung dịch Nano bạc trong ethanol

- Chuẩn bị dung dịch Nano bạc 1,53 ppm trong ethanol nồng độ 70,3; 60,3; 50,3; 40,4; 30,4; 20,4; 10,5 % và thử hoạt tính kháng khuẩn, lựa chọn được nồng độ ethanol phù hợp nhất.

- Chuẩn bị dung dịch Nano bạc các nồng độ 1,02; 0,51; 0,26 ppm trong ethanol phù hợp vừa lựa chọn ở trên, lựa chọn được nồng độ bạc phù hợp nhất.

Phương pháp đánh giá khả năng kháng khuẩn

Phương pháp thực hiện: Sử dụng phương pháp khuếch tán đĩa thạch.

Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của dung dịch nano bạc được xác định khi lượng khuẩn lạc mọc trên môi trường nuôi cấy $\leq 0,1\%$ lượng khuẩn lạc trên mẫu chứng.

Các số liệu trong các bảng là giá trị trung bình thu được của 03 thí nghiệm lặp lại.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Tiến hành pha chế các mẫu thử theo đúng 7 công thức pha chế được thiết lập. Các mẫu thử được tiến hành cấy VSV và tiến hành với 5 điều kiện: không ủ, ủ 15 phút, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ.

Bảng 1. Các công thức pha chế mẫu thử với nồng độ nano bạc 1,53 ppm

Nồng độ ethanol (%)		Loại vi sinh vật thử nghiệm	Kết quả VSV còn sống sau các thời gian ủ (CFU/ml)			
			Không ủ			
			Ủ 1 h	Ủ 2h	Ủ 4h	
CT1-4	70,3 – 40,4	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0	0	0	0
		<i>E.coli</i> ATCC 11775	0	0	0	0
CT5	30,4	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	20,15 x 10 ³	0	0	0
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	570	0	0	0
		<i>E.coli</i> ATCC 11775	0	0	0	0
CT6	20,4	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	5,25 x 10 ⁶	2,7 x 10 ⁶	19,5 x 10 ³	34,5 x 10 ²
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2,5 x 10 ⁶	306	0	0
		<i>E.coli</i> ATCC 11775	2,3 x 10 ⁶	56,5 x 10 ²	0	0
CT7	10,5	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	6,01 x 10 ⁶	5,8 x 10 ⁶	5,23 x 10 ⁶	4,9 x 10 ⁶
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3,02 x 10 ⁶	2,43 x 10 ⁶	2,1 x 10 ⁶	1,87 x 10 ⁶
		<i>E.coli</i> ATCC 11775	5,03 x 10 ⁶	4,07 x 10 ⁶	3,88 x 10 ⁶	3,3 x 10 ⁶

- Các dung dịch Nano bạc 1,53 ppm trong ethanol nồng độ khác nhau (trong nước từ 40,4 % đến 70,3 %) đều có khả năng diệt khuẩn 100% ngay khi vừa tiếp xúc và ở mọi thời gian ủ được thực hiện. Còn các dung dịch Nano bạc 1,53 ppm trong ethanol 30,4% chỉ diệt khuẩn 100% VK *P. aeruginosa* ATCC 27853 và *S. aureus* ATCC 25923 khi ủ trong thời gian 1h, 2 h hoặc 4h và diệt 100 % *E.coli* ATCC 11775 ngay khi vừa tiếp xúc và ở mọi thời gian ủ được thực hiện.

- Dung dịch theo công thức 6 (20,4% ethanol) không diệt hết *P. aeruginosa* ATCC 27853 vừa tiếp

xúc và ở mọi thời gian ủ; chỉ diệt hết 100% VK *S. aureus* ATCC 25923 và *E.coli* ATCC 11775 trong khoảng thời gian 2 h hoặc 4h.

- Dung dịch theo công thức 7 (10,5% ethanol) không diệt được hết 100% cả 3 loại VSV khi vừa tiếp xúc và ở mọi thời gian ủ được thực hiện.

Khảo sát nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của dung dịch nano bạc trong ethanol

Tiếp tục khảo sát tác dụng kháng khuẩn của dung dịch Nano bạc các nồng độ 1,02; 0,51; 0,26 ppm trong ethanol 40,4%, và dung dịch Nano bạc 0,26 ppm.

Bảng 2. Các công thức pha chế với nồng độ ethanol 40,4% và không có ethanol

TT	Công thức	Loại vi sinh vật thử nghiệm	Kết quả VSV còn sống sau các thời gian ủ (CFU/ml)			
			Không ủ	Ủ 1 h	Ủ 2h	Ủ 4h
1	Nano bạc 1,02 ppm + Ethanol 40,4%	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0	0	0	0
		<i>E.coli</i> ATCC 11775	0	0	0	0
2	Nano bạc 0,51 ppm + Ethanol 40,4%	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0	0	0	0
		<i>E.coli</i> ATCC 11775	0	0	0	0



3	Nano bạc 0,26 ppm + Ethanol 40,4%	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0	0	0	0
		<i>E.coli</i> ATCC 11775	0	0	0	0
4	Nano bạc 0,26 ppm	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	$6,2 \times 10^6$	$5,4 \times 10^6$	5×10^6	$4,71 \times 10^6$
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	$5,1 \times 10^6$	$3,91 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$3,01 \times 10^6$
		<i>E.coli</i> ATCC 11775	$3,15 \times 10^6$	$2,31 \times 10^6$	$2,02 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$

Các dung dịch Nano bạc các nồng độ 1,02; 0,51; 0,26 ppm trong ethanol 40,4% đều có khả năng diệt khuẩn 100% ngay khi vừa tiếp xúc và ở mọi thời gian ủ được thực hiện. Dung dịch nano bạc 0,26 ppm không diệt được hoàn toàn VSV thử nghiệm ngay cả khi ủ đến 4 giờ, mật độ VSV bị tiêu diệt không đáng kể.

BÀN LUẬN

Khảo sát nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của dung dịch ethanol trong chế phẩm

Nghiên cứu cho thấy, dung dịch nano bạc kết hợp với dung dịch Ethanol các nồng độ khác nhau đều có tác dụng diệt khuẩn. Thời gian ủ càng lâu và nồng độ càng cao, khả năng diệt khuẩn của dung dịch càng tốt. Dung dịch nano bạc 1,53 ppm kết hợp với dung dịch ethanol các nồng độ 40 – 70 % đều có tác dụng diệt khuẩn 100% ngay khi vừa tiếp xúc và ở mọi thời gian ủ; khi giảm nồng độ ethanol xuống còn 30% tác dụng diệt khuẩn giảm đi và có hiệu quả 100% sau 15 phút. Khi giảm nồng độ ethanol xuống còn 20% và 10% tác dụng giảm rõ rệt và hầu như không có tác dụng đáng kể ở nồng độ 10%.

Theo hướng dẫn của WHO về Vệ sinh Bàn tay trong Chăm sóc sức khỏe dung dịch ethanol ở nồng độ 60–80 % có hiệu quả nhất, với nồng độ cao hơn là ít mạnh hơn [7].

Theo Trung tâm Kiểm soát và Phòng ngừa dịch bệnh Mỹ (CDC), các VSV gram âm như *E. coli*, *P. aeruginosa* bị tiêu diệt trong 10 giây bởi tất cả các nồng độ ethanol từ 40% đến 100%. Các sinh vật

gram dương như *S. aureus* bị tiêu diệt trong 10 giây bởi ethanol có nồng độ 60 – 95% [5]. Brian M Peters và cộng sự (2013) nghiên cứu hiệu quả của ethanol trên vi khuẩn *S. aureus*, kết quả ethanol nồng độ 50% ức chế hoàn toàn sự phát triển của *S. aureus* [3]. Các kết quả này tương đương với kết quả mà đề tài khảo sát được, đặc biệt khi kết hợp ethanol 40,4 % và nano bạc 1,53 ppm có hiệu quả diệt khuẩn hoàn toàn với cả 3 chủng VSV trên ngay khi vừa tiếp xúc. Từ đó, nghiên cứu đã lựa chọn Ethanol 40,4 % là nồng độ tối ưu cho thử nghiệm tiếp theo.

Khảo sát nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của dung dịch nano bạc trong ethanol

Dung dịch ethanol 40% kết hợp với dung dịch nano bạc các nồng độ 1,02 ppm; 0,51 ppm; 0,26 ppm đều có tác dụng diệt khuẩn hoàn toàn. Khả năng kháng khuẩn của dung dịch chỉ có nano bạc 0,26 ppm giảm. Dung dịch nano bạc 0,26 ppm không có khả năng diệt khuẩn với 3 chủng vi khuẩn thử nghiệm ngay cả khi được ủ đến 4 giờ. Từ đó cho thấy hiệu quả vượt trội của dung dịch kết hợp nano bạc 0,26 ppm và ethanol 40,4 %.

Trong nghiên cứu, hiệu quả diệt khuẩn Gram âm (*E. coli*) tốt hơn vi khuẩn Gram dương (*S. aureus*) trong tất cả các mẫu dung dịch pha chế được. Điều này được lí giải do sự khác biệt trong cấu tạo thành tế bào vi khuẩn. Thành tế bào vi khuẩn Gram dương dày với cấu trúc nhiều lớp peptidoglycan (so với đơn lớp ở vi khuẩn Gram âm), vì vậy quá trình xâm nhập của các ion Ag^+ do các nano bạc phóng thích

vào tế bào vi khuẩn Gram dương sẽ khó khăn hơn [4]. Nguyễn Như Lâm và cộng sự (2009) xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của tiểu phân nano bạc với *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 và *E. coli* ATCC 25922 lần lượt là 100 ppm; 12,5 ppm và 3,125 ppm sau 2 giờ tiếp xúc; và 3,125 ppm; 0,781 ppm và 0,195 ppm sau 24 giờ tiếp xúc [2]. Nghiên cứu xác định được nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của nano bạc là 0,26 ppm khi được kết hợp với ethanol 40,4 % có khả năng diệt khuẩn hoàn toàn đối với 3 chủng VSV ngay khi vừa tiếp xúc. Như vậy, đã khảo sát được nồng độ nano bạc tương đối thấp mà có khả năng diệt khuẩn tốt khi được kết hợp với ethanol 40,4%.

Trần Việt Hùng, Đoàn Cao Sơn và cộng sự (2012) đã nghiên cứu bào chế gel rửa tay không dùng nước kết hợp 2 tác nhân sát khuẩn là ethanol (70% kl/kl) và nano bạc với nồng độ bạc 10 ppm, hiệu quả diệt khuẩn của gel rửa tay sát khuẩn nano

bạc là 99,99% [1]. Như vậy nghiên cứu đã kết hợp nano bạc và ethanol với nồng độ thấp hơn cho hiệu quả diệt khuẩn đối với 3 chủng vi khuẩn *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 và *E. coli* ATCC 11775.

KẾT LUẬN

- Trong số các nồng độ ethanol khảo sát, khi kết hợp với nano bạc, nồng độ ethanol 40,4% là nồng độ thấp nhất có khả năng diệt khuẩn tốt nhất với cả 3 chủng VSV nghiên cứu: *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 và *E. coli* ATCC 11775 thấp hơn nồng độ ethanol tối thiểu được khuyến cáo trong các sản phẩm sát khuẩn tay 60%.

- Nghiên cứu đã khảo sát được nồng độ nano bạc thấp nhất là 0,26 ppm kết hợp với ethanol 40,4% cho hiệu quả diệt khuẩn tốt, thấp hơn nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của dung dịch nano bạc trong các nghiên cứu trước đó.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Trần Việt Hùng và Đoàn Cao Sơn và cộng sự (2016)**. Khảo sát tác dụng diệt khuẩn của gel rửa tay không dùng nước có chứa ethanol và nano bạc. *Tạp chí Dược học*, **477(1)**, 49–57.
2. **Trương Thu Hiền và Nguyễn Như Lâm (20210)**. Nghiên cứu nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của dung dịch Nano bạc đối với một số chủng vi khuẩn. *Tạp chí Y dược học quân sự*, **8**, 95–99.
3. **Peters BM và Ward RM et al (2013)**, Efficacy of ethanol against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, **57(1)**, 74–82.
4. **Qing Y và Cheng L et al (2018)**. Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *International journal of nanomedicine*, **13**, 3311–3327.
5. **U.S. Department of Health & Human Services (2008)**. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. .
6. **Wang JJ và Xue YY (2016)**. Antimicrobial Applications and Toxicity of Nano – Silver in the Medical Field. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*, **32(10)**, 631–634.
7. **WHO (2009)**. WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care. First Global Patient Safety Challenge Clean Care is Safer Care.