

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN CỦA COMPOSITE CHITOSAN VÀ CELLULOSE VI KHUẨN

NGUYỄN THỊ KIM ANH¹, HOÀNG THÙY DƯƠNG²

¹*Viện Công Nghệ Sinh Học – Thực Phẩm, Trường Đại Học Công Nghiệp TP. HCM*

²*Phòng Công Nghệ Sinh Học, Trung Tâm R&D, Khu Công Nghệ Cao TP. HCM*

nguyenthikimanh@iuh.edu.vn

Tóm tắt. Việc kết hợp cellulose vi khuẩn với vật liệu khác có khả năng diệt khuẩn như chitosan có thể tạo ra composite có tính ứng dụng trong việc diệt khuẩn. Composite kết hợp giữa cellulose vi khuẩn và chitosan trọng lượng phân tử thấp được tạo thành bằng phương pháp *ex situ*. Khả năng kháng khuẩn của composite được khảo sát trên các vi khuẩn *Escherichiacoli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* và *Corynebacterium diphtheriae*. Đặc tính kháng khuẩn của chitosan đã được thể hiện ở composite đối với cả 4 loại vi khuẩn khảo sát. Tuy nhiên, vi khuẩn Gram âm bị tiêu diệt mạnh hơn so với vi khuẩn Gram dương trong nghiên cứu này. Trong khi dung dịch chitosan có hiệu suất diệt *S.aureus* rất yếu thì composite lại có khả năng diệt vi khuẩn này tốt hơn. Composite kết hợp chitosan với cellulose vi khuẩn có thể được sử dụng để ngăn ngừa và tiêu diệt vi khuẩn.

Từ khóa. Chitosan trọng lượng phân tử thấp, composite, *ex situ*, hiệu suất diệt khuẩn

ASSESSMENT OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF COMPOSITE BETWEEN CHITOSAN AND BACTERIAL CELLULOSE ON SOME BACTERIA STRAINS

Abstracts. The integration of bacterial cellulose and other antibacterial material might produce a composite that can eliminate bacteria. Composite of bacterial cellulose and low molecular weight chitosan produced using *ex situ* method. Antibacterial activity of the composite was examined for *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Corynebacterium diphtheriae*. Antibacterial property of chitosan was presented in the composite for all 4 bacterial strains. However, Gram negative bacteria were eliminated more efficiently than Gram positive bacteria in this study. While chitosan solution showed a weak bactericidal performance to *S.aureus*, it happened to be much stronger that the composite can kill this microorganism. Composite between chitosan and bacterial cellulose can be used to prevent and eliminate bacteria.

Keywords. Low molecular weight, composite, *ex situ*, bactericidal performance

1 GIỚI THIỆU

Vi khuẩn *Acetobacter xylinum* thực hiện quá trình trao đổi chất trong môi trường lỏng thông qua việc hấp thụ đường glucose, kết hợp với acid béo để tạo tiền chất tại màng tế bào. Tiền chất được tiết ra ngoài nhờ hệ thống lỗ nằm trên màng tế bào cùng với enzyme có thể polymer hóa glucose thành cellulose [1]. Cellulose vi khuẩn (bacterial cellulose – BC) có cấu trúc hóa học giống cellulose thực vật nhưng cấu trúc đa phân và thuộc tính thì có sự khác nhau giữa BC và cellulose thực vật. Cấu trúc của BC là một chuỗi polymer không phân nhánh gồm các gốc D-glucose nối với nhau nhờ liên kết β -1,4-glucan [2].

BC được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như thực phẩm, y tế. Khi ứng dụng trong y tế, BC có thể làm vật liệu phủ vết thương có tác dụng ngăn vết thương với môi trường bên ngoài, làm sạch và thông thoáng, giúp vết thương nhanh lành. Các vết thương sau phẫu thuật hay các vết loét cũng có thể sử dụng BC trong quá trình điều trị [3]. BC thường được kết hợp với các vật liệu khác để tăng thêm các đặc tính phù hợp với vật liệu hỗ trợ điều trị vết thương, trong đó đặc tính diệt khuẩn rất được quan tâm nghiên cứu.

Việc kết hợp BC với vật liệu có khả năng kháng khuẩn như chitosan hứa hẹn tạo ra vật liệu composite sử dụng trong việc hỗ trợ điều trị các vết thương. Chitosan có nhiều tính chất sinh học như có khả năng hút nước, giữ ẩm, có tính kháng khuẩn với nhiều chủng loại khác nhau, không độc, có khả năng tương thích sinh học cao đồng thời có thể phân hủy sinh học nên không gây dị ứng và không gây phản ứng phụ, không tác hại đến môi trường, ngoài ra còn kích thích sự phát triển tăng sinh của tế bào [4]. Chitosan có

khả năng hấp thụ dầu mỡ rất cao có thể hấp thụ đến gấp 6-8 lần trọng lượng của nó. Chitosan tích điện dương do đó có khả năng liên kết hóa học với những chất tích điện âm như chất béo, lipid, cholesterol, protein và các đại phân tử. Chitosan là hợp chất cao phân tử nên trọng lượng phân tử của chúng giảm dần theo thời gian do phản ứng tự cắt mạch, nhưng trọng lượng phân tử giảm thì hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm không bị giảm đi. Do chitosan là polymer được hình thành từ các monomer nối với nhau bởi các liên kết α -(1-4) glycoside mà các liên kết này thì rất dễ đứt gãy bởi acid, bazơ, tác nhân gây oxy hóa và các enzyme thủy phân [5]. Chitosan có thể bị thủy phân tạo nên chitosan phân tử lượng thấp hơn. Chitosan với mức polymer hóa (DPs) < 20 và trọng lượng phân tử trung bình dưới 3900 Da được gọi là chitosan oligomer, chitooligomers hoặc chitooligosaccharides. Oligochitosan (Chitooligosaccharides) có tính chất đặc trưng là chống lại được các vi sinh vật có hại, chống ung thư và làm vết thương nhanh lành [6].

Nghiên cứu này có mục tiêu tạo ra một vật liệu kết hợp chitosan có trọng lượng phân tử thấp dưới dạng oligomer với BC và tìm hiểu khả năng chống lại một số vi khuẩn của vật liệu composite này.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Kết hợp BC và chitosan bằng phương pháp *ex situ*

Màng BC sau thu nhận được xử lý với NaOH 0,8% đun sôi trong 30 phút để loại bỏ vi khuẩn còn bám trên màng BC, rửa lại bằng nước để loại bỏ kiềm, sau đó ngâm với H₂O₂ 1,5% cho đến khi miếng có màu trắng sáng. Tiếp theo BC sẽ được ngâm trong dung dịch chitosan trong 24 giờ. Chitosan được sử dụng là loại có trọng lượng phân tử thấp (LMC), có thể hòa tan trong acid loãng (Sigma, 448869).

Các vi khuẩn được khảo sát bao gồm 2 vi khuẩn Gram âm là E. coli (ATCC 25922) và P. aeruginosa (ATCC 10145) và 2 vi khuẩn Gram dương là S. aureus (ATCC 25923) và C. diphtheriae (ATCC 13812). Các vi khuẩn được mua từ Mỹ và lưu giữ giống trong phòng thí nghiệm tại Trung tâm Nghiên cứu Triển khai thuộc Khu Công nghệ cao Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2 Kiểm tra cấu trúc composite giữa BC và chitosan bằng kính hiển vi điện tử quét

Mẫu màng BC và composite BC-LMC đã chuẩn bị được xử lý đông khô ở điều kiện chân không và nhiệt độ -50°C. Sau đó, cấu trúc bề mặt mẫu vật liệu được chụp bằng kính hiển vi điện tử quét HITACHI F4800.

2.3 Khảo sát đặc tính kháng khuẩn của dung dịch LMC và composite BC-LMC bằng phương pháp đếm khuẩn lạc

2.3.1 Khảo sát thời gian diệt khuẩn của LMC và composite BC-LMC

Khảo sát này với mục đích nhằm xác định được khoảng thời gian mà dung dịch LMC và composite BC-LMC có khả năng ức chế vi khuẩn để đạt được hiệu suất tối ưu. Mật độ vi khuẩn trong dịch khuẩn khảo sát là 10⁶ CFU/ml.

Sau khi cho chitosan nồng độ 1000ppm tiếp xúc với vi khuẩn tại các khoảng thời gian 5, 15, 30, 60, 90, 120 phút, tiến hành cấy trải dịch khuẩn trên các đĩa petri chứa môi trường LB agar.

Tương tự, composite BC-LMC được tạo ra từ quá trình ngâm BC với dung dịch LMC nồng độ 1000ppm, có kích thước 10x10mm, được cho tiếp xúc trực tiếp với dịch khuẩn có mật độ 10⁶ CFU/ml. Sử dụng màng BC làm đối chứng. Sau các khoảng tiếp xúc giữa BC-LMC và BC trong dịch khuẩn 0- 5- 15- 30- 60- 90- 120 phút, hút 100μL dịch khuẩn cho vào đĩa petri chứa môi trường LB agar và cấy trải.

Ủ các đĩa ở 37°C trong 24 – 48 giờ. Đọc kết quả bằng cách đếm tất cả khuẩn lạc có trong đĩa và so sánh với đĩa đối chứng, từ đó tính ra mật độ CFU/ml sau đó tính hiệu suất kháng khuẩn.

Số lượng tế bào vi khuẩn được xác định theo công thức sau đây:

$$N \text{ (CFU/ml)} = \frac{\sum C}{n_1.V.d_1 + \dots + n_i.V.d_i}$$

Trong đó: N: số tế bào (đơn vị hình thành khuẩn lạc) vi khuẩn trong 1ml mẫu.

C: tổng số khuẩn lạc đếm được trên đĩa.

n_i : số lượng đĩa cấy tại độ pha loãng i

V : thể tích dịch mẫu (ml) cấy vào trong mỗi đĩa.

d_i : độ pha loãng tương ứng

2.3.2 Khảo sát hiệu suất diệt khuẩn của LMC và composite BC-LMC

Dựa vào kết quả thời gian mà LMC và composite BC-LMC có thể diệt khuẩn hiệu quả, khả năng diệt khuẩn trên dãy nồng độ 0,5; 1,5; 2,5; 5; 7,5; 10; 50; 150; 250; 500; 750; và 1000 ppm đối với LMC và dãy nồng độ 10, 50, 150, 250, 500, 750, 1000 ppm đối với BC-LMC tiếp tục được khảo sát để xác định được nồng độ ức chế khi cho chitosan tiếp xúc trực tiếp với dịch khuẩn đạt được hiệu suất tối ưu.

Hiệu suất diệt khuẩn được tính theo công thức sau:

Hiệu suất diệt khuẩn (%) = (số lượng tế bào vi khuẩn trên đĩa đối chứng – số lượng tế bào vi khuẩn trên đĩa khảo sát) / số lượng tế bào vi khuẩn trên đĩa đối chứng $\times 100$

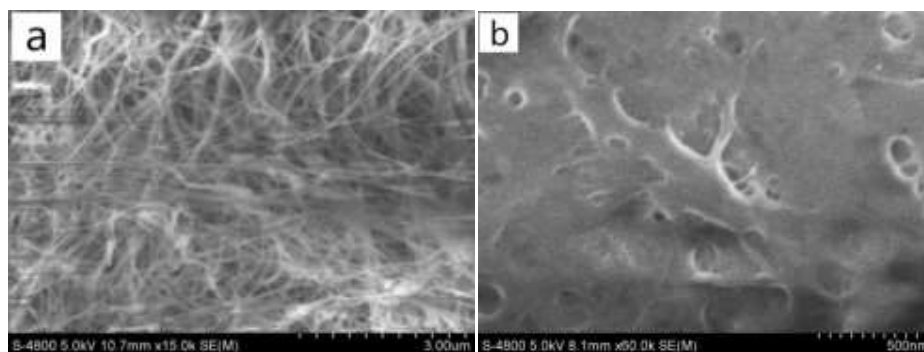
2.3.3. Phương pháp xử lý số liệu

Phần mềm thống kê Statgraphic được sử dụng để xử lý số liệu. Độ lệch chuẩn và ANOVA đơn yếu tố được sử dụng để thể hiện kết quả trung bình của các lần lặp lại và so sánh giữa các nhóm thí nghiệm.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Vật liệu composite giữa oligochitosan với BC

Màng composite BC-oligochitosan (BC-LMC) có màu trắng, bề mặt mịn và có độ dai. Sau khi được gắn kết với các phân tử LMC, màng được kiểm tra cấu trúc dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM). Hình ảnh cho thấy cấu trúc 3D chặt chẽ được hình thành từ các sợi cellulose có kích thước nano, các màng BC được tạo ra có độ xốp do vi khuẩn *A. xylinum* có thể tạo cellulose ở cấu trúc bậc I (ribbon-like polymer) và bậc II (thermodynamically stable polymer) [7], các ribbon cellulose dạng sợi nano được tạo ra sau quá trình tổng hợp các tiền sợi (protofibril) của các chuỗi glucose được vi khuẩn tiết ra qua vách tế bào, cấu trúc sợi của màng BC đối chứng (hình 1). Hệ thống của màng BC được tạo thành từ các sợi nano sắp xếp chặt chẽ trong không gian ba chiều, tạo thành các tấm hydrogel có độ bền và độ xốp cao [8].



Hình 1: Cấu trúc sợi của màng BC đối chứng (a) và BC-LMC (b) được chụp dưới kính hiển vi điện tử quét.

Trên bề mặt lớp cắt của màng composite BC-LMC có thể quan sát thấy LMC che phủ dày đặc và len lỏi trong mạng lưới sợi cellulose của BC. LMC có cấu trúc mạch lớn và có khả năng thâm nhập vào bên trong các khoảng trống giữa các vi sợi (microfibrils) này hình thành sự liên kết với các phân tử của màng BC [9].

3.2 Khả năng diệt khuẩn của dung dịch oligochitosan (LMC) và composite BC-LMC

3.2.1 Hiệu suất diệt khuẩn của dung dịch LMC theo thời gian

Hiệu quả diệt khuẩn của dung dịch LMC được khảo sát theo thời gian tại 5, 15, 30, 60, 90, 120 phút ở nồng độ 1000ppm nhằm xác định được khoảng thời gian tối ưu mà hai dung dịch có khả năng ức chế vi khuẩn *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. diphtheriae* (bảng 1).

Bảng 1: Hiệu suất kháng khuẩn theo thời gian của dung dịch LMC

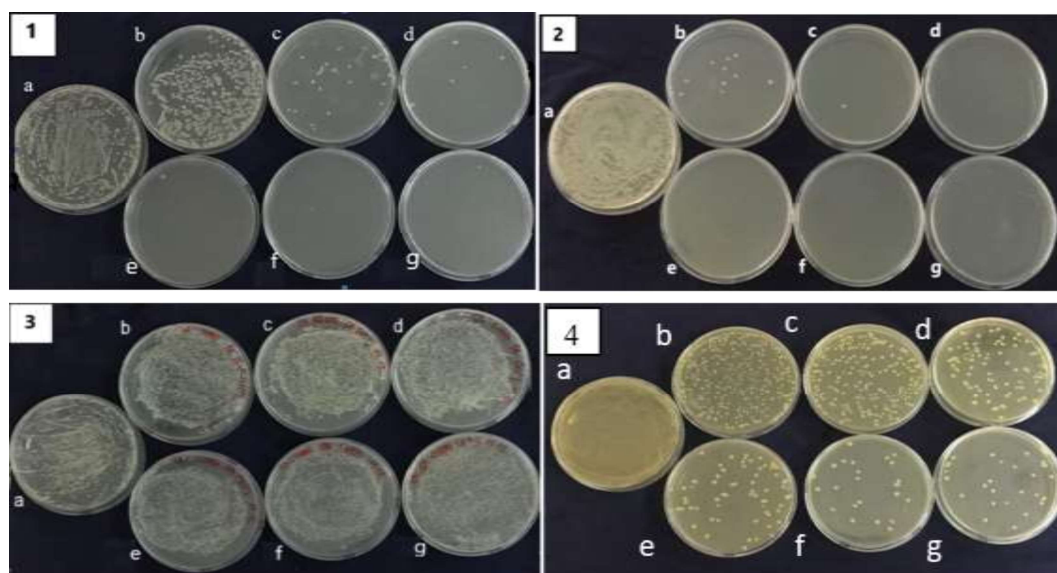
Thời gian (phút)	Hiệu suất kháng khuẩn (%)			
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. diphtheriae</i>
5	96,00 ± 0,70 ^a	99,51 ± 0,31 ^a	1,45 ± 1,16 ^a	73,73 ± 2,20 ^a
15	99,54 ± 0,21 ^b	99,96 ± 0,02 ^b	9,75 ± 2,13 ^{ab}	78,61 ± 1,14 ^b
30	99,88 ± 0,07 ^b	100,00 ± 0,00 ^b	6,55 ± 2,17 ^{ab}	87,23 ± 0,84 ^c
60	99,90 ± 0,05 ^b	100,00 ± 0,00 ^b	12,90 ± 4,98 ^{bc}	91,97 ± 0,29 ^d
90	99,94 ± 0,05 ^b	100,00 ± 0,00 ^b	18,51 ± 1,13 ^{cd}	96,15 ± 1,22 ^e
120	99,98 ± 0,00 ^b	100,00 ± 0,00 ^b	20,87 ± 3,30 ^d	99,42 ± 0,62 ^f

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình mang chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê tại $P < 0,05$.

LMC diệt khuẩn với hiệu suất và thời gian khác nhau đối với các vi khuẩn khác nhau. Hai vi khuẩn Gram âm gồm *E. coli* và *P. aeruginosa* bị dung dịch LMC diệt 100% lần lượt sau thời gian tiếp xúc 15 phút và 30 phút (Bảng 1).

Khả năng diệt khuẩn của dung dịch LMC đối với *S. aureus* có hiệu suất thấp. Khuẩn lạc mọc dày đặc và không khác biệt đáng kể sau khi vi khuẩn tiếp xúc với chitosan thời gian dài (Hình 2). Hiệu suất diệt khuẩn chỉ đạt 1,45% ở mốc thời gian 5 phút và chỉ đạt 20,87% sau 120 phút tiếp xúc.

Hiệu suất kháng khuẩn của LMC đối với *C. diphtheriae* tuy thấp hơn *E. coli* và *P. aeruginosa* nhưng cao hơn hẳn so với *S. aureus*. Trong 5 phút đầu, hiệu suất diệt *C. diphtheriae* đạt 73,73%, tăng dần khi tăng thời gian diệt khuẩn và đạt trên 90% từ 60 phút trở đi (Bảng 1).



Hình 2: Khả năng kháng khuẩn của dung dịch LMC 1000ppm theo thời gian. Đối với *E. coli* (1), *P. aeruginosa* (2), *S. aureus* (3), *C. diphtheriae* (4) và đĩa petri cấy tại các mốc thời gian 0 phút (a), 5 phút (b), 15 phút (c), 30 phút (d), 60 phút (e), 90 phút (f), 120 phút (g).

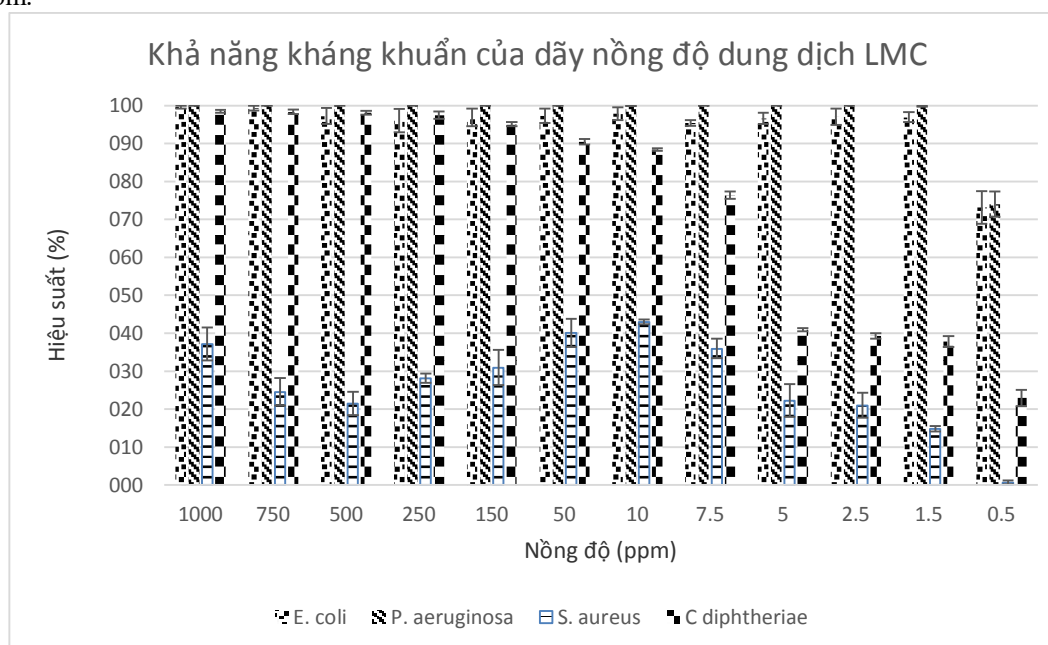
Chitosan đã được nhiều nghiên cứu chứng minh có khả năng diệt cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương tuy nhiên hiệu suất diệt khuẩn khi được so sánh giữa vi khuẩn Gram âm và Gram dương vẫn còn nhiều tranh cãi. Một số nghiên cứu cho thấy chitosan có tác động mạnh hơn tới vi khuẩn Gram âm so với Gram dương [10], [11] và các phân tích từ những nghiên cứu này đều cho rằng vi khuẩn Gram âm có lớp vách tế bào mỏng hơn nên dễ bị tác động hơn vi khuẩn Gram dương. Mặt khác, chitosan lại được chứng minh là có tác động mạnh mẽ hơn tới vi khuẩn Gram âm ở một số nghiên cứu [12], [13]. Kết quả của nghiên

cứu này cho thấy rõ ràng các vi khuẩn Gram âm gồm *E.coli* và *P.aeruginosa* dễ bị chitosan tiêu diệt hơn so với các vi khuẩn Gram dương gồm *S.aureus* và *C.diphtheria*.

Các phân tử LMC có thể bám vào bề mặt vi khuẩn và tác động lên quá trình trao đổi chất qua màng của tế bào vi khuẩn, hoặc làm mất tính toàn vẹn của màng tế bào gây chết tế bào. Sự tương tác tĩnh điện giữa các nhóm mang điện tích dương của chitosan và các vị trí mang điện tích âm trên màng tế bào vi khuẩn là cơ chế diệt khuẩn chủ yếu của chitosan [14]. Bên cạnh đó, độ dày của lớp peptidoglycan cũng đóng vai trò quan trọng trong quá trình tương tác của chitosan tác động tới vi khuẩn [15]. Điều này có thể giải thích cho việc tại sao chitosan có thể bám và tiêu diệt được vi khuẩn. Khả năng diệt khuẩn của chitosan là khác nhau đối với từng loại vi khuẩn khi chúng có đặc điểm hình dạng và cấu tạo màng tế bào không giống nhau. Vi khuẩn Gram âm có lớp peptidoglycan mỏng hơn có thể sẽ ít cản trở khả năng bám và liên kết của chitosan hơn so với vi khuẩn Gram dương có lớp peptidoglycan dày.

3.2.2 Hiệu suất diệt khuẩn của dây nồng độ dung dịch LMC

Hiệu suất diệt khuẩn được khảo sát dựa trên dây nồng độ của dung dịch LMC trong khoảng thời gian thích hợp, nhằm mục đích xác định nồng độ tối thiểu mà chúng có khả năng ức chế được sự tăng trưởng và phát triển của vi khuẩn. Dây nồng độ khảo sát là 0,5; 1,5; 2,5; 5; 7,5; 10; 50; 150; 250; 500; 750; và 1000 ppm.



Hình 3: Khả năng diệt khuẩn của dây nồng độ dung dịch LMC sau thời gian tiếp xúc 15 phút đối với *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus* và *C.diphtheriae*.

Dung dịch LMC có khả năng diệt khuẩn hiệu quả đối với *E. coli* và *P. aeruginosa* bắt đầu từ nồng độ 1,5ppm (hiệu suất đạt được trên 95% so với đối chứng). Kết quả cho thấy nồng độ ức chế tối thiểu của LMC với hai loại vi khuẩn Gram âm là 1,5ppm. Tuy nhiên, hiệu suất diệt khuẩn *P. aeruginosa* tương đối ổn định hơn so với *E. coli* (Hình 3).

Hiệu suất diệt khuẩn đối với *S. aureus* rất thấp, không ổn định và chỉ dao động dưới 45%. Trong khi đó, hiệu suất của LMC 1000ppm đối với *C. diphtheriae* tương đối ổn định so với *S. aureus* (nồng độ LMC 0,5-10ppm: hiệu suất dao động 22-88%, từ 50ppm trở lên hiệu suất diệt khuẩn đạt trên 90%), ghi nhận nồng độ ức chế tối thiểu là 250ppm.

Khả năng diệt *E. coli* của dung dịch chitosan có hiệu suất cao được ghi nhận với nồng độ từ 100ppm trở lên [12], [16]. Giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) ở nghiên cứu này khá cao so với nghiên cứu trước đây ghi nhận MIC của chitosan đối với *E. coli*, *P. aeruginosa* và *S. aureus* lần lượt là 0,06%, 0,1% và 0,06% tương ứng với nồng độ 600, 1000, 600ppm [17].

Dung dịch LMC có khả năng diệt khuẩn hiệu quả đối với *E. coli* và *P. aeruginosa* bắt đầu từ nồng độ 1,5ppm (hiệu suất trên 95%). Hiệu suất có xu hướng giảm rõ rệt ở nồng độ 0,5ppm đối với *E. coli* và *P. aeruginosa* với kết quả lần lượt là 68,83% và 70,72% (Hình 3). Kết quả cho thấy khả năng diệt khuẩn của LMC đối với hai chủng vi khuẩn Gram âm đều có hiệu suất cao gần tới 100% từ nồng độ 1,5-1000ppm. Đối với *S. aureus*, hiệu suất diệt khuẩn dường như rất thấp, không ổn định và chỉ dao động dưới 45%. Số lượng khuẩn lạc vẫn còn xuất hiện nhiều trên đĩa, do đó khả năng diệt khuẩn không hiệu quả so với hai vi khuẩn Gram âm.

3.2.3 Hiệu suất diệt khuẩn của composite BC-LMC theo thời gian

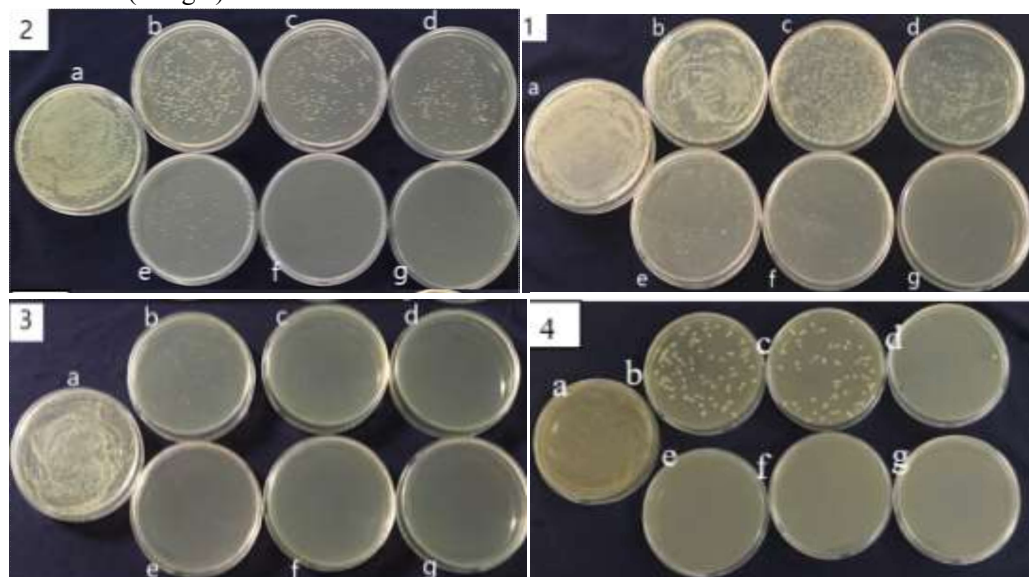
Nhiễm khuẩn có thể ảnh hưởng nghiêm trọng đến việc chữa lành vết thương. Vì thế, sự kết hợp giữa BC với LMC được trông đợi sẽ làm giảm sự phát triển của vi khuẩn tại vết thương. Việc khảo sát đặc tính kháng khuẩn của màng BC-LMC được đánh giá bằng cách tiếp xúc trực tiếp với bốn chủng vi khuẩn *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. diphtheriae*. Kết quả khảo sát hiệu suất diệt khuẩn của composite BC-LMC ở nồng độ 1000ppm qua các mốc thời gian cũng được thể hiện cụ thể ở bảng 2.

Bảng 2: Hiệu suất kháng khuẩn theo thời gian của composite BC-LMC

Thời gian (phút)	Hiệu suất kháng khuẩn (%)			
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. diphtheriae</i>
5	79,68 ± 4,70 ^a	53,26 ± 3,50 ^a	99,49 ± 0,21 ^a	90,13 ± 0,16 ^a
15	92,57 ± 3,76 ^b	71,44 ± 1,92 ^b	99,55 ± 0,56 ^a	96,16 ± 0,45 ^b
30	98,28 ± 1,12 ^c	89,42 ± 2,77 ^c	99,98 ± 0,01 ^a	98,66 ± 0,55 ^c
60	98,59 ± 1,36 ^c	90,58 ± 3,58 ^c	100,00 ± 0,01 ^a	99,45 ± 0,63 ^{cd}
90	99,79 ± 0,10 ^c	95,52 ± 4,43 ^{cd}	99,99 ± 0,01 ^a	99,86 ± 0,45 ^d
120	99,99 ± 0,01 ^c	98,21 ± 2,25 ^d	99,98 ± 0,02 ^a	100,00 ± 0,00 ^d

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình mang chữ cái khác nhau có giá trị sai khác thống kê ($P < 0,05$).

Hiệu suất diệt khuẩn đối với vi khuẩn *E. coli* và *P. aeruginosa* ở mốc thời gian tiếp xúc sau 5 phút lần lượt là 79,68% và 53,46%. Vi khuẩn gram dương *S. aureus* và *C. diphtheriae* bị composite tác động với hiệu suất diệt khuẩn lần lượt là 99,49% và 90,13%. Sau mốc thời gian 30 phút, khả năng diệt khuẩn của composite BC-LMC ở cả bốn chủng vi khuẩn *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. diphtheriae* đều đạt hiệu suất trên 95% (Bảng 2).



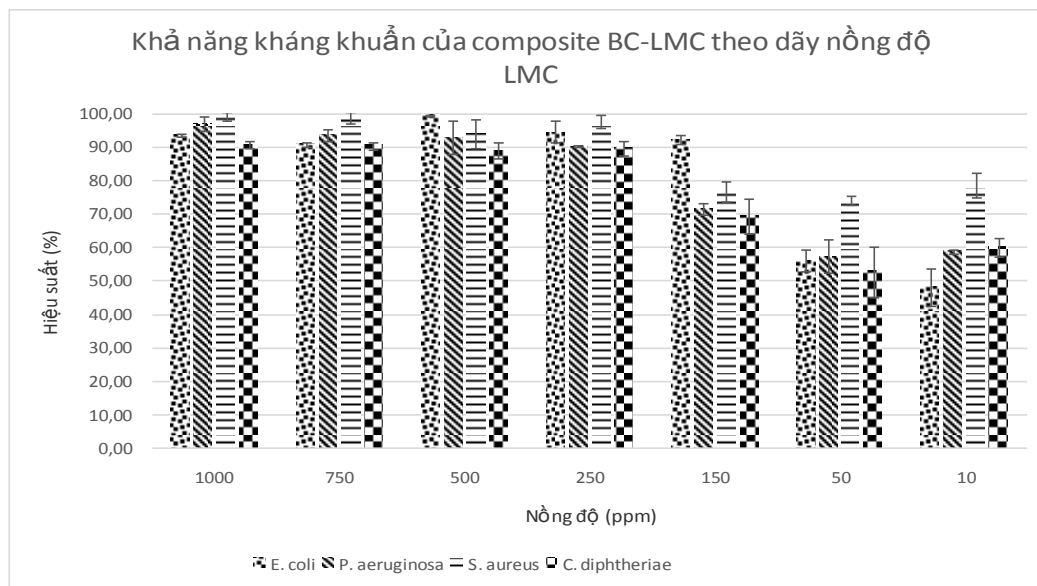
Hình 4: Khả năng kháng khuẩn của composite BC-LMC 1000ppm theo thời gian. Đối với *E. coli* (1), *P. aeruginosa* (2), *S. aureus* (3), *C. diphtheriae* (4) và đĩa petri cấy tại các mốc thời gian 0 phút (a), 5 phút (b), 15 phút (c), 30 phút (d), 60 phút (e), 90 phút (f), 120 phút (g).

Một điểm thú vị trong nghiên cứu này là khả năng diệt khuẩn của composite BC-LMC đối với vi khuẩn *S.aureus* hiệu quả hơn hẳn so với dung dịch LMC. Composite BC-LMC tiêu diệt hầu hết vi khuẩn *S.aureus* biểu hiện trên các đĩa thạch hầu như có rất ít hoặc không có khuẩn lạc xuất hiện (hình 4).

3.2.4 Hiệu suất kháng khuẩn của dây nồng độ composite BC-LMC

Tương tự như đối với dung dịch LMC, composite BC-LMC cũng được khảo sát hiệu suất diệt khuẩn dựa trên dây nồng độ của dung dịch LMC sử dụng để gắn kết với màng BC nhằm mục đích xác định nồng độ tối thiểu khi sử dụng tạo composite có khả năng ức chế được sự tăng trưởng và phát triển của vi khuẩn. Dây nồng độ khảo sát là 10, 50, 150, 250, 500, 750, 1000 (ppm).

Composite BC-LMC khi sử dụng nồng độ chitosan 1000 ppm cho thấy khả năng diệt khuẩn tương đối cao đối với *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. diphtheriae* với hiệu suất lần lượt là 93,57%, 97,10%, 90,12% và 90,77%. Trong đó, màng BC được ngâm trong dung dịch LMC ở nồng độ từ 150 đến 1000 ppm có khả năng diệt vi khuẩn *E.coli* đạt trên 90%, hiệu suất diệt khuẩn ở nồng độ 50 ppm và 10 ppm có xu hướng giảm đi chỉ còn 56,10% và 48,23%. Tương tự, khả năng diệt khuẩn hiệu quả của composite BC-LMC đối với *P. aeruginosa* là từ nồng độ 250 đến 1000 ppm, và có xu hướng giảm dần từ nồng độ 150 ppm trở đi với hiệu suất dao động từ 58,86-71,44%. Đối với vi khuẩn *S.aureus*, khả năng diệt khuẩn ở các nồng độ từ 250 đến 1000 ppm có hiệu suất đạt trên 90%, hiệu suất diệt khuẩn ở các nồng độ 10, 50, 150 ppm có dấu hiệu giảm không đáng kể với hiệu suất dao động từ 76,65-78,65%. Tương tự như *S. aureus*, khả năng diệt *C. diphtheriae* của BC-LMC có hiệu suất cao (89,74-90,77%) ở nồng độ 250-1000 ppm (Hình 5).



Hình 5. Khả năng kháng khuẩn của dây nồng độ composite BC-LMC sau 30 phút.

Composite có hiệu suất diệt khuẩn tương đối cao (trên dưới 90%) và đồng đều đối với cả 4 vi khuẩn khảo sát khi sử dụng dung dịch chitosan có nồng độ từ 250 ppm để ngâm màng BC.

4 KẾT LUẬN

Composite BC-LMC được chế tạo bằng phương pháp *ex situ* mang đặc tính kháng khuẩn của chitosan và có tác động tới cả 4 vi khuẩn khảo sát gồm *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus* và *C.diphtheriae*. Vi khuẩn Gram âm bị tiêu diệt mạnh hơn so với vi khuẩn Gram dương. Trong khi dung dịch LMC diệt *S.aureus* hiệu suất thấp thì composite BC-LMC lại có khả năng diệt vi khuẩn này tốt hơn. Các nghiên cứu tiếp theo cần được tiếp tục thực hiện để lý giải cho sự khác biệt này.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Trung tâm Nghiên cứu triển khai, Khu Công nghệ cao Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ các vật tư, nguyên liệu, thiết bị cho các thí nghiệm trong nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Ross P., Mayer R., Benziman M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Review*, 55(1): 35-58.
- [2] Klemm D., Heublein B., Fin H.P., Bohn A. (2005). Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie-International Edition*, 44(22): 3358-3393.
- [3] Jonas R., Farah L.H. (1998). Production and application of microbial cellulose. *Poly. Deg. Stab.*, 59: 101-106.
- [4] Lin W.C., Lien C.C., Yeh H.J., Yu C.M., Hsu S.H. (2013). Bacterial cellulose and bacterial cellulose chitosan membranes for wound dressing applications. *Carbohydr Polym.*, 94(1): 603-611.
- [5] Rinaudo M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.*, 31(7): 603-632.
- [6] Mourya V.K., Inamdar N.N., Choudhari Y.M. (2011). Chitoooligosaccharides: Synthesis characterization and applications. *Poly. Sci.*, 53: 583-612.
- [7] Chawla P.R., Bajaj I.B., Survase S.A., Singhal R.S. (2009). Microbial cellulose: Fermentative production and applications. *Food Technol Biotechnol.*, 47(2): 107-124.
- [8] Nguyễn Thị Kim Anh, Hoàng Thùy Dương, Trần Thị Khánh Hòa, Nguyễn Thị Thanh Kiều (2016). Đánh giá khả năng sử dụng màng cellulose do *Acetobacter xylinum* tạo ra làm giá đỡ (scaffold) nuôi cấy tế bào fibroblast chuột nhắt trắng. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 14(3): 427-433.
- [9] Yamada Y., Hoshino K., Ishikawa T. (1997). The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Glyconoacetobacter* to the generic level. *Biosci Biotechnol Biochem*, 61(8): 1244-1251.
- [10] No H.K., Park N.Y., Lee S.H., Meyers S.P. (2002). Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int. J. Food Microbiol.*, 74: 65-72.
- [11] Silva L.P., Britto D., Selegim M.H.R., Assis O.B.G. (2010). In vitro activity of water-soluble quaternary chitosan chloride salt against *E.coli*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26: 2089-2092.
- [12] Sudarshan N.R., Hoover D.G., Knorr D. (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnol.*, 6: 257-272.
- [13] Eaton P., Fernandes J.C., Pereira E., Pintado M.E. (2008). Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosan on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ultramicroscopy*, 108: 1128-1134.
- [14] Rabea E.I., Badawy M.E. T., Stevens C.V., Smagghe G., Steurbaut W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4: 1457-1465.
- [15] Zheng L. Y., Zhu J. F. (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydr. Polym.*, 54: 527-630.
- [16] Liu H., Du Y., Wang X., Sun L. (2004). Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *Int. J. Food Microbiol.*, 95(2): 147-155.
- [17] Jeon Y., Park P., Kim S. (2001). Antimicrobial effect of chitoooligosaccharides produced by bioreactor, 44: 71-76.

Ngày nhận bài: 02/01/2020

Ngày chấp nhận đăng: 20/03/2020