

TAO HẠT NANO BẠC TỪ DỊCH CHIẾT VỎ QUẢ *Hylocereus costaricensis* VÀ KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA DUNG DỊCH NANO BẠC

Nguyễn Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Lê Na*

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

TÓM TẮT

Ngày nay, hạt nano bạc có đặc tính kháng khuẩn cao được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực của đời sống như y học, dược phẩm, mỹ phẩm. Trong nghiên cứu này, các hạt nano bạc được tổng hợp bằng cách sử dụng chiết xuất từ vỏ quả thanh long (*Hylocereus costaricensis*). Các điều kiện tạo hạt nano bạc được khảo sát bao gồm khối lượng nguyên liệu/nước, tỷ lệ dung dịch AgNO₃/dịch chiết, nhiệt độ, pH và thời gian tạo hạt nano. Kết quả đã cho thấy hạt nano bạc được tạo ra nhiều nhất ở tỷ lệ vỏ quả trong nước là 0,1g/1mL; tỷ lệ dung dịch AgNO₃/dịch chiết là 1/4; ở nhiệt độ 100°C; pH: 9; thời gian phản ứng: 60 phút. Phân tích bằng kính hiển vi điện tử SEM khẳng định sự tạo thành của hạt nano có dạng hình cầu, tương đối đồng nhất với kích thước khoảng từ 20 – 50 nm. Hoạt tính kháng khuẩn của dung dịch nano bạc được khảo sát trên các chủng vi sinh vật *E.coli* và *Streptococcus aureus* với kích thước vòng kháng khuẩn từ 5 – 9 mm ở các thể tích dung dịch thử nghiệm 50, 25, 15 (μL). Những kết quả này cho thấy dung dịch nano bạc được tạo ra từ dịch chiết thực vật có thể ứng dụng trong việc ức chế các vi sinh vật gây bệnh trong môi trường.

Từ khóa: Nano bạc, công nghệ nano, dịch chiết, *Hylocereus costaricensis*, hoạt tính kháng khuẩn.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Công nghệ nano được đặt nền móng bởi nhà vật lý học Richard P. Feynman vào năm 1959 và ngày càng được ứng dụng nhiều hơn trong các lĩnh vực của đời sống, đặc biệt là ở lĩnh vực chế tạo vật liệu. Các vật liệu nano được sản xuất ở quy mô công nghiệp có kích thước một chiều của hạt đạt đến giá trị nanomet (nm, 1nm = 10 – 9 m) (Bayda *et al.*, 2019). Trong đó, độ kết tinh, hình dạng của hạt nano được kiểm soát bởi nhiệt độ, pH, nồng độ và thành phần hóa học (Raab *et al.*, 2011). Sự thu nhỏ kích thước và tăng diện tích bề mặt dẫn đến tạo ra các vật liệu bền hơn, nhẹ hơn, dẫn điện tốt hơn và đòi hỏi ít năng lượng hơn. Chúng có nhiều tính chất đặc biệt mà vật liệu ở dạng khối không có được như tính chất cơ, điện, quang, từ tính,...

Bạc là nguyên tố kim loại nặng tương tự với chì, thủy ngân, cadmium, tuy nhiên bạc không gây tác hại nặng nề với con người và động vật. Hơn nữa, bạc có hoạt tính kháng khuẩn rất tốt, được ứng dụng nhiều trong lĩnh vực của đời sống như mỹ phẩm, môi trường, dược phẩm, đặc biệt ở lĩnh vực y học. Các ion bạc tự do mang điện tích dương có khả năng liên kết với màng tế bào vi khuẩn. Chúng có thể làm tăng tính thấm của màng tế bào, tạo ra các loại oxy phản ứng (ROS) và làm gián đoạn quá trình sao chép hoặc đứt gãy DNA và phá hủy tế bào vi khuẩn (Yin *et al.*, 2020; Klueh *et al.*, 2000). Trước khi có phát minh về thuốc kháng sinh, các bác sĩ đã sử dụng kim khâu bằng bạc để giảm khả năng viêm nhiễm sau phẫu thuật. Trong chiến tranh thế giới thứ nhất, những người lính mang băng lá bạc vào vết thương để tránh nhiễm trùng. Ngày nay, các hạt bạc được chế tạo ở kích thước nano để tăng diện tích tiếp xúc với tế bào vi khuẩn và làm tăng khả năng kháng khuẩn của dung dịch nano bạc.

Nhiều phương pháp vật lý, hóa học, sinh học được sử dụng để tạo hạt nano bạc. Nổi bật trong đó là sử dụng các hợp chất hóa học có khả năng khử ion bạc về dạng hạt nano và sử dụng thêm các hợp chất bổ sung như polyvinylpyrrolidone, polyethylene glycol (Ge *et al.*, 2014) để tăng tính ổn định cho phản ứng. Hầu hết các phương pháp tổng hợp hóa học thường tạo hạt nano dễ dàng tuy nhiên cần thiết phải sử dụng trang thiết bị hiện đại, tốn nhiều năng lượng hay hóa chất tổng hợp độc hại. Vì vậy, sử dụng phương pháp sinh học để tổng hợp nano bạc như dịch chiết từ vi khuẩn, nấm, tảo và các dịch chiết từ thực vật là một trong những hướng ưu tiên nghiên cứu để hướng đến tạo hạt nano bạc thân thiện với môi trường.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng dịch chiết từ vỏ quả *Hylocereus costaricensis* để tạo nano bạc. Trong vỏ quả *Hylocereus costaricensis* chứa nhiều hợp chất như steoids, carbohydrates, alkaloids, tannins, flavanoids, saponins. Các nhóm hợp chất này đóng vai trò là tác nhân ion bạc về dạng bạc kim loại có kích thước nano (Saenjum *et al.*, 2021) trong dung dịch. Chúng tôi cũng khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của dung dịch nano bạc đối với các chủng vi sinh vật *Escherichia Coli* và *Staphylococcus aureus*.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Vỏ quả *Hylocereus costaricensis* được mua ở siêu thị trên địa bàn Hà Nội và xác định lại tên khoa học tại Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội. Quả *Hylocereus costaricensis* được loại

bỏ phần ruột bên trong, rửa sạch, vỏ cắt thành từng mảnh nhỏ có kích thước <5 mm và được bảo quản ở 4°C cho các thí nghiệm phân tích.

Chủng vi sinh vật: *Escherichia Coli* và *Staphylococcus aureus* được cung cấp bởi bộ môn Vi sinh vật, Khoa Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội. Hóa chất: peptone, cao nấm men (Biobasic), NaCl (Trung Quốc), agar (Việt Nam), dung dịch AgNO₃ (nồng độ 15mM), NaOH, HCl (Trung Quốc).

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp phân tích bằng phổ UV-VIS.

Đặc tính cơ bản của quang phổ UV-VIS của dung dịch nano bạc được xác định bằng phương pháp đo phổ trong dải bước sóng 300 - 600 nm bằng máy đo quang phổ UV-VIS (Thermo Scientific, USA) (Ashraf *et al.*, 2016). Phổ UV-VIS của dung dịch nano bạc xuất hiện một đỉnh duy nhất ở bước sóng 415 nm.

Tối ưu các điều kiện ảnh hưởng đến quá trình tạo nano bạc

Tối ưu các điều kiện tạo nano bạc bao gồm khảo sát ảnh hưởng của khối lượng nguyên liệu lên khả năng tạo nano bạc; khảo sát ảnh hưởng tỷ lệ dịch chiết/AgNO₃ lên khả năng tạo nano bạc; khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng tạo nano bạc; khảo sát ảnh hưởng của pH lên khả năng tạo nano bạc; khảo sát ảnh hưởng của thời gian lên khả năng tạo nano bạc.

*Xác định khả năng kháng khuẩn của mẫu nano bạc tạo từ dịch chiết vỏ quả *Hylocereus costaricensis**

Hoạt tính kháng khuẩn của dung dịch nano bạc được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch (Balouiri *et al.*, 2016). Mẫu dung dịch nano bạc (thể tích dung dịch 50, 25, 15 (μL)) được sử dụng để thử nghiệm. Đối chứng dương (+) là kháng sinh ampicillin (20 μg/mL); đối chứng âm (-) là dịch chiết vỏ quả *Hylocereus costaricensis*. Đường kính vòng kháng khuẩn được xác định bằng đơn vị mm.

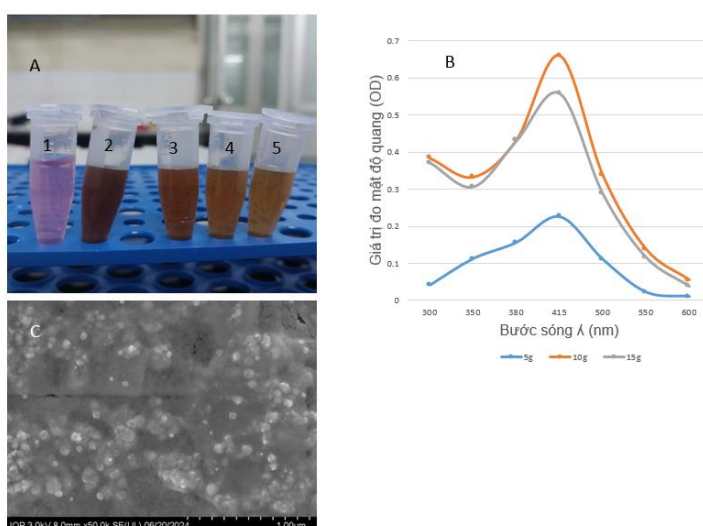
Phương pháp xác định kích thước và hình thái của hạt nano bạc bằng hình ảnh SEM

Kính hiển vi điện tử quét (SEM) là một loại kính hiển vi điện tử có thể chụp được hình ảnh bề mặt vật liệu với độ phân giải và phóng đại lớn. Hình ảnh của hạt nano bạc được chụp bằng hình ảnh SEM và kích thước của hạt nano được phân tích hiển thị trên hình ảnh.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của khối lượng vỏ quả *Hylocereus costaricensis*

Sự hình thành nano bạc được quan sát bằng sự thay đổi màu sắc và quang phổ UV-VIS. Khi nano bạc được hình thành, màu dung dịch chuyển dần sang màu nâu vàng trong khoảng mười phút và chuyển sang màu nâu đỏ trong khoảng một giờ (Hình 1A). Do đặc tính cộng hưởng plasmon bề mặt, các hạt nano bạc có phổ UV-Vis đặc trưng xuất hiện đỉnh trong khoảng 400 –450 nm (Hình 1B) và nano bạc được tạo thành có kích thước trong khoảng 20-50 nm (Hình 1C).



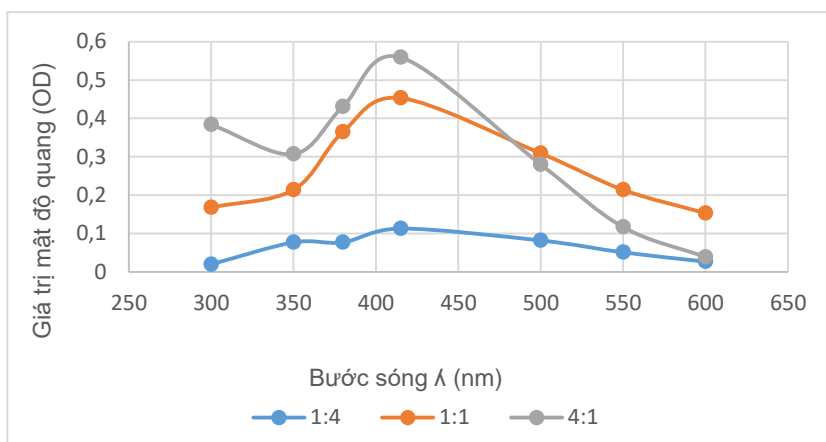
Hình 1. A. (1) Dịch chiết vỏ quả *Hylocereus costaricensis*, (2-5), dung dịch nano bạc được tạo thành ở các nồng độ khác nhau; B. Phổ UV-VIS của dung dịch nano bạc với các khối lượng nguyên liệu (Vỏ quả *Hylocereus costaricensis*) khác nhau; C. Hình ảnh SEM của nano bạc tạo bởi dịch chiết vỏ quả *Hylocereus costaricensis*.

Với cùng một thể tích dung môi chiết là nước, ở khối lượng vỏ quả *Hylocereus costaricensis* 5, 10, 15 g cho thấy

một đỉnh phổ bước sóng $\lambda=415$ nm được tạo thành trong khoảng bước sóng khảo sát từ 300-600 nm. Ở tỷ lệ 10 g vỏ quả/100 mL nước cất cho thấy có giá trị mật độ quang ở bước sóng 415 nm là lớn nhất. Khi tăng lượng vỏ lên 15 g, giá trị mật độ quang ở bước sóng 415 nm giảm có thể do keo tụ các hạt nano bạc tạo thành hạt có kích thước lớn làm giảm giá trị mật độ quang (Hồ Thị Phương *et al.*, 2019). Vì vậy chúng tôi lựa chọn tỷ lệ chiết 10 g vỏ trong 100 mL nước cất cho các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng tỷ lệ giữa dịch chiết và dung dịch $AgNO_3$ đến khả năng tạo nano bạc

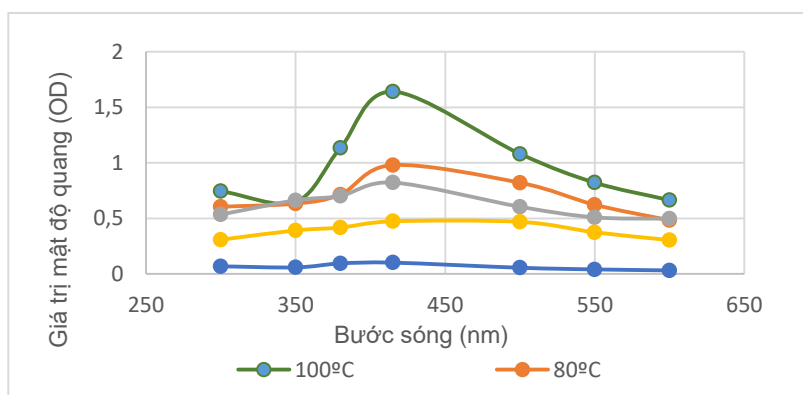
Nano bạc được tạo ra bởi sự pha trộn giữa dịch chiết và dung dịch $AgNO_3$ với các tỷ lệ khác nhau (4:1; 1:1 và 1:4). Tỷ lệ dung dịch $AgNO_3$ với dịch chiết vỏ *Hylocereus costaricensis* tạo lượng nano bạc nhiều nhất là 4:1, giá trị mật độ quang là $A_{max} = 0.559$ tại bước sóng $\lambda=415$ nm. Tỷ lệ dịch chiết vỏ *Hylocereus costaricensis*/dung dịch $AgNO_3$ giảm dần từ 4:1; 1:1 và 1:4, Tỷ lệ thuận với giá trị mật độ quang lần lượt là $A_{4:1}=0,559$, $A_{1:1}=0,453$, $A_{1:4}=0,13$ ở bước sóng $\lambda=415$ nm. Điều này được giải thích bởi khi giảm tỷ lệ thể tích dịch chiết, hàm lượng chất khử có trong dung dịch càng giảm. Do đó, lượng nano bạc được tạo ra càng ít, tỷ lệ thuận với giá trị mật độ quang ở bước sóng $\lambda=415$ nm. Tỷ lệ giữa dịch chiết và dung dịch $AgNO_3$ là 1:4 được lựa chọn cho các thử nghiệm sau:



Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ giữa dịch chiết/dung dịch $AgNO_3$ (1:4, 1:1, 4:1) đến khả năng tạo nano bạc

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tạo nano bạc

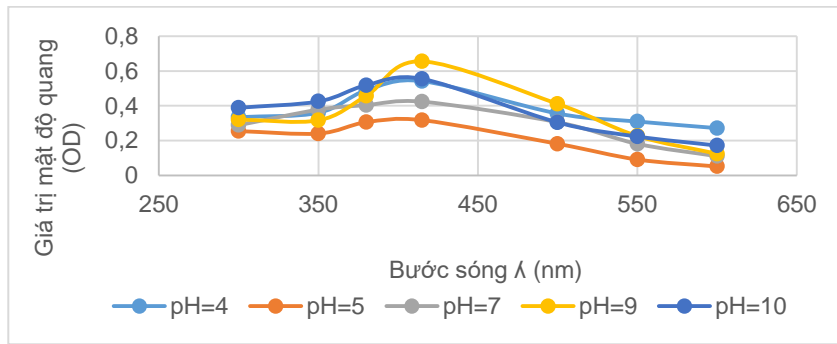
Nhiệt độ là một yếu tố ảnh hưởng lớn đến khả năng tạo nano bạc. Dải nhiệt độ được khảo sát bao gồm: 100°C; 80°C; 60°C; 40°C và nhiệt độ phòng. Hình 3 cho thấy, ở 100°C, lượng nano bạc được tạo ra nhiều nhất với giá trị mật độ quang là 1,238 ở bước sóng $\lambda=415$ nm. Ở nhiệt độ phòng dung dịch vỏ *Hylocereus costaricensis* không tạo ra nano bạc. Từ nhiệt độ 40°C đến 100°C, giá trị mật độ quang tăng dần, cho thấy có sự tạo thành hạt nano bạc, tuy nhiên ở 40°C và 60°C lượng hạt nano được tạo ra còn thấp khi đỉnh phổ ở bước sóng 415 nm chưa rõ nét. Nhiệt độ 100°C được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới khả năng tạo nano bạc

Ảnh hưởng của pH môi trường tới khả năng hình thành nano bạc

Giá trị pH môi trường ảnh hưởng lớn tới khả năng tạo nano bạc trong dung dịch. Các giá trị pH môi trường được khảo sát là 4, 5, 7, 9, 10. Ở Hình 4 cho thấy, khi môi trường có pH=9, lượng nano bạc được tạo ra nhiều nhất thể hiện ở giá trị quang phổ $A=0,655$ ở bước sóng $\lambda=415$ nm. Kết quả thu được cho thấy, môi trường acid (pH thấp) ức chế sự tạo thành của hạt nano bạc, môi trường bazơ (pH cao) tăng cường sự tạo thành của hạt nano bạc.

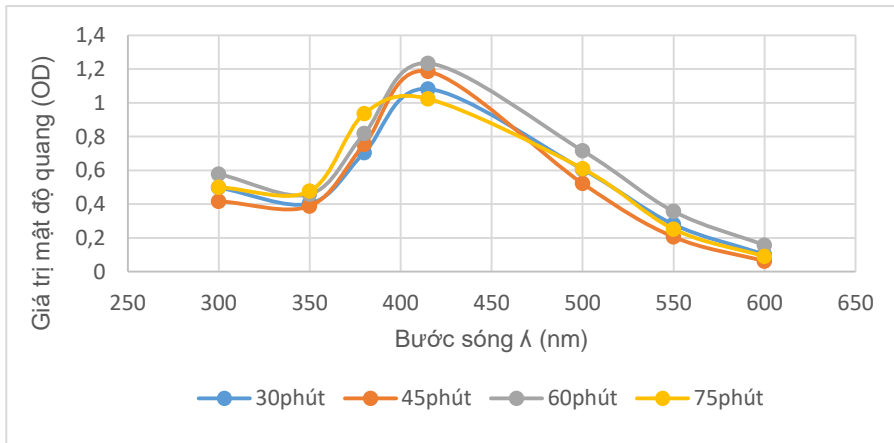


Hình 4. Ảnh hưởng của điều kiện pH lên khả năng tạo nano bạc

Dịch chiết được điều chỉnh pH=9 cho các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của thời gian tạo nano bạc

Thời gian tạo nano bạc được khảo sát sau 30, 45, 60, 75 phút phản ứng. Ở hình 5 cho thấy, nano bạc được tạo thành sau 30, 45, 60, 75 phút, và giá trị mật độ quang tương ứng lần lượt là 0,780; 0,698; 1,026, 0,923 tại bước sóng λ=415 nm. Thời gian để tạo nano bạc nhiều nhất là 60 phút với giá trị mật độ quang cao nhất ở bước sóng λ=415 nm. Thời gian tạo nano bạc ở 60 phút được lựa chọn để thực hiện thí nghiệm tạo nano bạc.



Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian tạo nano bạc

Khi thời gian tăng từ 60 phút đến 75 phút, giá trị mật độ quang giảm do lượng chất khử trong dịch chiết đã khử hết AgNO₃, lượng nano bạc tạo thành kết tụ lại với nhau làm giảm giá trị mật độ quang.

Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn

Bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch, kết quả cho thấy hạt nano bạc được tạo nên từ dịch chiết vỏ *Hylocereus costaricensis* có tác dụng ức chế hai chủng vi sinh vật gây bệnh *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus*. Dịch chiết từ vỏ *Hylocereus costaricensis* được sử dụng làm đối chứng âm không thể hiện hoạt tính kháng khuẩn, điều này chứng tỏ tác dụng kháng khuẩn là do nano bạc được tạo ra ức chế sự phát triển của vi khuẩn, không do thành phần của dịch chiết. Kích thước vòng kháng khuẩn đạt 5 – 9 mm (Bảng 1) ở các thể tích thử nghiệm 50, 25, 15 (μL).

Bảng 1. Kích thước vòng kháng khuẩn của dung dịch nano bạc

Nồng độ	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Đối chứng dương (Ampicillin)	8.7±2.22	23.0±2.0
Đối chứng âm	-	-
50 μL	9.0±2.0	8.0±0.67
25 μL	7.7±1.56	6.3±1.11
10 μL	6.7±1.56	5.0±0.67

Hạt nano bạc thể hiện hoạt tính kháng khuẩn với chủng vi khuẩn Gram âm *Escherichia coli* tốt hơn chủng vi khuẩn Gram dương *Staphylococcus aureus*. Điều này do sự khác nhau về thành tế bào của hai chủng vi khuẩn. Hạt nano bạc tích điện dương dễ dàng xâm nhập vào tế bào có ái lực với nhóm phosphate của acid teichoic và nhóm –COOH của acid glutamic trên thành tế bào vi khuẩn Gram âm (Jung *et al.*, 2008). Trong khi đó, thành tế bào vi khuẩn Gram dương dày hơn nên hạt nano bạc khó xâm nhập vào bên trong tế bào vi khuẩn.

KẾT LUẬN

Nano bạc được tổng hợp từ dịch chiết vỏ quả *Hylocereus costaricensis* (10 g vỏ/100 mL nước cất) với các điều kiện tối ưu tạo nano bạc bao gồm ở nhiệt độ 100°C, thời gian 60 phút, pH = 9, tỷ lệ dịch chiết và dung dịch AgNO₃ là 4:1. Dung dịch nano bạc được tạo ra từ dịch chiết vỏ *Hylocereus costaricensis* có kích thước trong khoảng 20 – 50 nm và có hoạt tính kháng khuẩn với hai chủng vi sinh vật *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus*. Tuy nhiên dung dịch nano bạc thể hiện hoạt tính mạnh hơn với chủng *Escherichia coli*, ở các nồng độ thử nghiệm khác nhau 50, 25, 15 (µL) với kích thước vòng kháng khuẩn trong khoảng từ 7 – 9 mm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ashraf JM, Ansari MA, Khan HM, Alzohairy MA, Choi I (2016). Green synthesis of silver nanoparticles and characterization of their inhibitory effects on AGEs formation using biophysical techniques. *Sci Rep*, 6:20414.
- Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*, 6(2): 71-79.
- Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F (2019). The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, 25(1):112.
- Ge L, Li Q, Wang M, Ouyang J, Li X, Xing MM (2014). Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *Int J Nanomedicine*, 9:2399-2407.
- Hồ Thị Phương, Nguyễn Thị Lê Na, Nguyễn Trung Thành, Nguyễn Đình Thắng (2019). Nghiên cứu khả năng ứng dụng dịch chiết củ gừng (*Zingiber officinale* Rosc) để chế tạo nano bạc và đánh giá khả năng kháng khuẩn. *Tạp chí Đại học Quốc Gia Hà Nội*, 35(3):118-127.
- Jung WK, Koo HC, Kim KW, Shin S, Kim SH, Park YH (2008). Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 74(7):2171-2178.
- Klueh U, Wagner V, Kelly S, Johnson A, Bryers JD (2000). Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation. *J Biomed Mater Res*, 53(6):621-631.
- Raab C, Simko M, Fiedeler U, Nentwich M, Gzásó A (2011). Production of nanoparticles and nanomaterials. *NanoTrust Dossiers*, 1-4.
- Saenjum C, Pattananandecha T, Nakagawa K (2021). Antioxidative and Anti-Inflammatory Phytochemicals and Related Stable Paramagnetic Species in Different Parts of Dragon Fruit. *Molecules*, 26(12):3565.
- Yin IX, Zhang J, Zhao IS, Mei ML, Li Q, Chu CH (2020). The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *Int J Nanomedicine*, 15:2555-2562.

CREATION SILVER NANO PARTICLES FROM *Hylocereus costaricensis* FRUIT EXTRACT AND INVESTIGATING THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES SOLUTION

Nguyễn Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Lê Na*

Faculty of Biology, VNU University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam

SUMMARY

Nowadays, silver nanoparticles with high antibacterial properties are applied in many areas of life, such as medicine, pharmacy, and cosmeceuticals. Silver nanoparticles were synthesised in this work using plant extracts derived from dragonfruit peels. The conditions for creating silver nanoparticles were investigated, including the volume ratio of AgNO₃ solution/plant extract, temperature, pH, and time. The results showed that silver nanoparticles were most produced at a mass of dragonfruit peels/water of 0.1 g/1mL, a ratio of AgNO₃ solution to extract of 1/4, a temperature of 100 °C, a pH of 9, and a reaction time of 60 minutes. Analysis by SEM electron microscopy confirmed the formation of spherical, relatively uniform nanoparticles with sizes ranging from 20 to 50 nm. The antibacterial activity of silver nanoparticles solution was investigated on microbial strains *E. coli* and *Staphylococcus aureus* with antibacterial inhibition zone from 5 – 9 mm at test volumes of 50, 25, and 15 (μL). These results show that silver nanosolutions created from plant extracts can be applied to inhibit pathogenic microorganisms in the environment.

Keywords: Silver nanoparticle, nanotechnology, extraction, *Hylocereus costaricensis*, antibacterial activity.

* Author for Correspondence: Tel: 0396025889; Email: nguyenthilena.hus@gmail.com