

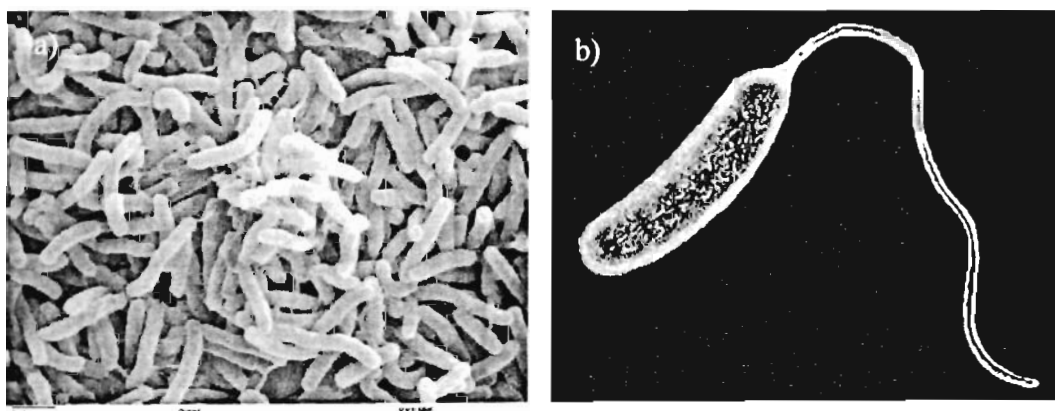
NGHIÊN CỨU HIỆU LỰC KHỬ KHUẨN CỦA DUNG DỊCH NANO BẠC ĐỐI VỚI PHẪY KHUẨN *Vibrio cholerae* GÂY BỆNH TẢ

TRẦN THỊ NGỌC DUNG, NGÔ QUỐC BỬU, NGUYỄN HOÀI CHÂU, NGUYỄN VŨ TRUNG

1. MỞ ĐẦU

Bệnh tiêu chảy cấp (bệnh tả) là một bệnh nhiễm trùng độc cấp tính của đường tiêu hóa, lan truyền chủ yếu qua nước uống và thức ăn. Bệnh tả có thể lan truyền thành dịch lớn. Trong vòng 200 năm qua đã có 7 lần dịch tả bùng phát và lây lan thành đại dịch ở một số nước và châu lục. trong thời gian vài tháng đã làm tử vong hàng chục nghìn người ở các thành phố lớn như Paris (1832), London (1854) và ở Peru (1991). Tại Việt Nam dịch tả trong các năm 1926 - 1927 đã làm chết hơn 23 nghìn người, trong thời kỳ 1937-1938 đã làm chết gần 15 nghìn người. Trong năm 2007 dịch tả đã bùng phát tại một số tỉnh ở miền Bắc, nhưng nhờ các biện pháp phòng chống được Bộ Y tế triển khai kịp thời nên dịch nhanh chóng bị dập tắt mà không gây ra tổn thất lớn về người.

Tác nhân gây bệnh tả là vi khuẩn *Vibrio cholerae*. Vi khuẩn này là loại trực khuẩn gram âm, hình hơi cong như dấu phẩy, di động được nhờ có một lông ở đầu (hình 1). Tuy vi khuẩn tả có sức đề kháng yếu (bị chết ở nhiệt độ 55°C trong 1 giờ và ở 80°C trong 5 phút) nhưng chúng sống được khá lâu trong môi trường nước hồ ao, nhất là khi nước bị nhiễm mặn (3 – 50 ngày). Do vậy khả năng truyền bệnh tả theo các dòng nước mặt rất lớn.



Hình 1. Vi khuẩn tả *Vibrio cholerae* (a) và hình ảnh con vi khuẩn với độ khuếch đại lớn (b)

Nguồn: *Vibrio cholerae*, Wikipedia

Trong trường hợp người bị nhiễm phẩy khuẩn tả, thông thường thì thời gian phát bệnh rất nhanh, khi phát bệnh làm bệnh nhân bị nôn mửa và tiêu chảy nhiều lần trong ngày. nếu không được điều trị tích cực bệnh nhân có thể chết trong vòng 24 giờ vì kiệt nước và mất các chất điện

giải. Do tính dễ lây lan và khả năng làm người bệnh nhanh tử vong, bệnh tả được coi là một trong những dịch bệnh nguy hiểm nhất, cần được kiểm soát chặt chẽ và phòng chống kịp thời. Vì vậy việc nghiên cứu sử dụng những chất diệt khuẩn mới, hiệu quả cao và an toàn nhằm ngăn chặn sự bùng phát và lan truyền của phẩy khuẩn tả là rất cần thiết.

Đã từ lâu bạc được biết đến như một nguyên tố có khả năng khử trùng mạnh nhất tồn tại trong tự nhiên. Cách đây khoảng 200 năm các nhà khoa học đã xem huyết thanh người như là một dịch keo, vì vậy keo bạc đã được sử dụng làm chất kháng khuẩn ngay trong cơ thể con người. Kể từ đó keo bạc được sử dụng rộng rãi để chữa các bệnh nấm trên da, điều trị các vết thương, vết bỏng, các bệnh răng miệng, làm thuốc nhỏ mắt. Tuy nhiên, sau khi thuốc kháng sinh được phát minh (giữa thế kỉ 20) với hiệu lực khử trùng mạnh hơn, keo bạc đã bị thay thế dần. Nhưng chỉ 30 năm sau đó người ta đã nhận ra rằng có rất nhiều loài vi khuẩn có khả năng chống lại tác dụng của thuốc kháng sinh và vấn đề này ngày càng trở nên đáng lo ngại. Lúc này tính năng kháng khuẩn của bạc lại được chú ý do có phổ tác dụng rộng và không bị hạn chế bởi hiệu ứng kháng thuốc [1, 2]. Ngày nay việc tạo ra các vật thể với kích thước nano (1 phần tỉ mét) đã trở nên phổ biến, ở kích thước này các hạt vật chất thể hiện nhiều tính chất lí - hóa khác thường so với khi vật chất đó ở trạng thái khối. Các hạt nano bạc với năng lượng bề mặt lớn có khả năng giải phóng từ từ các ion bạc vào trong dung dịch, nhờ vậy nano bạc có hiệu lực khử khuẩn mạnh hơn rất nhiều lần và kéo dài hơn so với bạc ở dạng keo, dạng ion hay dạng rắn [1, 3].

So với chế phẩm Cloramin – một chất diệt khuẩn hiện nay được ngành y tế nước ta dùng nhiều nhất – nano bạc có những ưu điểm nổi bật như lượng dùng nhỏ, tránh được hiện tượng hình thành các hợp chất clo hữu cơ độc hại (trihalometan), không có mùi khó chịu và không độc hại đối với người. Hiện nay nhiều sản phẩm nano bạc đã được các tổ chức FDA, EPA của Mỹ, SIAA của Nhật Bản chính thức cho phép sử dụng trong y tế và đời sống để khử trùng nước uống và môi trường không khí, bề mặt của các vật dụng trong sinh hoạt [4].

Trong những năm gần đây Viện Công nghệ môi trường (VCNMT) đã nghiên cứu chế tạo thành công dung dịch nano bạc có chất lượng cao với kích thước hạt trung bình nhỏ hơn 15 nm. Trước thực tế bệnh tả có nguy cơ bùng phát thành dịch lớn ở nhiều tỉnh thành trong cả nước và gây nên các hậu quả nghiêm trọng, Viện Công nghệ môi trường đã tiến hành nghiên cứu khả năng diệt khuẩn của dung dịch nano bạc tự chế tạo đối với một số chủng *Vibrio cholerae* gây bệnh được phân lập từ các bệnh phẩm tại Viện Các Bệnh truyền nhiễm và nhiệt đới Quốc gia (VCBTN&NĐQG) để có cơ sở đề xuất biện pháp mới chống dịch tả.

Bài báo này trình bày kết quả đánh giá hiệu quả khử trùng của dung dịch nano bạc do Viện CNMT chế tạo đối với một số chủng phẩy khuẩn tả được phân lập tại Viện CBTN&NĐQG và xác định nồng độ tối thiểu của nano bạc cho phép tiêu diệt trên 99,9% vi khuẩn *Vibrio cholerae*

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Đối tượng, vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Vi khuẩn *Vibrio cholerae*: 3 chủng vi khuẩn gây bệnh được phân lập từ bệnh phẩm của bệnh nhân tại Viện CBTN&NĐQG, bao gồm: *Vibrio cholerae* 3214; *Vibrio cholerae*: 3184 *Vibrio cholerae* 3252.

2.1.2. Vật liệu

Dung dịch nano bạc sử dụng trong thí nghiệm được Viện Công nghệ môi trường chế tạo bằng phương pháp dung dịch nước [5] với các nồng độ pha loãng tương ứng là 0,25; 0,5; 1,0; 5,0; 10; 15; 20; 25 mg/l.

Môi trường nuôi cấy vi khuẩn là thạch thường.

Mẫu đối chứng là mẫu không có nano bạc.

Sử dụng nước cất để pha loãng và tạo canh trường *Vibrio cholerae*.

2.1.3. Phương pháp nghiên cứu

Các chủng *Vibrio cholerae* 3214, 3184, 3252 được phân lập từ bệnh phẩm của các bệnh nhân mắc bệnh tiêu chảy cấp đang điều trị tại Viện CBTN&NĐQG. Sau khi phân lập các vi khuẩn này được nhân lên với mật độ 10^9 cfu/ml và sau đó pha loãng trong nước cất để có được dung dịch huyền phù tương đương độ đục chuẩn McFarland 0,5.

Đánh giá hiệu quả diệt khuẩn của dung dịch nano bạc đối với các chủng vi khuẩn

Sau khi có được dung dịch huyền phù vi khuẩn với độ đục tương đương độ đục chuẩn McFarland 0,5 thì tiếp tục tiến hành các bước như sau.

Bước 1: Dùng pipet lấy lần lượt 0,1 ml canh trường vi khuẩn thu được ở trên đưa vào 9 ống nghiệm có đánh số từ 1 đến 9.

Bước 2: Thêm vào ống thứ nhất (mẫu chứng) 0,9 ml nước cất. Tám ống nghiệm còn lại thêm vào mỗi ống nghiệm 0,9 ml dung dịch nano bạc có nồng độ tương ứng 0,25; 0,5; 1; 5; 10; 15; 20; 25 mg/l.

Bước 3: Lắc kỹ các ống nghiệm để vi khuẩn và nano bạc được hoà trộn kỹ với nhau rồi sau đó để yên cho quá trình diệt khuẩn xảy ra.

Bước 4: Sau 15 phút kể từ khi lắc lấy từ mỗi ống nghiệm ra 0,1 ml dung dịch đổ vào đĩa petri đã được đánh số, sau đó đổ 10 - 12 ml môi trường thạch đã chuẩn bị trước và láng đều trên bề mặt đĩa petri. Để yên cho thạch đông lại rồi đem giữ trong tủ ẩm với nhiệt độ 37°C .

Bước 5: Sau 30 phút kể từ khi lắc lặp lại quá trình nuôi cấy như bước 4.

Bước 6: Sau 60 phút lặp lại quá trình nuôi cấy như hai bước trên.

Bước 7: Sau 24 h để trong tủ ẩm, các đĩa petri được lấy ra và đếm số lượng khuẩn lạc tính ra đơn vị cfu/ml.

Để có thể đọc kết quả chính xác, đối với mẫu chứng phải nuôi cấy ở các nồng độ pha loãng đến 7 bậc (10^7), các mẫu có nano bạc được pha loãng đến 4 bậc (10^4). Thí nghiệm đối với mỗi chủng vi khuẩn được lặp lại 3 lần và kết quả xác định là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm.

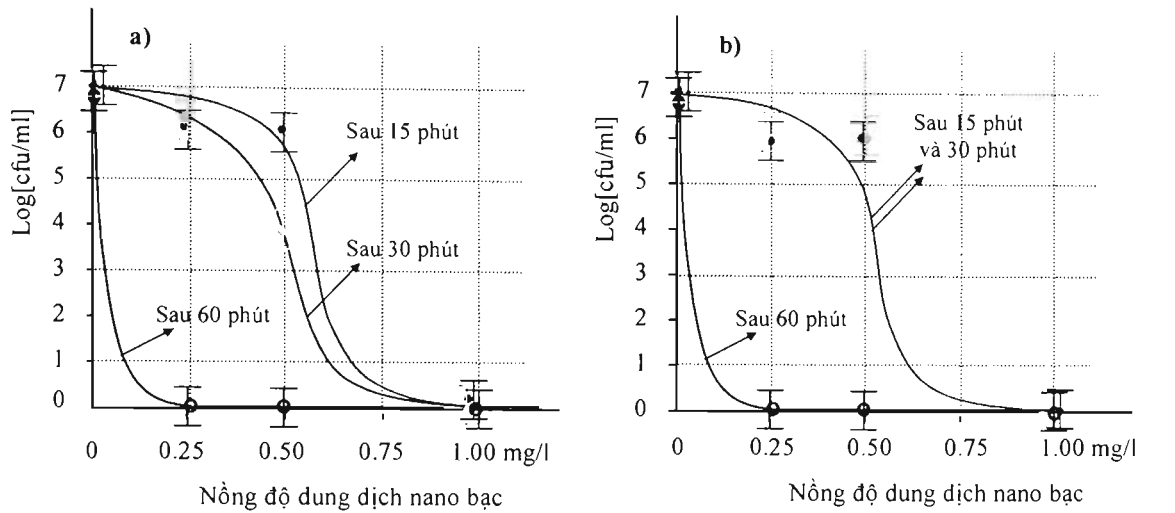
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Bảng 1 và hình 2 trình bày kết quả đánh giá khả năng diệt khuẩn của dung dịch nano bạc do Viện CNMT điều chế đối với 3 chủng phẩy khuẩn tả được phân lập từ bệnh phẩm của các bệnh nhân đang điều trị tại Viện CBTN&NĐQG. Kết quả cho thấy tất cả 3 chủng vi khuẩn *V. cholerae* 3184, 3214 và 3252 đã bị tiêu diệt sau 15 phút tiếp xúc với dung dịch nano bạc nồng độ 1 mg/l. Nhưng nếu thời gian tiếp xúc kéo dài tới 60 phút, thì chỉ cần 0,25 mg/l nano bạc là đã có thể vô hiệu hóa hoàn toàn số vi khuẩn này.

Bảng 1. Khả năng diệt khuẩn của dung dịch nano bạc do Viện Công nghệ môi trường chế tạo đối với 3 chủng vi khuẩn *V. cholerae* được phân lập tại Viện các bệnh truyền nhiễm và nhiệt đới Quốc gia

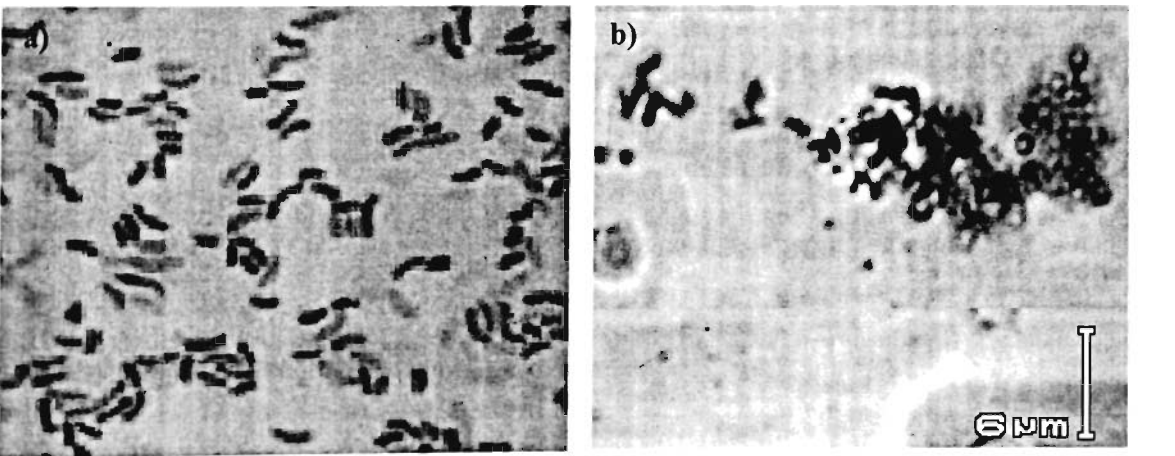
Thời gian phơi nhiễm	Nồng độ nano bạc (mg/l)	<i>V. cholerae</i> 3214		<i>V. cholerae</i> 3184		<i>V. cholerae</i> 3252	
		Mật độ (cfu/ml)	Ti lệ diệt (%)	Mật độ (cfu/ml)	Ti lệ diệt (%)	Mật độ (cfu/ml)	Ti lệ diệt (%)
1	2	3	4	5	6	7	8
15 phút	0 (chứng)	10 ⁷	0	10 ⁷	0	10 ⁷	0
	0,25	10 ⁶	90	10 ⁶	90	10 ⁶	90
	0,5	10 ⁶	90	10 ⁶	90	10 ⁶	90
	1	0	100	0	100	0	100
	5	0	100	0	100	0	100
	10	0	100	0	100	0	100
	15	0	100	0	100	0	100
	20	0	100	0	100	0	100
	25	0	100	0	100	0	100
30 phút	0 (chứng)	10 ⁷	0	10 ⁷	0	10 ⁷	0
	0,25	10 ⁶	90	10 ⁶	90	10 ⁶	90
	0,5	10 ⁵	99	10 ⁶	90	10 ⁶	90
	1	0	100	0	100	0	100
	5	0	100	0	100	0	100
	10	0	100	0	100	0	100
	15	0	100	0	100	0	100
	20	0	100	0	100	0	100
	25	0	100	0	100	0	100
60 phút	0 (chứng)	10 ⁷	0	10 ⁷	0	10 ⁷	0
	0,25	0	100	0	100	0	100
	0,5	0	100	0	100	0	100
	1	0	100	0	100	0	100
	5	0	100	0	100	0	100
	10	0	100	0	100	0	100
	15	0	100	0	100	0	100
	20	0	100	0	100	0	100
	25	0	100	0	100	0	100

Hình 2 thể hiện tác dụng khử khuẩn của dung dịch nano bạc dưới dạng đồ thị, trong đó các đường cong được xây dựng bằng phương pháp bình phương tối thiểu trên cơ sở các số liệu nhận được từ thực nghiệm.



Hình 2. Hiệu quả khử trùng của nano bạc phụ thuộc vào nồng độ và thời gian tiếp xúc đối với các chủng phẩy khuẩn tả: a) *V. cholerae* 3214; b) *V. cholerae* 3184 và 3252

Diễn biến của việc các phẩy khuẩn tả bị tiêu diệt bởi dung dịch nano bạc do Viện CNMT chế tạo đã được ghi lại trên các bức ảnh chụp qua kính hiển vi OLYMPUS BX-51 của Viện CNMT. Hình ảnh dẫn ra trên hình 3 cho thấy các phẩy khuẩn tả *V. cholerae* bị phá hủy hoàn toàn sau 15 phút tiếp xúc với dung dịch nano bạc có nồng độ 1,0 mg/l. Ảnh (a) cho thấy hình dạng các phẩy khuẩn tả trước khi bị dung dịch nano bạc tác động. Trên ảnh (b) có thể thấy trong quá trình tác dụng của các ion nano bạc lên vi khuẩn, từ hình que chúng co dần lại thành hình cầu và chết.



Hình 3. Phẩy khuẩn tả trước (a) và sau 15 phút tiếp xúc với dung dịch nano bạc nồng độ 1 mg/l (b)

Từ những số liệu thực nghiệm có thể xác định nồng độ nano bạc tối thiểu cho phép tiêu diệt trên 99,99% phẩy khuẩn tả là 0,25 mg/l với thời gian phơi nhiễm 60 phút.

Kết quả nghiên cứu thu được đã cho thấy dung dịch nano bạc là một tác nhân khử trùng hiệu quả cao, có thể sử dụng để phòng ngừa bệnh tiêu chảy cấp do các vi khuẩn tả gây ra.

Cơ chế kháng khuẩn của nano bạc là một vấn đề vẫn đang được tiếp tục quan tâm nghiên cứu, tuy nhiên cho đến nay các nhà khoa học đã đi đến một số quan điểm tương đối thống nhất về cơ chế tác dụng của nano bạc lên tế bào sống. Một trong những quan điểm đó cho là các ion bạc được giải phóng ra từ các hạt nano có ái lực mạnh đối với các nhóm chức mang điện tích âm của các phân tử sinh học trên tế bào vi sinh vật như các gốc $-SH$, $-COOH$, $-PO_4^{3-}$. Các ion Ag^+ sẽ phản ứng với các nhóm chức này và vô hiệu hóa các tổ chức chức năng quan trọng trong tế bào, làm ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp thành tế bào, ức chế các quá trình vận chuyển oxy và các chất khác qua màng tế bào, cũng như các quá trình tổng hợp và sao chép DNA và RNA [6, 7]. Vì vậy các vi sinh vật thực tế không thể có khả năng chống lại tác động của ion bạc, bởi vì trong trường hợp đó vi sinh vật buộc phải đột biến đồng thời tất cả các tổ chức chức năng quan trọng trong tế bào của chúng.

Ngoài ra, trong một số nghiên cứu gần đây cơ chế tác dụng diệt khuẩn ở mức độ phân tử của nano bạc cũng đã được làm rõ từng bước. Đó là cơ chế chemiosmotic [8, 9]. Theo cơ chế này, ở nồng độ lớn (cỡ milimol) các ion Ag^+ ức chế hoạt tính của một số men và tương tác tĩnh điện với các nhóm mang điện tích âm (sulfhydryl) làm cản trở quá trình vận chuyển oxy qua màng tế bào vi khuẩn. Nhưng khi ở nồng độ rất thấp (cỡ micromol) các ion bạc lại có khả năng gây ra quá trình rò proton ở át qua màng tế bào của *V.cholerae*, dẫn đến làm mất nguồn năng lượng của tế bào và làm vi khuẩn tử vong. Cơ chế tác dụng này dựa trên giả thiết [9] cho rằng nồng độ thấp của ion Ag^+ làm thay đổi tính chất thẩm thấu của màng tế bào vi khuẩn tả. Nói cách khác, tác dụng kháng khuẩn của các ion Ag^+ ở nồng độ thấp là dựa trên hiện tượng rò proton qua các phân tử protein trên màng tế bào *V. cholerae* đã được biến tính bởi ion Ag^+ , hậu quả là tế bào vi khuẩn bị mất năng lượng và dẫn đến tử vong. Điều đó cho thấy chỉ cần một lượng nano bạc cực nhỏ là đã có thể vô hiệu hóa tế bào vi khuẩn tả.

4. KẾT LUẬN

Dung dịch nano bạc do Viện CNMT chế tạo đã được sử dụng để nghiên cứu đánh giá khả năng diệt khuẩn của nó đối với một số chủng vi khuẩn tả được phân lập từ các bệnh phẩm của bệnh nhân mắc bệnh dịch tả. Số liệu thực nghiệm thu được chỉ ra rằng sau 15 phút tiếp xúc với dung dịch nano bạc nồng độ 1,0 mg/l tất cả 3 chủng *V. cholerae* 3184, 3214 và 3252 đã bị tiêu diệt.

Nồng độ nano bạc tối thiểu cho phép tiêu diệt trên 99,99% vi khuẩn tả đã được xác định là 0,25 mg/l với thời gian tiếp xúc 60 phút.

Kết quả thực nghiệm thu được đã chứng tỏ rằng dung dịch nano bạc là một phương tiện khử trùng rất hiệu quả trong việc phòng ngừa bệnh tiêu chảy cấp do vi khuẩn *Vibrio cholerae* gây ra.

Lời cảm ơn. Nghiên cứu này đã được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của Dự án hợp tác KH&CN theo Nghị định thư 2007 - 2009 với Liên bang Nga của Bộ Khoa học và Công nghệ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Soni, Salopek-Soni - Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E.coli* as a model for gram-negative bacteria, *J. Colloid Interface Sci.* **275** (2004) 177-182
2. Liao S. Y., D. C. Read W. J., Pugh J. R. et al. - The antibacterial action of silver ions, *Lett. Appl. Microbiol.* **25** (1997) 279 – 283.
3. Sucdeb Pal, Yu K. T., Joon M. S. - Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle, *Appl. & Env. Microbiol.* **73** (6) (2007) 1712-1720.
4. US EPA safety guidelines on silver. <http://www.silver100.com/highlights.html>. 28.12.2006N.
5. N. H. Chau, L. A. Bang, N. Q. Buu, et al. - Studies on production of nanosilver for disinfection by aqueous solution method using Vietnamese chitosan as a stabilizing agent, *J. of Science and Technology (Vietnam)* **46** (3) (2008).
6. Yin H. Q., Langford R., Burrell R. E. - Comparative evaluation of the antimicrobial activity of acticoat antibacterial barrier dressing, *J. Burn Care Rehab.* **20** (1999) 195-200.
7. Feng Q. L., Wu G. Q., Chen F. Z. et al. - A mechanistic study of the antibacterial activity of nanosilver against *E.coli* and *St. aureus*, *J. Biomed. Mater. Res.* **52** (2000) 662-670.
8. Dibrov P., Dzioba J., Gosink K. K., and Hase C. C. - Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag^+ in *Vibrio cholerae*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Aug. (2002) 2668-2670.
9. Dibrov P. - The sodium cycle in *Vibrio cholerae*: Riddles in the dark, *Biochemistry (in Russian)* **70** (2) (2005) 150-153.

SUMMARY

STUDIES ON BACTERICIDAL ACTIVITY OF NANOSILVER SOLUTION AGAINST PATHOGENOUS *Vibrio cholerae*

Nanosilver solution produced in Institute of Environmental Technology has been used for studying its antimicrobial activity against some strains of *Vibrio cholerae* isolated from medical waste of choleraic patients. The experimental data showed that all the three studied *V. cholerae* strains were killed after 15 min contact with nanosilver solution of concentration of 1.0 mg/l.

The MIC (minimum inactivation concentration) of nanosilver has been set up as 0.25 mg/l with a contact time of 60 min allowing to kill 99.99% of choleraic bacteria.

The obtained results proved that nanosilver solution produced in Institute of Environmental Technology - VAST can be used as a powerful disinfectant for prevention of choleraic disease.

Địa chỉ: Nhận bài ngày 10 tháng 8 năm 2008

Trần Thị Ngọc Dung, Ngô Quốc Bưu, Nguyễn Hoài Châu,

Viện Công nghệ môi trường, Viện KHCN Việt Nam.

Nguyễn Vũ Trung,

Viện Các Bệnh truyền nhiễm và Nhiệt đới Quốc gia.