

# TỔNG HỢP VẬT LIỆU COMPOSITE GIỮA CELLULOSE VI KHUẨN VÀ NANO BẠC BẰNG PHƯƠNG PHÁP *IN SITU* VÀ KHẢO SÁT KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN CỦA VẬT LIỆU

NGUYỄN THỊ KIM ANH, LÂM HOÀNG ANH THU, PHẠM THỊ VÂN, ĐỖ HUYỀN KHÁNH NGÂN  
Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh  
nguyenthikimanh@iuh.edu.vn

**Tóm tắt.** Vật liệu kết hợp giữa cellulose vi khuẩn và nano bạc (AgNPs) được nghiên cứu tổng hợp bằng phương pháp *in situ* với mục đích tạo vật liệu có khả năng kháng khuẩn. Chất khử Natri Borohydrua ( $\text{NaBH}_4$ ) và Ethylene Glycol (EG) được sử dụng để khử trực tiếp ion  $\text{Ag}^+$  thành hạt nano bạc gắn trên nền sợi cellulose tạo composite. Sau đó khả năng kháng khuẩn của composite được khảo sát trên 4 vi khuẩn đại diện cho Gram âm là *E. coli*, *P. aeruginosa* và Gram dương là *S. aureus* và *S. epidermidis*. Kết quả cho thấy cả vật liệu được tổng hợp bằng chất khử  $\text{NaBH}_4$  và EG đều có khả năng kháng cả 4 chủng vi khuẩn. Vật liệu composite giữ cellulose vi khuẩn (BC) và nano bạc (BC/AgNPs) khả năng có thể ứng dụng trong việc hỗ trợ điều trị các vết thương tránh nhiễm khuẩn.

**Từ khóa.** Composite, cellulose vi khuẩn, hiệu suất diệt khuẩn, *in situ*, nano bạc.

## SYNTHESIS OF BACTERIAL CELLULOSE AND SILVER NANOPARTICLES COMPOSITE AND INVESTIGATE ITS ANTIBACTERIAL ACTIVITY

**Abstracts.** Composite of bacterial cellulose and silver nanoparticles (BC/AgNPs) that synthesized by *in situ* method is aimed to produce an antibacterial material. Reducing agents Natri Borohydrua ( $\text{NaBH}_4$ ) and Ethylene Glycol (EG) were used to synthesis composite by directly reducing ion  $\text{Ag}^+$  to silver nanoparticles that integrated to cellulose fibers. The composites were then investigated for their bactericidal performance to two Gram negative bacteria (*E. coli* and *P. aeruginosa*) and two Gram positive bacteria (*S. aureus* and *S. epidermidis*). The results of this study demonstrated that both composites synthesized by  $\text{NaBH}_4$  and EG could eliminate all 4 bacteria strains. The composite BC/AgNPs has potential application for wound treatment and prevention from bacterial infection.

**Keywords.** Composite, bacterial cellulose, bactericidal performance, *in situ*, silver nanoparticles.

### 1 GIỚI THIỆU

Composite hay còn gọi là vật liệu tổng hợp, được tạo ra bằng cách kết hợp hai hoặc nhiều vật liệu có các tính chất khác nhau, nhằm mục đích tăng thuộc tính của vật liệu được tổng hợp. Cellulose được tạo ra bởi quá trình lên men của vi khuẩn Gram âm *Acetobacter xylinum*, có thể tạo ra các sợi nano tỷ lệ khung hình cao, với mạng lưới xếp ba chiều (3D) [1]. Cellulose vi khuẩn (bacterial cellulose – BC) có tính tương thích sinh học, không gây dị ứng, không độc hại và có thể sản xuất ở các kích cỡ và hình dạng khác nhau [2]. Do cấu trúc mạng sợi nano 3D độc đáo của nó, BC cho thấy các tính chất cơ học tuyệt vời và khả năng tạo khuôn, đặc biệt ở dạng ướt, khiến nó phù hợp để được sản xuất theo hình dạng mong muốn. Hệ thống sợi của màng BC được hình thành từ các sợi nano sắp xếp chặt chẽ trong không gian ba chiều, tạo thành các tấm hydrogel có bề mặt và độ xốp cao. Do tính chất ưa nước của nó (99% thành phần là nước), tính linh hoạt, không độc hại, tính tương thích sinh học tốt và tính sẵn có rộng rãi, nó đã được sử dụng rộng rãi trong các lĩnh vực khác nhau từ ngành công nghiệp thực phẩm và giấy [3], [4] đến các ứng dụng y sinh, như liệu pháp da, vận chuyển thuốc, thuốc tái tạo, mạch máu nhân tạo và các sản phẩm chăm sóc vết thương. Cellulose được tổng hợp có bề mặt chứa rất nhiều nhóm hydroxyl nên có đặc tính giữ nước, phân rã sinh học và khả năng biến đổi hóa học. Cellulose vi khuẩn giống như một ma trận nano tự nhiên, được sử dụng làm khuôn mẫu để tổng hợp tại chỗ các hạt nano bạc (AgNPs) bằng cách khử hóa học [5].

Nano bạc có đặc tính kháng khuẩn do có khả năng bám vào thành tế bào vi khuẩn và xâm nhập vào bên trong vi khuẩn. Việc bám lên thành tế bào của nano bạc sẽ gây ra những thay đổi vật lý trong màng vi khuẩn, như tổn thương màng, làm thủng màng dẫn đến chết vi khuẩn [6]. Nano bạc có đặc tính kháng khuẩn

và ngăn ngừa vi khuẩn phát sinh tới 99,99 %, lợi ích hơn gấp nhiều lần so với các sản phẩm kháng khuẩn khác [7]. Nano bạc sẽ kết hợp với màng tế bào của vi khuẩn gây bệnh, sau đó sẽ trực tiếp đi vào bên trong vi khuẩn và nhanh chóng kết hợp với sulphhydryl (-SH) của enzyme chuyển hóa oxi để diệt chúng, để chặn đường hô hấp và quá trình trao đổi chất của vi khuẩn. Ngoài ra, màng tế bào của vi khuẩn có điện tích âm do sự hiện diện của các nhóm carboxyl, phosphate và amino [8]. Điện tích dương tạo ra lực hút tĩnh điện giữa nano bạc và màng tế bào tích điện âm của vi sinh vật, do đó tạo điều kiện gắn nano bạc vào màng tế bào [9].

Composite kết hợp giữa BC và nano bạc (BC/AgNPs) có thể được tạo ra bằng các phương pháp khác nhau. Phương pháp vật lý hay còn gọi là phương pháp *ex situ* là phương pháp sử dụng vật liệu cellulose được ngâm với nano bạc. Trong đó, nano bạc được chế tạo bằng nhiều phương pháp khác nhau (khử hóa học, quang hóa, điện hóa học [10],[11]). Đây là phương pháp không có phản ứng hóa học diễn ra giữa vật liệu cellulose và nano bạc. Đối với phương pháp này, cellulose đóng vai trò là chất mang. Phương pháp vật lý tạo ra composite mà không cần sử dụng chất khử độc hại không mong muốn, thân thiện với môi trường, phù hợp với nhu cầu sản xuất công nghiệp. Tuy nhiên, do liên kết hấp phụ tương đối yếu, các nano bạc hấp phụ trên bề mặt vật liệu cellulose có thể bị mất một phần trong quá trình sử dụng. Nói cách khác, các sản phẩm được điều chế bằng phương pháp này có độ bền kém [12]. Phương pháp khử hóa học hay còn được biết tới là phương pháp *in situ*. Đây là phương pháp mà các hạt nano bạc được tổng hợp trực tiếp trên BC bằng phương pháp khử hóa học. Phương pháp này sử dụng muối kim loại hòa tan làm tiền chất, chất khử và chất đồng ổn định để tránh sự kết tụ. Tuy nhiên, phương pháp *in situ* có thể được sử dụng mà không cần thêm chất khử bên ngoài, bởi vì sự hấp phụ của các ion kim loại trên bề mặt cellulose, sau đó khử thành nano bạc bởi các hợp chất hữu cơ như aldehyd hoặc nhóm carboxylic. Cấu trúc độc đáo và sự hiện diện của sợi cellulose ether và hydroxyl nhóm tạo thành một nanoreactor hiệu quả để tổng hợp nano bạc. Các nhóm ether và hydroxyl không chỉ có chức năng neo chặt các ion kim loại vào sợi thông qua các tương tác lưỡng cực ion, mà còn khử muối bạc thông qua tương tác tĩnh điện trên bề mặt [13], [14]. Chuỗi polymer đóng vai trò quan trọng dẫn đến phân bố kích thước hẹp và hình dạng được xác định rõ cho các cấu trúc nano kim loại.

Khả năng kháng khuẩn của composite BC/AgNPs được hình thành từ mối liên kết của các AgNPs trên nền BC đã được báo cáo để tạo ra vật liệu tổng hợp từ tính và kháng khuẩn. Các ion bạc tương tác với nhóm thiol của protein trên thành tế bào, phá vỡ hô hấp của vi khuẩn và ngăn cản quá trình vận chuyển các chất qua màng tế bào [7].

Composite BC/AgNPs được chế tạo bằng phương pháp *in situ* với chất khử triethanolamine (TEA) cho thấy khả năng ức chế mạnh mẽ vi khuẩn *E. coli*, *S. aureus* và *P. aeruginosa* [15]. Nghiên cứu khác với mục tiêu tránh sử dụng chất khử độc hại mà thay bằng D-gluconic acid cho thấy composite nano bạc kết hợp cellulose có khả năng ức chế *S. aureus* và *E. coli* [16]. Nghiên cứu này sử dụng chất khử natri borohydrua ( $\text{NaBH}_4$ ) và ethylene glycol để tổng hợp nano bạc *in situ* tạo composite và khảo sát khả năng kháng khuẩn của vật liệu tạo thành từ việc sử dụng 2 chất khử này.  $\text{NaBH}_4$  là một chất có tính khử mạnh thường được sử dụng. Trong khi EG là chất khử yếu hơn nhưng lại ít độc tính, thân thiện với môi trường hơn so với  $\text{NaBH}_4$ .

## 2 VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vi khuẩn

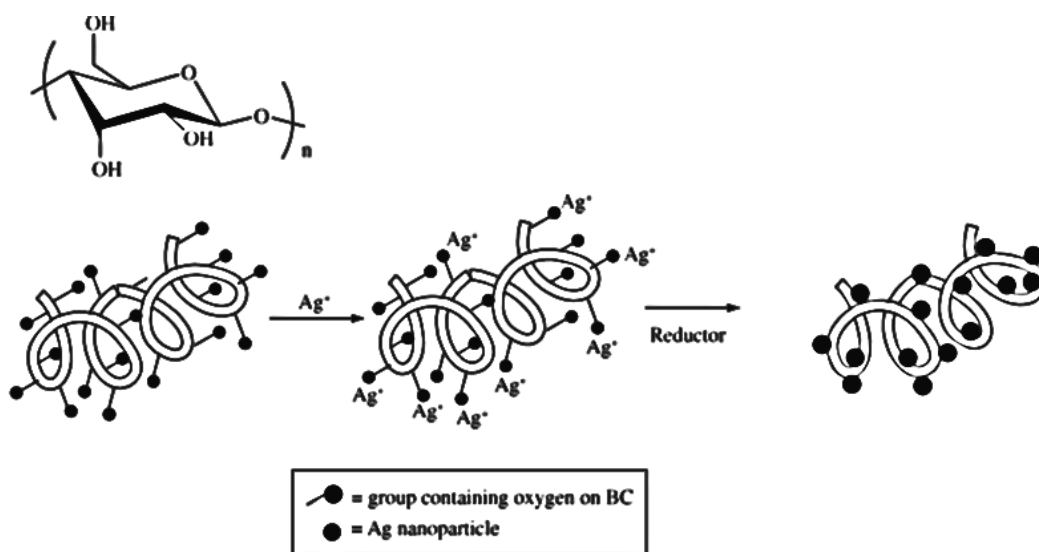
Các chủng vi khuẩn được sử dụng trong nghiên cứu này gồm 2 chủng Gram âm là *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Escherichia coli* ATCC 25922 và 2 chủng Gram dương là *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

### 2.2. Cellulose vi khuẩn

Cellulose vi khuẩn (BC) do chủng vi khuẩn *Acetobacter xylinum* tổng hợp được cung cấp từ Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học thuộc Trung tâm Nghiên cứu triển khai, Khu Công nghệ cao Thành phố Hồ Chí Minh.

### 2.3. Tổng hợp nano bạc (AgNPs) gắn với BC bằng phương pháp *in situ*

Phương pháp *in situ* chế tạo composite BC/AgNPs gồm 2 giai đoạn: (1) Giai đoạn 1: Vật liệu cellulose được ngâm trong dung dịch muối bạc để hấp thụ ion  $\text{Ag}^+$  và sau đó các ion  $\text{Ag}^+$  không gắn kết được với sợi cellulose sẽ được rửa trôi bởi nước khử ion. (2). Giai đoạn 2: Vật liệu Cellulose đã ngâm ion  $\text{Ag}^+$  được cho vào dung dịch chất khử để khử  $\text{Ag}^+$  thành Ag.



Hình 1. Quá trình khử muối bạc tạo thành composite trên nền cellulose [17]

### 2.3.1. Chế tạo composite sử dụng chất khử EG/t<sup>o</sup>

Màng BC có kích thước 1x1cm ngâm trong dung dịch AgNO<sub>3</sub> trong 24 giờ, sau đó thả BC vào cốc có chứa EG và chất bảo vệ polyvinyl pyrrolidone (PVP), gia nhiệt từ 150°C đến 200°C, khuấy từ 500-700vòng/phút trong 40 phút, sau đó tiến hành làm lạnh nhanh trong 20 phút. Vớt màng bảo quản lạnh từ 2°C đến 4°C.

### 2.3.2. Chế tạo composite sử dụng chất khử NaBH<sub>4</sub>

Màng BC có kích thước 1x1cm ngâm trong dung dịch AgNO<sub>3</sub> trong 24 giờ, sau đó thả BC vào cốc có chứa dung dịch NaBH<sub>4</sub> (7 mL NaBH<sub>4</sub> 1% + 100ml H<sub>2</sub>O) đã được làm lạnh. Tiến hành khuấy từ 500-700v/p trong 60 phút. Vớt màng và bảo quản lạnh ở nhiệt độ từ 2°C đến 4°C.

### 2.4. Kiểm tra đặc tính của composite BC/AgNPs

Tiến hành đông khô chân không mẫu màng BC và mẫu màng BC/AgNPs ở nhiệt độ -50°C, sau khi đã khô trải mẫu trên thanh nẹp mẫu chụp SEM (F4800, Hitachi, Japan) và tiến hành quan sát cấu trúc, hình dạng, sự phân bố của hạt nano bạc cùng như các sợi cellulose.

#### 2.4.1. Khảo sát khả năng kháng khuẩn của composite BC/AgNPs bằng phương pháp đặt màng trên đĩa thạch

Vi khuẩn tăng sinh trong môi trường lỏng thích hợp (*P. aeruginosa*, *S. aureus* sử dụng môi trường LB; *C. diphtheria* sử dụng môi trường BHI broth) cho đến khi đạt đến mật độ 10<sup>5</sup> CFU/ml nuôi cấy. Hút 100ul cấy trải trên môi trường thạch dinh dưỡng thích hợp. Dùng kẹp gấp các màng BC/AgNPs và đặt màng lên bề mặt môi trường, mẫu đối chứng âm là màng BC. Ủ 37°C trong thời gian thích hợp. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn bằng cách đo bán kính vòng kháng khuẩn.

#### 2.4.2. Khảo sát khả năng kháng khuẩn của composite BC/AgNPs sử dụng phương pháp đếm khuẩn lạc

Cho các composite BC/AgNPs tiếp xúc trực tiếp với vi khuẩn ở mật độ 10<sup>5</sup> CFU/ml. Sau các mốc thời gian khảo sát, hút 100μl dịch khuẩn đem cấy trải trên môi trường thạch dinh dưỡng thích hợp, ủ các đĩa ở 37°C trong thời gian thích hợp từ 24-48 giờ cho từng chủng vi khuẩn. Với đối chứng âm là màng BC. Đánh giá hiệu suất diệt khuẩn của composite bằng cách đếm số khuẩn lạc trên đĩa.

Phương pháp đếm khuẩn lạc nhằm xác định số lượng khuẩn lạc còn lại ở các mốc thời gian sau khi cho vi khuẩn tiếp xúc trực tiếp với composite BC/AgNPs. Từ đó tính được hiệu suất diệt khuẩn của composite BC/AgNPs đối với vi khuẩn dựa trên mật độ khuẩn ở từng mốc thời gian (CFU/ml).

Công thức tính mật độ khuẩn (1):

$$N \text{ (CFU/ml)} = \frac{A}{v \cdot Df} \quad (1)$$

Trong đó: N là mật độ khuẩn mẫu đem phân tích (CFU/ml); A là số khuẩn lạc trên mỗi đĩa petri ở độ pha loãng nhất định; V là thể tích mẫu cấy trên mỗi đĩa petri (ml); Df là độ pha loãng mẫu [18]

Công thức tính hiệu suất diệt khuẩn (2) như sau:

$$H_n(\%) = \frac{N - N_n}{N} * 100\% \quad (2)$$

Trong đó:  $H_n$  là hiệu suất diệt khuẩn theo thời gian  $n$  (%);  $N$  là mật độ khuẩn của mẫu đối chứng (CFU/ml);  $N_n$  là mật độ khuẩn theo mốc thời gian  $n$  (CFU/ml) [19].

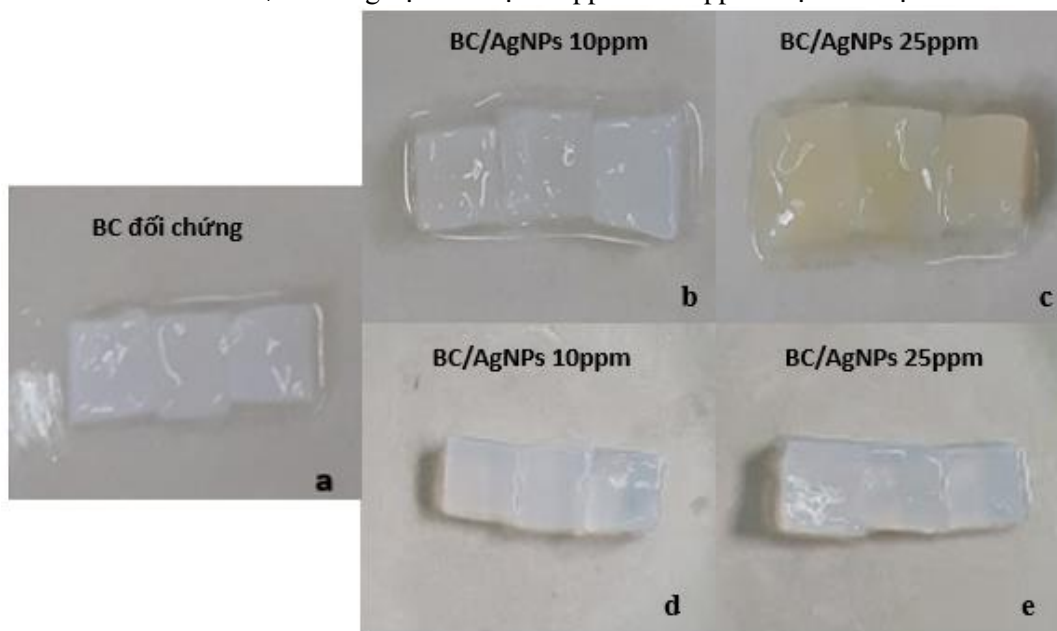
### 2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả được phân tích bằng phần mềm Statgraphics. Số liệu bán kính vòng kháng khuẩn được tính trung bình của 3 lần lặp lại. ANOVA được sử dụng để so sánh sự khác biệt giữa các nhóm.

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Chế tạo nano bạc gắn trên màng BC bằng phương pháp khử *in situ*

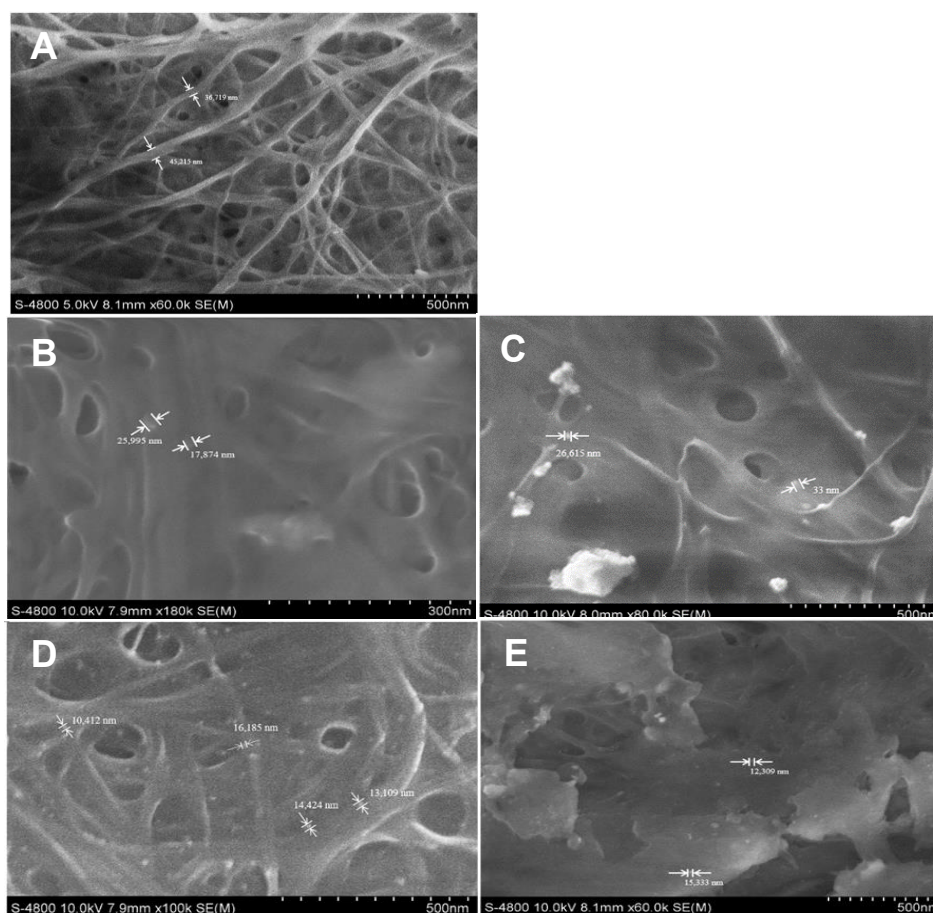
Composite giữa cellulose vi khuẩn và nano bạc (BC/AgNPs) được tổng hợp bằng phương pháp *in situ* với hai chất khử EG và  $\text{NaBH}_4$  ở 2 nồng độ nano bạc 10 ppm và 25 ppm được thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Vật liệu BC được gắn nano bạc bằng phương pháp tổng hợp trực tiếp *in situ*. a) BC đối chứng, b,c) Composite BC/AgNPs sử dụng chất khử  $\text{NaBH}_4$ , d,e) Composite BC/AgNPs sử dụng chất khử EG, t<sup>o</sup>

Màu sắc của BC/AgNPs 10ppm, 25ppm sử dụng chất khử EG và BC/AgNPs 10ppm sử dụng chất khử  $\text{NaBH}_4$  có màu trắng đục giống với màu BC đối chứng ban đầu. Tuy nhiên BC/AgNPs 25ppm sử dụng chất khử  $\text{NaBH}_4$  có màu vàng nhạt.

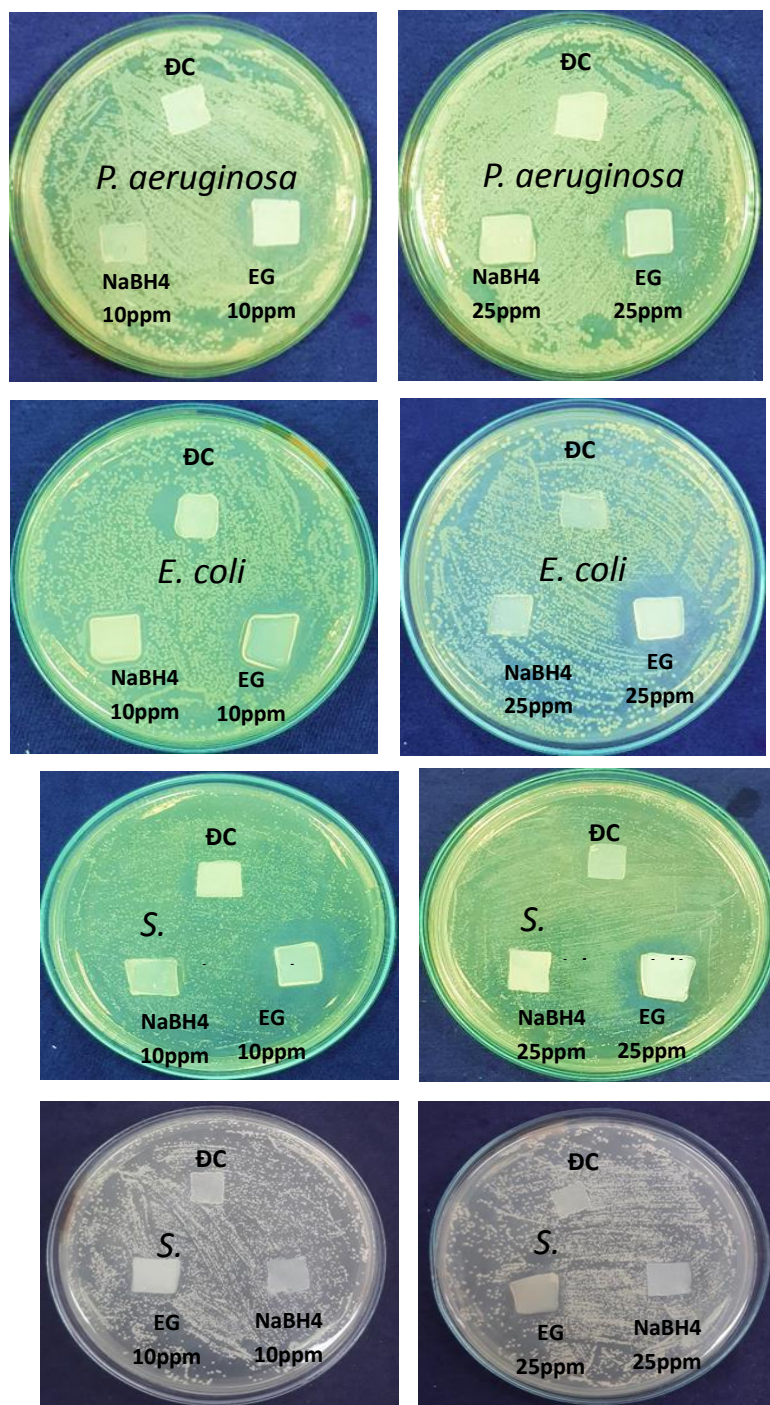
Composite BC/AgNPs sau khi chế tạo được kiểm tra hình thái bằng kính hiển vi điện tử quét (Scanning Electron Microscope, SEM) (Hình 3). Hình thái bề mặt của màng BC đặc trưng bởi một mạng lưới dày đặc, gồm các sợi cellulose nằm liền kề, đan xen và chồng lên nhau. Hình 3b và 3c thể hiện hình thái bề mặt của BC/AgNPs 10 ppm và 25 ppm sử dụng chất khử EG, các hạt nano bạc hình cầu có kích thước (từ 40 đến 69 nm) ổn định, đồng đều, và phân bố đều và bám chắc vào màng BC. Hình 3d và 3e thể hiện hình thái bề mặt của BC/AgNPs 10 ppm và 25 ppm sử dụng chất khử  $\text{NaBH}_4$ , các hạt nano bạc hình cầu có kích thước (từ 19 đến 25 nm) ổn định và đồng đều. Ở composite BC/AgNPs sử dụng chất khử  $\text{NaBH}_4$  cho kích thước các hạt nano bạc nhỏ hơn so với BC/AgNPs sử dụng chất khử EG vì Các  $\text{Ag}^+$  liên kết với nhóm -OH trong cấu trúc mạng lưới BC,  $\text{NaBH}_4$  là một chất khử mạnh, khử  $\text{Ag}^+$  thành  $\text{Ag}^0$ , tốc độ tạo thành các hạt bạc nhanh và tạo ra một số lượng lớn các hạt bạc khi đó do giàu mật độ điện tích tự do nên các  $\text{Ag}^0$  liên kết chặt chẽ với cấu trúc BC và được bảo vệ không trong gian cấu trúc 3 chiều của các sợi BC từ đó làm giảm sự kết tụ các nano bạc. Các hạt nano bạc phân bố đều và bám chắc vào màng BC thể hiện mạnh ái lực giữa nano bạc và BC, màng BC cho phép các phân tử khuếch tán vào, hình thành các sợi nano BC có cấu trúc liên kết bền chặt [20].



Hình 3. Kết quả mẫu chụp SEM a) BC; b, c) Composite BC/AgNPs 10 ppm, 25 ppm sử dụng chất khử EG; d, e) Composite BC/AgNPs 10 ppm, 25ppm sử dụng chất khử NaBH<sub>4</sub>.

### 3.2. Khả năng kháng khuẩn của màng BC/AgNPs trên đĩa thạch

Đặt composite BC/AgNPs sử dụng chất khử NaBH<sub>4</sub> trên đĩa thạch đã cấy trải vi khuẩn không thấy xuất hiện vòng ức chế vi khuẩn đối với cả 4 vi khuẩn. Trong khi đó, composite BC/AgNPs sử dụng chất khử EG có khả năng ức chế vi khuẩn và tạo vòng kháng khuẩn đối với 4 vi khuẩn. Bán kính vòng ức chế vi khuẩn của các composite có sự khác biệt đối với từng loài vi khuẩn ( $p < 0,05$ ). Bán kính vòng kháng khuẩn lớn nhất là đối với *P. aeruginosa*, tiếp đến là *E. coli*, *S. epidermidis* và cuối cùng là *S. aureus*. Thí nghiệm của Tiana và cs (2017) [21], Indrianingsih và cs (2017) [22] cho thấy composite cho vòng kháng khuẩn đối với *P. aeruginosa* lớn hơn vòng kháng *E. coli*. Trong 2 nghiên cứu trên còn có kết quả tạo vòng ức chế *S. aureus* nhỏ hơn *E. coli*, tương tự như kết quả của nghiên cứu này.



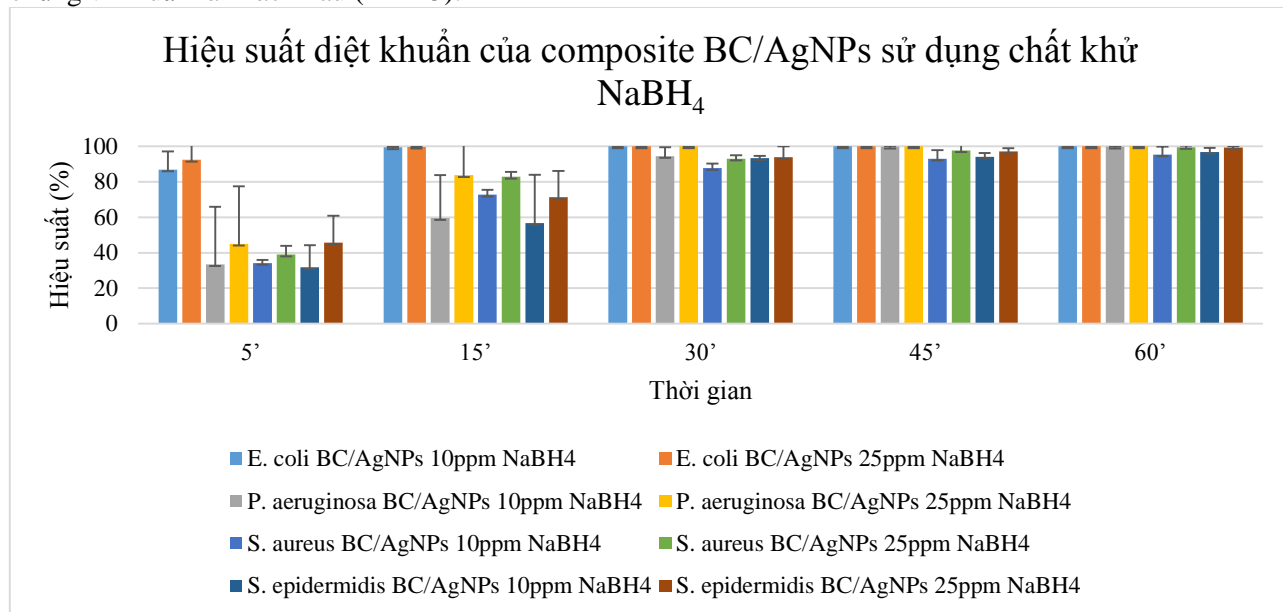
Hình 4. Khảo sát khả năng kháng khuẩn của composite BC/AgNPs đối với 4 chủng vi khuẩn *P.aeruginosa*, *E.coli*, *S.epidermidis*, *S.aureus*.

Composite BC/AgNPs sử dụng chất khử EG tạo vòng kháng khuẩn đối với 4 chủng vi khuẩn như sau: Bán kính vòng kháng khuẩn của composite BC/AgNPs 10 ppm sử dụng chất khử EG đối với *P. aeruginosa* là  $0,27 \pm 0,06$  cm, *E. coli* là  $0,25 \pm 0,09$  cm, *S. epidermidis* và *S. aureus* là  $0,17 \pm 0,06$  cm. Bán kính vòng kháng khuẩn của composite BC/AgNPs 25 ppm sử dụng chất khử EG đối với *P. aeruginosa* là  $0,62 \pm 0,07$  cm, *E. coli* là  $0,43 \pm 0,12$  cm, *S. epidermidis* là  $0,4 \pm 0,09$  cm và *S. aureus* là  $0,37 \pm 0,06$  cm. Vòng kháng khuẩn đối với vi khuẩn *P. aeruginosa* có bán kính lớn hơn so với vòng kháng khuẩn của vi khuẩn *E. coli* ( $p < 0,05$ ) và lớn hơn hẳn vòng kháng khuẩn của vi khuẩn *S. epidermidis* và *S. aureus* ( $p < 0,05$ ).

### 3.3. Kiểm tra khả năng diệt khuẩn của BC/AgNPs tiếp xúc trực tiếp với dịch khuẩn

#### 3.3.1. Hiệu suất diệt khuẩn của BC/AgNPs khử bằng NaBH<sub>4</sub>

Vật liệu BC có nano bạc được tổng hợp trực tiếp từ muối bạc khi sử dụng chất khử NaBH<sub>4</sub> cho thấy khả năng diệt khuẩn đối với cả 4 loại vi khuẩn khảo sát. Tuy nhiên, thời gian đạt hiệu suất diệt khuẩn ở từng chủng vi khuẩn là khác nhau (Hình 5).



Hình 5. Hiệu suất diệt khuẩn của composite BC/AgNPs sử dụng chất khử NaBH<sub>4</sub> với *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus* và *S.epidermidis*.

Vi khuẩn *E. coli* khi tiếp xúc với composite chỉ 5 phút đã bị tiêu diệt tới 87% và 92% tương ứng với 2 nồng độ AgNPs là 10ppm và 25ppm. Cùng độ dài thời gian tiếp xúc sau 5 phút, 3 vi khuẩn gồm *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* và *S. aureus* bị diệt với hiệu suất thấp, dao động khoảng 31-45%. Hiệu suất diệt khuẩn của BC/AgNPs đạt 100% đối với *E. coli* sau 15 phút tiếp xúc và kéo dài tới 30 phút đối với *P. aeruginosa* khi sử dụng NaBH<sub>4</sub> ở nồng độ 25ppm. Hai vi khuẩn Gram (+) *S. epidermidis* và *S.aureus* chỉ bị diệt 100% sau thời gian tiếp xúc 60 phút với vật liệu BC/AgNPs được tổng hợp với chất khử NaBH<sub>4</sub> ở nồng độ 25ppm. *E. coli* là một vi khuẩn Gram âm nên có màng ngoài cấu tạo từ lipopolysaccharide, phân tử này của *E. coli* gồm 3 vùng riêng biệt về cấu trúc: lipid A (hydrophobic), một oligosaccharit lõi, kháng nguyên O (O polysaccharide) [23]. Khi AgNPs của composite tiếp xúc với *E. coli* thì kháng nguyên O là nơi đầu tiên tiếp xúc với AgNPs, vì hàng rào bảo vệ mỏng nên *E. coli* sớm bị diệt. Hiệu suất diệt khuẩn đối với *E. coli* của composite BC/AgNPs 25 ppm cao hơn composite BC/AgNPs 10 ppm ở mốc thời gian 5 phút ( $p < 0,05$ ) và diệt khuẩn hoàn toàn ở các mốc thời gian sau. Hiệu suất diệt khuẩn *E. coli* của composite BC/AgNPs 10 ppm và 25 ppm sử dụng chất khử NaBH<sub>4</sub> ở các mốc thời gian khảo sát có sự khác nhau và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

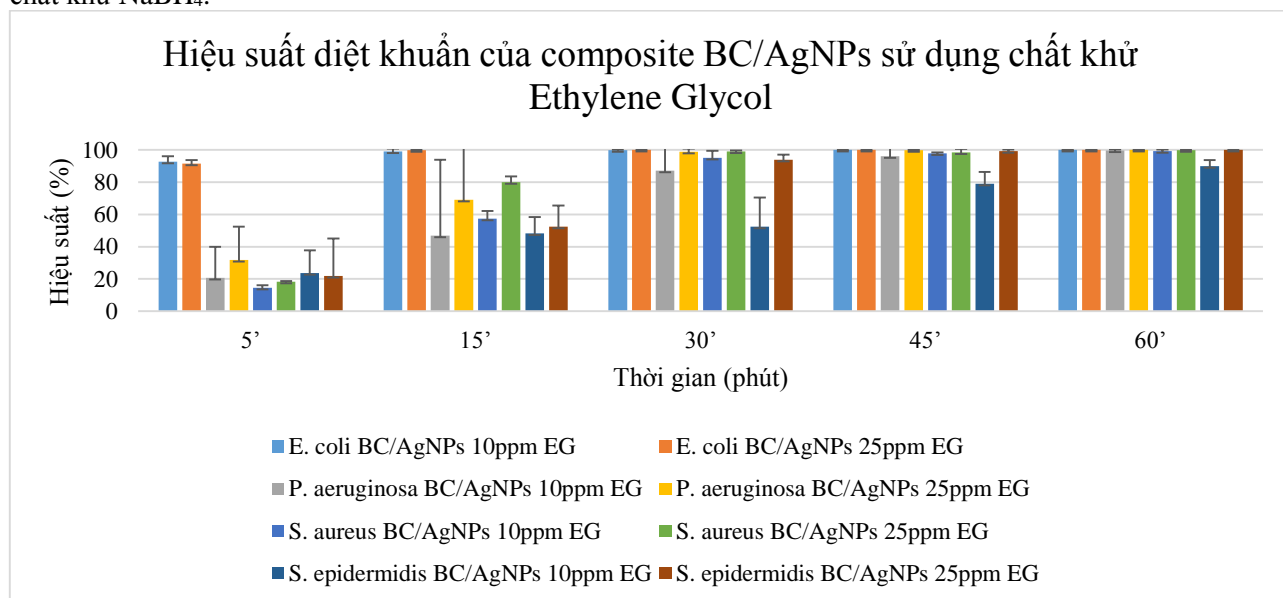
Theo nghiên cứu của Tatiana và cs (2017) [21], composite BC/AgNPs được chế tạo bằng phương pháp khử sử dụng NaBH<sub>4</sub> đã cho được hiệu quả kháng khuẩn và diệt khuẩn tốt. Nồng độ AgNPs trong composite BC/AgNPs thấp nhất là 0,0001M. Sau 24 giờ tiếp xúc trực tiếp với dịch khuẩn thì cho hiệu suất diệt khuẩn 99,8-100%. So với thí nghiệm của Tatiana và cs thì ở thí nghiệm này, composite BC/AgNPs đã cho thấy được khả năng diệt khuẩn hiệu quả ở nồng độ thấp trong vòng thời gian 30 phút đối với mật độ khuẩn 10<sup>5</sup> CFU/ml. Từ đó có thể thấy được khả năng diệt khuẩn tốt của composite BC/AgNPs sử dụng chất khử NaBH<sub>4</sub> đối với vi khuẩn *E. coli*, composite có thể diệt khuẩn ngay cả khi với nồng độ AgNPs thấp. Thời gian diệt khuẩn hiệu quả đối với *P. aeruginosa* của composite BC/AgNPs 25 ppm sớm hơn composite BC/AgNPs 10 ppm ( $p < 0,05$ ).

Khả năng diệt khuẩn *S. aureus* đối với composite BC/AgNPs sử dụng chất khử NaBH<sub>4</sub> khi tăng nồng độ Ag<sup>+</sup> từ 10 ppm lên 25 ppm thì có sự khác biệt ( $p < 0,05$ ) ở mốc thời gian diệt khuẩn 15 khi tăng nồng độ thì hiệu suất diệt khuẩn cũng tăng. Từ 30 phút đến 120 phút không có sự khác biệt nhiều giữa nồng độ 10ppm

và 25ppm. Hiệu suất diệt khuẩn của composite BC/AgNPs 10 ppm và 25 ppm sử dụng chất khử NaBH<sub>4</sub> ở các mốc thời gian khảo sát có sự khác nhau, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Hiệu suất diệt khuẩn đối với vi khuẩn *S. epidermidis* của composite BC/AgNPs 25 ppm cao hơn composite BC/AgNPs 10 ppm ở mốc thời gian 5 phút, 15 phút ( $p < 0,05$ ) và diệt khuẩn hiệu quả từ sau 30 phút đối với cả 2 nồng độ composite BC/AgNPs ở các mốc thời gian sau. Theo nghiên cứu của Kalishwaralal và cs (2010) thì AgNPs được chế tạo từ AgNO<sub>3</sub> sử dụng chất khử NaBH<sub>4</sub> có khả năng ức chế vi khuẩn *S. epidermidis* ở nồng độ dưới 50 mg/ml. Ở nồng độ 100  $\mu$ M, vi khuẩn *S. epidermidis* bị ức chế 95 % khả năng tạo màng sinh học đồng thời diệt vi khuẩn đến 90 % sau 1 ngày tiếp xúc [24].

### 3.3.2. Hiệu suất diệt khuẩn của BC/AgNPs khử bằng EG

Tương tự với vật liệu được tổng hợp nano bạc trên nền sợi cellulose bằng chất khử NaBH<sub>4</sub> ở trên, vật liệu sử dụng chất khử Ethylene Glycol tổng hợp nano bạc gắn với BC cũng cho khả năng diệt khuẩn với cả 4 chủng khảo sát. Vi khuẩn *E. coli* bị diệt với hiệu suất đạt hơn 90% sau khi tiếp xúc với composite chỉ 5 phút và bị diệt hoàn toàn sau 15 phút tiếp xúc. Khác với composite được khử bằng NaBH<sub>4</sub>, khi tiếp xúc với vật liệu được khử bằng EG vi khuẩn *P. aeruginosa* sau khi tiếp xúc 15 phút chỉ bị diệt với hiệu suất thấp và chỉ đạt hiệu suất 99% sau khi tiếp xúc với vật liệu 45 phút. Hai vi khuẩn G(+) *S. aureus* và *S. epidermidis* bị tiêu diệt hoàn toàn với thời gian tiếp xúc 45 phút. Như vậy vật liệu tạo nano bạc trên BC khi sử dụng chất khử EG cho hiệu quả diệt khuẩn G(+) với thời gian tiếp xúc ngắn hơn so với vật liệu được tổng hợp bằng chất khử NaBH<sub>4</sub>.



Hình 6. Hiệu suất diệt khuẩn của composite BC/AgNPs sử dụng chất khử EG với *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* và *S. epidermidis*.

Hiệu suất diệt khuẩn của composite BC/AgNPs 10 ppm và 25 ppm sử dụng chất khử EG ở các mốc thời gian khảo sát có sự khác nhau và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Hiệu suất diệt khuẩn đối với vi khuẩn *E. coli* của composite BC/AgNPs 25 ppm và composite BC/AgNPs 10 ppm gần như bằng nhau ở các mốc thời gian ( $p < 0,05$ ) (Hình 6).

Lee và cs (2017) [25] đã nghiên cứu cơ chế tác dụng kháng khuẩn trên *E. coli*. Một cơ chế mới cho tác dụng kháng khuẩn của các hạt nano bạc, cụ thể là gây ra phản ứng giống như apoptosis của vi khuẩn, đã được mô tả. Họ quan sát thấy sự tích tụ của các loại oxy phản ứng (ROS), tăng nồng độ canxi trong tế bào, phosphoryl hóa phosphatidylserine ở màng ngoài cho thấy apoptosis sớm, phá vỡ tiềm năng màng tế bào, kích hoạt sự thoái hóa protein và DNA giống như caspase. Apoptosis trong các tế bào vi khuẩn được xử lý bằng hạt nano bạc. Vì vậy, AgNPs được khử trên nền BC có kích thước 10-20 nm diệt khuẩn tốt ngay từ mốc thời gian 5 phút.

Hiệu suất diệt khuẩn đối với vi khuẩn *P. aeruginosa* của composite BC/AgNPs 25 ppm cao hơn composite BC/AgNPs 10 ppm ở mốc thời gian 5 phút, 15 phút, 30 phút ( $p < 0,05$ ) và diệt khuẩn hiệu quả từ sau 30 phút đối với cả 2 nồng độ composite BC/AgNPs ở các mốc thời gian sau.



Xueting và cs (2010) [26] đã nghiên cứu thành công cơ chế tác động của AgNPs trên *P. aeruginosa* ATCC 10145. Nhóm nghiên cứu đã tìm ra được sự thay đổi trong số lượng protein khi *P. aeruginosa* tiếp xúc với AgNPs. Cụ thể, có 43 protein trong *P. aeruginosa* được biến đổi bao gồm 19 protein được điều chỉnh tăng số lượng nucleic acid và 24 protein bị giảm số lượng nucleic acid sau quá trình tiếp xúc với AgNPs. Sau khi tiến hành phân tích, nhóm nghiên cứu đã xác định được các protein được điều tiết bởi AgNPs trên *P. aeruginosa* mang chức năng liên kết, hoạt động xúc tác, hoạt động vận chuyển, hoạt động của yếu tố phiên mã liên kết axit nucleic, hoạt động chống oxy hóa, hoạt động của bộ chuyển đổi phân tử và hoạt động mang điện tử.

Hoạt tính diệt khuẩn đối với vi khuẩn *S. aureus* diễn ra trong 5 phút đầu tiên khi tiếp xúc. Đối với composite BC/AgNPs sử dụng chất khử EG khi tăng nồng độ Ag<sup>+</sup> từ 10 ppm lên 25 ppm thì có sự khác biệt ( $p < 0.05$ ) ở mốc thời gian diệt khuẩn 15 khi tăng nồng độ thì hiệu suất diệt khuẩn cũng tăng. Từ 30 phút đến 120 phút không có sự khác biệt nhiều giữa nồng độ 10ppm và 25ppm.

Hiệu suất diệt khuẩn *S. epidermidis* của composite BC/AgNPs 10 ppm sử dụng chất khử EG ở các mốc thời gian khảo sát có sự khác nhau nhưng độ lệch chuẩn ở từng mốc thời gian của 3 lần lặp lại thí nghiệm bằng nhau.  $p < 0,05$  khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hiệu suất diệt khuẩn của composite BC/AgNPs 10 ppm ở các mốc thời gian khác nhau với mức độ tin cậy 95%. Tương tự, hiệu suất diệt khuẩn của composite BC/AgNPs 25 ppm sử dụng chất khử EG ở các mốc thời gian khảo sát có sự khác nhau, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

#### 4 KẾT LUẬN

Việc sử dụng chất khử NaBH<sub>4</sub> và EG khử muối bạc tạo hạt nano bạc gắn trên BC đã tạo được vật liệu composite BC/AgNPs có khả năng diệt cả vi khuẩn đại diện nhóm Gram âm và Gram dương được khảo sát trong nghiên cứu, gồm *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*. Tác dụng diệt khuẩn nhờ nano bạc của composite giúp cho vật liệu vốn đã mang những đặc tính tốt của BC, lại có thêm khả năng diệt khuẩn, từ đó sản phẩm của nghiên cứu này có thể mang lại tiềm năng ứng dụng làm vật liệu hỗ trợ đắp vết thương chống nhiễm khuẩn.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Iguchi M., Yamanaka S., Budhiono A. *Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts*, Journal of materials science, vol. 35, no. 2, pp. 261–270, 2000.
- [2] Kucińska-Lipka J., Gubanska I., Janik H. *Bacterial cellulose in the field of wound healing and regenerative medicine of skin: recent trends and future perspectives*, Polymer Bulletin, vol. 72, no.9, pp. 2399–2419, doi: 10.1007/s00289-015-1407-3, 2015.
- [3] Shi Z., Zhang Y., Phillips O., Yang G. *Utilization of bacterial cellulose in food*, Food Hydrocolloids, Food Hydrocolloids, vol 35, pp:539-545, doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.07.012, 2014.
- [4] Santos S. M., Carbajo J. M., Quintana E., Ibarra D., Gomez N., Ladero M., Eugenio M. E., Villar J. C. *Characterization of purified bacterial cellulose focused on its use on paper restoration*, Carbohydrate Polymers, vol. 116, pp. 173–181, doi: 10.1016/j.carbpol.2014.03.064, 2015.
- [5] Yang G., Xie J., Hong F., Cao Z., Yang X. *Antimicrobial activity of silver nanoparticle impregnated bacterial cellulose membrane: Effect of fermentation carbon sources of bacterial cellulose*, Carbohydrate Polymers, vol. 87, no. 1, pp. 839–845, doi: 10.1016/j.carbpol.2011.08.079, 2012.
- [6] Seong, M., Lee D. G. *Silver Nanoparticles Against Salmonella enterica Serotype Typhimurium: Role of Inner Membrane Dysfunction*, Current Microbiology, vol. 74, no. 6, pp. 661–670, doi: 10.1007/s00284-017-1235-9, 2017.
- [7] Percival, S. L., Bowler P. G., Russell D. *Bacterial resistance to silver in wound care*, Journal of Hospital Infection, vol. 60, no. 1, pp. 1–7, doi: 10.1016/j.jhin.2004.11.014, 2005.

- [8] Chatterjee T., Chatterjee B. K., Majumdar D., Chakrabarti P. *Antibacterial effect of silver nanoparticles and the modeling of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model*, Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, vol. 1850, no. 2, pp. 299–306, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.10.022, 2015.
- [9] Van Der Wal A., Norde W., Zehnder A. J. B., Lyklema J. *Determination of the total charge in the cell walls of Gram-positive bacteria*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, vol. 9, no. 1–2, pp. 81–100, doi: 10.1016/S0927-7765(96)01340-9, 1997.
- [10] Chen S., Fan Z., Carroll D. L. *Silver Nanodisks - Synthesis, Characterization, and Self-Assembly.pdf*, J Phys. Chem. B 2002 106 10777, vol. 106, no. 42, 2002.
- [11] Braun E., Eichen Y., Sivan U., Ben-Yoseph G. *DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire*, Nature, vol. 391, no. 6669, pp. 775–778, 1998.
- [12] Ilić V., Šaponjić Z., Vodnik V., Potkonjak B., Jovančić P., Nedeljković J., Radetić M. *The influence of silver content on antimicrobial activity and color of cotton fabrics functionalized with Ag nanoparticles*, Carbohydrate Polymers, vol. 78, no.3, pp. 564–569, doi: 10.1016/j.carbpol.2009.05.015, 2009.
- [13] He J., Kunitake T., Nakao A. *Facile In Situ Synthesis of Noble Metal Nanoparticles in Porous Cellulose Fibers*, Chemistry of Materials, vol. 15, no. 23, pp. 4401–4406, doi: 10.1021/cm034720r, 2003.
- [14] Maneerung, T., Tokura S., Rujiravanit R. *Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing*, Carbohydrate Polymers, vol. 72, no. 1, pp. 43–51, doi: 10.1016/j.carbpol.2007.07.025, 2008.
- [15] Barud H. S., Regiani T., Marques R. F. C., Lustrri W. R., Messaddeq Y., Ribeiro S. J. L. *Antimicrobial bacterial cellulose-silver nanoparticles composite membranes*. Journal of Nanomaterials, vol. 2011, doi: 10.1155/2011/72163, 2011.
- [16] Chen G., Yan L., Wan X., Zhang Q., Wang Q. *In situ synthesis of silver nanoparticles on cellulose fibers using D-Gluconic acid and its antibacterial application*, Material, vol. 12, p. 3101, doi: 10.3390/ma12193101, 2019.
- [17] Maria L. C. S., Santos A. L. C., Oliveira P. C., Valle A. S. S., Ribeiro J. L. *Preparation and antibacterial activity of silver nanoparticles impregnated in bacterial cellulose*, vol. 20, no. 1, p. 2003, 2003.
- [18] Trần Linh Thuộc. *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước và mỹ phẩm*, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam, 2010.
- [19] Wu J., Zheng Y., Song W., Luan J., Wen X., Wu Z., Chen X., Wang Q., Guo S., *In situ synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing*, Carbohydrate Polymers, , <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.093>, 2013.
- [20] Irvani S., Korbekandi H., Zolfaghari B. *Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods*, Res Pharm Sci, vol. 9, no. 6, pp. 385-406, 2014.
- [21] Tatiana G. Volova, Anna A. Shumilovaa, I. P. S., S. Elena D. Nikolaevab, Alexey G. Sukovatiyb, Alexander D. Vasilieva, Ekaterina I. Shishatskayaa, *Antibacterial properties of films of cellulose composites with silver nanoparticles and antibiotics Tatiana G. Volova*, pp. 1–19, 2019.
- [22] Indrianingsih A. W., Maryana R., Rosyida V. T., Apriyana W. *Antibacterial Activity of Silver-Modified Bacterial Cellulose Produced from Coconut Water for Wound Dressing Application*, vol. 2, no. 6, pp. 251–261, 2017.
- [23] Willis L. M., Whitfield C. *Escherichia coli: Chapter 17. Capsule and lipopolysaccharide*. Elsevier Inc. Chapters, 2013.

- [24] Kalishwaralal K., Barathmanikanth S., Ram S., Pandian K., Deepak V., Gurunathan S. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 79, no. 2, pp. 340–344, doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.04.014, 2010.
- [25] Lee W., Kim K.J., Lee D.G. *A novel mechanism for the antibacterial effect of silver nanoparticles on Escherichia coli*. *Biometals*, vol. 27, no. 6, pp:1191–1201, 2014.
- [26] Xueting Y, He B. Liu L., Qu G., Shi J., Hu L., Jiang G. *Antibacterial mechanism of silver nanoparticles in Pseudomonas aeruginosa: proteomics approach*. *Metallomics*, vol 10, no. 4, pp: 557-564, 2018.

Ngày nhận bài: 31/12/2020

Ngày chấp nhận đăng: 23/03/2021