

NGHIÊN CỨU TẠO HẠT NANO BẠC BẰNG CÔNG NGHỆ LÊN MEN CHŨNG VI KHUẨN *ACINETOBACTER NOSOCOMIALIS* CYS-V3 PHÂN LẬP TẠI VƯỜN QUỐC GIA CHUR YANG SIN

Đỗ Văn Chung¹, Phan Tứ Quý³, Hồ Nhật Được², Nguyễn Thị Huyền², Nguyễn Văn Bốn^{2*}

¹Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên

²Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên, Đắk Lắk, Việt Nam

³Bộ môn Hóa, Trường Đại học Tây Nguyên, Đắk Lắk, Việt Nam

TÓM TẮT

Công nghệ tạo nano xanh là một phương pháp đơn giản, dễ thực hiện và dễ tái tạo, cung cấp các hạt nano có đặc tính ổn định và phân tán tốt trong dung dịch nước. Các hạt nano bạc có thể được tổng hợp hiệu quả bởi vi sinh vật. Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn nhằm sinh tổng hợp nano bạc bằng công nghệ lên men. Trong số 15 chủng vi sinh vật phân lập từ vườn Quốc gia Chư Yang Sin, chủng vi khuẩn CYS-V3 được phát hiện và tuyển chọn là chủng tiềm năng có khả năng sinh tổng hợp nano bạc. Dựa trên phương pháp giải trình tự gen 16S, chủng này được định danh là *Acinetobacter nosocomialis* CYS-V3 với độ tương đồng 99,93%. Trong đó, khả năng sinh tổng hợp nano bạc từ loài vi khuẩn này là ghi nhận mới cho khoa học. Điều kiện tạo hạt nano thích hợp đã được xác định trong dung dịch AgNO₃ (nồng độ 2 mM) trộn với canh trường lên men (đã pha loãng 5%) với tỷ lệ 3:1 trong 35 giờ. Đặc tính hạt nano được xác định thông qua đo quang phổ UV-VIS, hình SEM, phổ XRD, phổ IR và thế Zeta. Kết quả cho thấy nano bạc tổng hợp được trong nghiên cứu này có dạng hình cầu, phổ hấp thụ trong khoảng 420 - 470 nm, vùng phân bố hạt nano từ 30 - 300 nm. Hạt nano bạc có độ bền cao với thế Zeta -58,1 mV.

Từ khóa: *Acinetobacter nosocomialis*, vi khuẩn bản địa, tổng hợp xanh, hạt nano bạc.

MỞ ĐẦU

Nhiều loài vi khuẩn đã được minh chứng giữ vai trò quan trọng trong việc xử lý các độc tố kim loại nhờ khả năng khử các ion kim loại. Trong đó, một số loài vi đã được ghi nhận có khả năng sinh tổng hợp nano bạc như *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus licheniformis* (Weisburg *et al.*, 1991). Tổng hợp nano bạc bằng phương pháp sinh học có nhiều ưu điểm so với các phương pháp vật lý và hóa học thông thường, như an toàn và không độc hại cho môi trường cũng như giảm tiêu thụ năng lượng và tài nguyên. Ngoài ra, tổng hợp nano bạc phương pháp sinh học có thêm ưu điểm là đơn giản, dễ tái tạo, tạo ra hạt nano có đặc tính ổn định và phân tán tốt trong dung dịch nước. Bạc có nhiều tính chất đặc trưng và hữu ích (Alexander, 2009) như tính kháng khuẩn (Eckhardt *et al.*, 2013), khả năng xúc tác (Dong *et al.*, 2015), do đó được quan tâm nghiên cứu và ứng dụng. Trong những năm gần đây, nhiều nhà khoa học trong và ngoài nước đã có nhiều công trình nghiên cứu và công bố về việc tổng hợp xanh các hạt nano bạc. Nano bạc (AgNPs) đã được nghiên cứu chuyên sâu nhờ các đặc tính vật lý và hóa học (quang, điện, nhiệt và sinh học) hữu ích trong nhiều lĩnh vực như y học, sức khỏe, thực phẩm và công nghiệp. Vì vậy, công nghệ nano là một trong những công cụ quan trọng bậc nhất của khoa học nông nghiệp hiện đại, trong đó công nghệ nano trong lĩnh vực nông nghiệp - thực phẩm được dự đoán trở thành một lực lượng dẫn dắt nền kinh tế toàn cầu (Solaki *et al.*, 2015).

Với những ưu điểm về tiềm năng ứng dụng, nên các vật liệu nano thu hút được sự quan tâm nghiên cứu nhằm sản xuất và ứng dụng. Trong những năm gần đây, ứng dụng công nghệ lên men trong sản xuất vật liệu nano đã có nhiều tác động tích cực trong lĩnh vực khoa học công nghệ và nông nghiệp toàn cầu (Dandapat *et al.*, 2022). Sản xuất vật liệu nano từ canh trường lên men của vi sinh vật là công nghệ hoàn toàn xanh, chi phí thấp, quy trình được kiểm soát chặt chẽ, và có thể mở rộng quy mô sản xuất công nghiệp, đáp ứng được cho nhu cầu ứng dụng thực tế.

Trên thế giới đã có các nghiên cứu ứng dụng công nghệ lên men vi sinh vật nhằm tổng hợp vật liệu nano (Siddiqi *et al.*, 2018). Tuy nhiên, hướng nghiên cứu này tại Việt Nam còn hạn chế. Với mục tiêu tổng hợp xanh và hiệu quả nano bạc bằng công nghệ lên men, chúng tôi tiến hành phân lập và sàng lọc chủng vi sinh vật có hoạt tính sinh tổng hợp nano bạc, tạo tiền đề cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo tại địa phương. Các hạt nano bạc được tổng hợp bằng cách sử dụng dung dịch nuôi cấy vi khuẩn và được đặc trưng bằng phân tích thông qua quang phổ UV-VIS, điện thế zeta, phân bố hạt, XRD và hình ảnh SEM và TEM.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP**Nguyên liệu**

Các chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp nano bạc được phân lập và tuyển chọn từ vườn Quốc gia Chư Yang Sin. Môi trường thương mại: NB (Nutrient Broth) của hãng Himedia, Ấn Độ với thành phần môi trường (Peptone 5,0 gam; Sodium chloride (NaCl) 5,0 gram; Meat extract B# (cao thịt) 1,5 gam; Yeast extract (cao nấm men) 1,5 gam; pH $7,4 \pm 0,2$ ở 25°C). Bạc nitrat (AgNO_3 , Sigma-Aldrich, độ tinh khiết 99,0%) là tiền chất để tổng hợp nano bạc, Agar (Robika Hải Long - Việt Nam). Glycerol (AR, GHTECH, Cas 56-81-5) của hãng GHTECH (JHD), tinh khiết 92,09%.

Phương pháp**Phương pháp thu mẫu và phân lập vi khuẩn**

Thời gian thu mẫu đất tại vườn quốc gia Chư Yang Sin là tháng 8 năm 2023. Mẫu được thu thập ở đa dạng các khu vực đất nguyên sinh, vị trí lấy mẫu được lấy nhiều điểm quanh các gốc cây rừng tự nhiên và được trộn thành 1 mẫu chung với khối lượng 1 kg đất/mẫu đất, độ sâu lấy mẫu từ 0 - 30 cm từ mặt đất xuống. Các mẫu sau khi lấy được ghi nhãn nơi thu, ngày thu. Mẫu được đem tới phòng thí nghiệm, tiến hành phân lập và làm thuần các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp Nano bạc phân lập được. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn được hấp khử trùng ở 121°C trong 30 phút. Cân 10 gam mẫu đất cho vào bình tam giác chứa 100 mL nước cất, khuấy đều trong hai phút. Sau đó pha loãng dung dịch ở nồng độ 10^{-8} và 10^{-9} dùng pipet Paster hút dịch từ ống đựng mẫu, nhỏ 1 - 2 giọt mẫu xuống đĩa thạch petri, dùng que gạt thủy tinh vô trùng dàn đều trên mặt thạch, úp lật đĩa để ở nhiệt độ 30°C , sau 24 giờ quan sát các khuẩn lạc đơn. Sau đó, cấy ria các khuẩn lạc đơn có màu sắc khác nhau lên các đĩa thạch petri nhiều lần để làm thuần mẫu. Tiến hành lưu mẫu trong ống nghiệm và eppendorf 1,5 mL với glycerol. Chuẩn bị 300 mL môi trường NB trong ba bình tam giác 250 mL sau khi hấp khử trùng, cấy vi khuẩn và nhân nuôi trong 5 ngày ở tốc độ lắc 150 vòng/phút. Sau đó ly tâm canh trường lên men của vi khuẩn ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong thời gian 15 phút. Lấy phần dịch nổi của canh trường lên men và bảo quản ở 5°C để tổng hợp nano bạc (Nguyễn Lân Dũng, 2003).

Phương pháp sàng lọc và định danh chủng vi khuẩn tiềm năng

Trong thử nghiệm này, khả năng sinh tổng hợp nano bạc của các chủng vi khuẩn được khảo sát đánh giá chỉ tiêu UV-VIS với phổ hấp thụ cực đại được phân tích trên phạm vi 200 - 800 nm, ở độ phân giải 1 nm và tốc độ quét 400 nm/phút. Các chủng vi khuẩn phân lập được nuôi cấy trong môi trường thương mại NB (Nutrient Broth) ở 30°C trong 5 ngày, thu phần dịch nổi canh trường lên men để tiến hành phản ứng tạo nano bạc. Quá trình nhân nuôi các chủng vi khuẩn, đo phổ UV-VIS được tiến hành tại Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, trường Đại học Tây Nguyên, 567 Lê Duẩn, phường Ea Tam, thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk. Dựa vào phổ UV-VIS đặc trưng của dung dịch nano bạc được dung dịch canh trường tạo ra các hạt nano được biết là thể hiện dải cộng hưởng plasmon bề mặt đặc trưng ở 420 - 440 nm có thể được đo bằng phổ UV-VIS (Hồ Đình Quang *et al.*, 2020). Hiệu chỉnh đường cơ sở của máy quang phổ được thực hiện bằng cách sử dụng mẫu trắng (nước cất). Phổ hấp thụ UV-VIS của tất cả các mẫu đã được ghi lại và dữ liệu số được vẽ và phân tích bằng Spekwin32.

Phương pháp định danh 16S rDNA của các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp nano bạc, được thực hiện tại Phòng thử nghiệm - Công ty TNHH DV và TM Nam Khoa - 793/58 Trần Xuân Soạn, phường Tân Hưng, quận 7, Thành phố Hồ Chí Minh.

Phương pháp xác định một số điều kiện thích hợp tạo hạt nano (nồng độ bạc nitrat, nồng độ pha loãng canh trường lên men và thời gian phản ứng)

Ảnh hưởng của tỉ lệ dung dịch vi khuẩn/dung dịch bạc nitrat: Dung dịch nuôi cấy vi khuẩn *Acinetobacter nosocomialis* được ly tâm ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong thời gian 15 phút. Canh trường lên men pha loãng ở nồng độ 5% với nước cất. Tiến hành cho phản ứng với dung dịch AgNO_3 2 mM, với các tỉ lệ dung dịch vi khuẩn/dung dịch bạc nitrat như sau: 1:1; 1:2; 1:3; 1:4 và 1:5 với thời gian phản ứng là 20 giờ.

Ảnh hưởng của nồng độ pha loãng độ pha loãng canh trường lên men đến phản ứng: Dung dịch nuôi cấy vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3 ở mật độ $18,2 \times 10^8$ CFU/mL ở 30°C , được ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong thời gian 15 phút. Lấy phần dịch nổi sau khi ly tâm, tiến hành pha loãng ở nồng độ 5%, 10%, 20% với nước cất tiến hành cho phản ứng với dung dịch AgNO_3 2 mM ở tỉ lệ 1:3 trong thời gian phản ứng là 20 giờ.

Ảnh hưởng của thời gian đến phản ứng: Dung dịch nuôi cấy vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3 ở mật độ $18,2 \times 10^8$ CFU/mL ở 30°C . Được pha loãng ở nồng độ 5% với nước cất tiến hành cho phản ứng với dung dịch AgNO_3 2 mM ở tỉ lệ 1:3 trong thời gian 03, 25, 35 và 50 giờ.

Phương pháp xác định đặc tính hạt nano

SEM: Hình thái và cấu trúc bề mặt của các hạt nano được đánh giá bằng kính hiển vi điện tử quét để bàn (Phenom Pro Desktop SEM), độ phóng đại quang học ánh sáng 20 - 134 X, phóng đại quang học điện tử 160 - 350.000 X, độ phân giải ≤ 6 nm SED và ≤ 8 nm BSD, điện áp gia tốc chế độ nâng cao với phạm vi điều chỉnh

giữa chế độ hình ảnh 4,8 kV và 20,5 kV được thực hiện tại Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, trường Đại học Tây Nguyên, 567 Lê Duẩn, phường Ea Tam, thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk.

Phân bố hạt (SIZE): Phân bố kích thước hạt nano được xác định bằng thiết bị đo SZ-100 (Hãng HORIBA) được thực hiện tại Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên, 567 Lê Duẩn, phường Ea Tam, thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk.

Điện thế Zeta: Được xác định bằng thiết bị đo SZ-100 (Hãng HORIBA). Tại Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên, 567 Lê Duẩn, phường Ea Tam, thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk

Phân tích (XRD): Mẫu được phân tích XRD trên thiết bị D8 Advance Eco (Bruker, Đức) với điện áp 40 kV, cường độ dòng điện 25 mA, sử dụng bước sóng Cu K alpha 0,154 nm được thực hiện tại Bộ môn hóa, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, Phường 4, Quận 5, Thành phố Hồ Chí Minh.

Quang phổ (IR): Nguồn gốc JASCO, hệ thống dữ liệu, vị trí 1033, độ phân giải deltax 0,964233, xunits 1/cm, yunits truyền firstx 399,1927, lastx 4000,6047, npoints 3736, firstly 82,14559, maxy 99,52848, miny 81,67912 được tiến hành tại Bộ môn hóa, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, Phường 4, Quận 5, Thành phố Hồ Chí Minh.

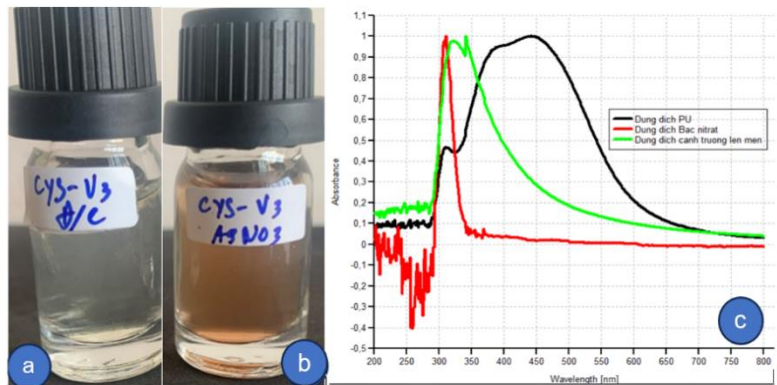
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập tuyển chọn và định danh chủng vi khuẩn có tiềm năng sinh tổng hợp nano bạc

Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có tiềm năng tổng hợp nano bạc. Từ các mẫu đất thu thập tại vườn Quốc gia Chư Yang Sin, 15 chủng vi khuẩn đã được phân lập. Trong đó, canh trường lên men của chủng CYS-V3 cho tín hiệu tổng hợp nano bạc rõ ràng nhất (Hình 1) được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo. Để tổng hợp xanh nano bạc (AgNPs), 2 mL dịch nuôi cấy các vi khuẩn bằng môi trường NA ở nồng độ pha loãng 20 lần, thêm 2 mL AgNO₃ 2 mM (lắc đều trong 10 giây, ở nhiệt độ phòng). Do đó, khối lượng bạc được sử dụng là 0,034 g tương ứng với 0,315 milimol bạc ban đầu.

Kết quả thí nghiệm sau 25 giờ chủng vi khuẩn CYS-V3 có khả năng sinh tổng hợp nano bạc thông qua sự thay đổi màu sắc của dung dịch từ màu trắng đục sang màu nâu (Hình 1 a và b) và dải cộng hưởng plasmon bề mặt thông qua đo phổ UV-VIS (Hình 1 c).

Cường độ màu thu được từ canh trường lên men phản ứng với bạc nitrat với tỉ lệ phối 1:3. Các hạt nano bạc được biết là thể hiện một dải cộng hưởng plasmon bề mặt đặc trưng ở ~ 436 nm được đo bằng phổ UV-VIS đối với các hạt nano bạc (Ajith et al., 2019). Trong phổ UV-VIS (Hình 1 c) một đỉnh rộng, mạnh, nằm giữa 420 nm và 470 nm, đã được quan sát thấy đối với các hạt nano bạc được chuẩn bị bằng cách sử dụng dịch nuôi cấy. Kết quả nghiên cứu này, tương đồng với kết quả nghiên cứu của Kalishwaralal Kalimuthu và CS về khả năng sinh tổng hợp nano bạc của chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* được công bố năm 2008 (Kalimuthu et al., 2008).



Hình 1. Tổng hợp nano bạc từ canh trường lên men của chủng vi khuẩn CYS-V3; Trong đó: (a) Canh trường lên men; b) Phổ UV-VIS của bạc nitrat; c) Phổ UV-VIS của dung dịch nano bạc

Chủng vi khuẩn CYS-V3 được định danh 16S, bằng phương pháp giải trình tự Nucleotic. Sau khi tách chiết ADN, tiến hành PCR gen 16S. Trình tự 16S rRNA được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu phân loại vi khuẩn do 16S rRNA ở vi khuẩn có mức độ biến đổi cao giữa các loài gần gũi (Weisburg et al., 1991). Các mẫu PCR dương tính được tinh sạch và đọc trình tự bằng bộ kit Bigdye 3.1. Trình tự của chủng vi khuẩn CYS-V3 được so sánh với trình tự gen có sẵn trên ngân hàng gen (NCBI); xác định được chủng vi khuẩn CYS-V3 là *Acinetobacter nosocomialis*, với độ tương đồng 99,93% (Bảng 1).

Bảng 1. Kết quả định danh bằng sinh học phân tử chủng vi khuẩn có khả năng tạo hạt nano bạc

Ký hiệu mẫu	Kết quả định danh	Độ tương đồng	Địa điểm thu mẫu	Mẫu
CYS-V3	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99,93%	Chư Yang Sin, xã Yang Tao, huyện Lắk, tỉnh Đắk Lắk	Đất

Trình tự gen 16S của chủng vi khuẩn *Acinetobacter nosocomialis* CYS-V3:

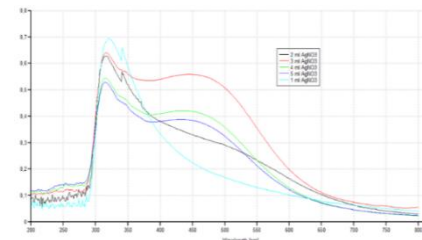
```

CCCCAGTCATCGGCCACACCGTGGTAACCGCCCTCTTGCAGTTAGGCTAGCTACTTCTGGTGAACAAA
CTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATTCTGATCCGCG
ATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGATCGGCTTTTTGAG
ATTAGCATCACATCGCTGTGTAGCAACCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTA
AGGGCCATGATGACTTGACGCTCGTCCCCGCCTTCCCTCCAGTTTGTCACTGGCAGTATCCTTAAAGTTCCC
GACATTACTCGTGGCAAATAAGGAAAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAACCCAACATCTCACGACA
CGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTATGTAAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAGTT
CTTACTATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTG
CGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAGTCTTGCAGCCGTAATCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTT
AGCTGCGCCACTAAAGCCTCAAAGGCCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGG
TATCTAATCCTGTTTGTCTCCCATGCTTTTCGCACCTCAGCGTCAGTGTTAGGCCAGATGGCTGCCTTCGC
CATCGGTAATTCCTCCAGATCTCTACGCAATTCACCGCTACACCTGGAATTCTACCATCCTCTCCCACACTC
TAGTAACCGATTCGAATGCAATTCCTCAAGTTAAGCTCGGGGATTTACATTTGACTTAATTAGCCGCT
ACGCGCGCTTTACGCCAGTAAATCCGATTAAGCTTGCACCCCTCTGTATTACCGCGGTGCTGGCACAG
AGTTAGCCGGTGCTTATTCTGCGAGTAACGTCCACTATCTCTAGGTATTATCTAAAGTAGCCTCCTCCTCG
CTTAAAGTGCTTTACAACCATAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCATT
GTCCAATATTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCGGATCA
TCTCTCAGACCCGCTACAGATCGTCGCTTGGTAGGCCTTTACCCACCAACTAGCTAATCCGACTTAG
GCTCATCTATTAGCGCAAGGTCCGAAGATCCCCTGCTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCATCC
CTTTCGAGATGTTGCCCCACTAATAGGCAGATTCCTAAGCATTACTACCCGTCGCGCGCTAGGTCCG
GTAGCAAGCTACCTTCCCCCGCT
    
```

A. nosocomialis là một vi khuẩn gram âm, hiếu khí. Cho đến thời điểm hiện tại chưa có bất kể một nghiên cứu nào ở trong nước và quốc tế công bố về khả năng sinh tổng hợp nano bạc. Như vậy, việc phân lập và tuyển chọn đã phát hiện chức năng mới của vi khuẩn *A. nosocomialis* có khả năng tạo ra các hạt AgNPs.

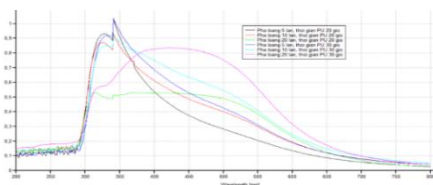
Điều kiện thích hợp tạo nano bạc từ canh trường lên men

Ảnh hưởng của tỉ lệ dung môi canh trường/dung dịch bạc nitrat: Ảnh hưởng tỷ lệ phối trộn đến quá trình tổng hợp AgNPs được thể hiện trên (Hình 2) trong đó phổ hấp thụ 325 nm là của gốc Fe³⁺, bước sóng từ 400 - 470 nm phổ hấp thụ của AgNPs. Phổ UV-VIS thể hiện đỉnh cao nhất ở nồng độ AgNO₃ là ở tỉ lệ 1 mL dung dịch vi khuẩn với 3 mL dung dịch AgNO₃ 2 mM, cho thấy điều kiện tổng hợp tối ưu. Điều này có thể được quy cho sự tạo mầm của NPs. Khi nồng độ muối Ag tăng lên, một phần ion Ag⁺ bị khử thành nguyên tử Ag⁰, các nguyên tử Ag này đóng vai trò là trung tâm tạo mầm, tạo điều kiện cho quá trình khử các ion Ag⁺ còn lại và tạo ra nhiều AgNPs hơn, do đó làm tăng độ hấp thụ. Ở các tỷ lệ phối trộn giữa dung dịch vi khuẩn khác đều cho thấy các đỉnh của phổ UV-VIS đều thấp hơn so với tỷ lệ 1:3. Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng hiệu ứng tổng hợp và sự cạnh tranh giữa các NPs góp phần làm thay đổi dải SPR, không phụ thuộc vào sự gia tăng nồng độ Ag⁺. Ngoài ra, việc xử lý ở các tỷ lệ 1:4 và 1:5 dẫn đến sự kết tụ các NPs do tần số va chạm của các ion Ag⁺ tăng lên. Vì vậy, trong số các tỷ lệ phối trộn giữa dung dịch vi khuẩn và dung dịch bạc nitrat, được thử nghiệm trong nghiên cứu này là tỷ lệ 1:3 (1 mL dung dịch vi khuẩn 3 mL dung dịch bạc nitrat) với dung dịch AgNO₃ 2 mM là tỷ lệ phù hợp nhất để tổng hợp AgNPs.



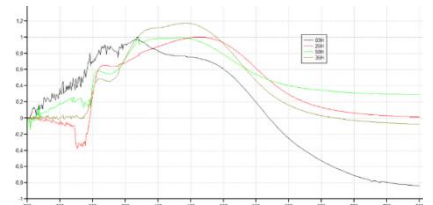
Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi canh trường/dung dịch bạc nitrat

Ảnh hưởng của nồng độ pha loãng canh trường lên men: Nồng độ pha loãng canh trường lên men khác nhau đến quá trình tổng hợp AgNPs được thể hiện trên (Hình 3). Phổ UV-VIS thể hiện đỉnh cao nhất ở độ pha loãng với tỷ lệ 1/20 (1 mL dung dịch nuôi cấy pha với 19 mL H₂O cất) cho thấy điều kiện tổng hợp tối ưu. Ở các tỷ lệ pha loãng 1:5; 1:10 dung dịch vi khuẩn khác đều cho thấy các đỉnh của phổ UV-VIS đều thấp hơn so với tỷ lệ 1:20. Vì vậy, trong số các tỷ lệ pha loãng canh trường lên men được thử nghiệm trong nghiên cứu ở 1:20 là phù hợp nhất để tổng hợp AgNPs.



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ pha loãng của canh trường lên men

Ảnh hưởng thời gian phản ứng: Thời gian phản ứng được khảo sát trong điều kiện: lượng dịch chiết của canh trường lên men trong thời gian 5 ngày, dịch nuôi cấy được li tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút, trong 15 phút, sau đó được pha loãng ở tỷ lệ 1:20 phản ứng với dung dịch AgNO₃ 2 mM, ở tỷ lệ phản ứng 1:3 (1 mL dung dịch canh trường, 3 mL dung dịch AgNO₃ 2 mM) trong 03, 25, 35 và



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến quá trình tạo nano Ag

50 giờ. Kết quả được thể hiện tại (Hình 4) các hạt nano Ag đã hình thành có các đỉnh hấp thụ trong khoảng bước sóng 421 - 450 nm. Có thể nhận thấy, cường độ hấp thụ có xu hướng tăng theo thời gian phản ứng, tương ứng với nồng độ nano bạc tăng lên. Tuy nhiên, ở 35 giờ phản ứng có đỉnh hấp thụ cao nhất, khi kéo dài thời gian phản ứng đến 50 giờ thì mật độ quang lại có xu hướng giảm. Điều này chứng tỏ khi thời gian phản ứng tăng thì có sự hình thành keo tụ song song với sự hình thành nano Ag làm cho đỉnh hấp thụ cực đại giảm xuống. Ở (Hình 4) cho thấy sau 35 giờ phản ứng tạo nano bạc từ canh trường lên men ở tỷ lệ pha loãng 20 lần là thích hợp.

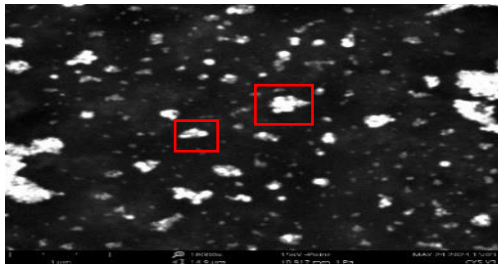
Một số tính chất đặc trưng của nano bạc (AgNPs)

Ảnh SEM: Các hình ảnh SEM ban đầu cho thấy, hình thái bề mặt và thành phần nguyên tố của AgNP được sinh tổng hợp từ chủng vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3. Kết quả cho thấy các AgNPs hình cầu sắp xếp thành từng cụm do sự kết tụ của các hạt nhỏ hơn sau khi ly tâm tốc độ cao trong quá trình chuẩn bị mẫu. Sự kết tụ nhẹ của các hạt nano dựa trên kim loại đã được quan sát thấy trên ảnh SEM (Hình 5) (Rajivgandhi *et al.*, 2021).

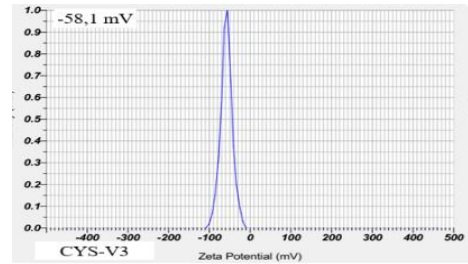
Phân bố hạt: Kích thước hạt nano bạc tạo ra càng nhỏ làm tăng diện tích tiếp xúc bề mặt, đặc biệt quan trọng trong quá trình diệt khuẩn, nấm và sâu bệnh hại. Tại (Hình 7) kích thước hạt nano bạc được phân bố từ 28 nm ~ 120 nm.

Điện thế zeta: Trong hệ sản phẩm dạng lỏng, thế zeta thường được sử dụng như là một ngưỡng để đánh giá cho sự ổn định. Điện thế zeta thể hiện mức độ đẩy giữa các hạt tích điện cùng dấu gần nhau trong hệ phân tán. Đối với các phân tử và các hạt đủ nhỏ, thế zeta cao (âm hoặc dương) sẽ cho độ ổn định cao, hệ phân tán sẽ chống lại sự keo tụ, kết đám. Tại thời điểm 72 giờ (Hình 6) sau phản ứng tạo hạt nano bạc, điện thế zeta là -58,1 mV. Như vậy, với kết quả đo được điện thế zeta khá tốt ưu, theo một số nghiên cứu được công bố thế zeta của nano bạc âm hoặc dương từ 25 - 26 mV đã cho thấy độ ổn định cao, hệ phân tán sẽ chống lại sự keo tụ, kết đám (Hồ Đình Quang *et al.*, 2020).

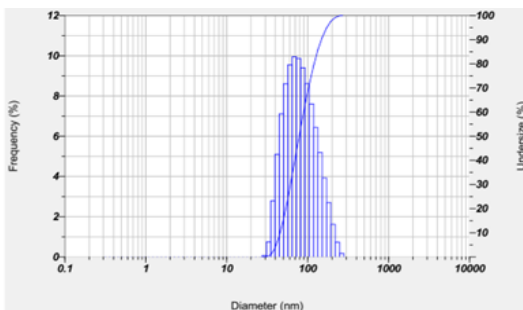
Cấu trúc và vi cấu trúc của nano bạc (XRD): Giản đồ XRD của nano bạc tạo thành ở điều kiện tối ưu được trình bày trên (Hình 8). Kết quả từ giản đồ XRD cho thấy có xuất hiện các giá trị góc nhiễu xạ 2θ là 27,81°; 32,16°; 38,12°; 46,21°; 54,83° và 57,39° tương ứng với các mặt (210), (122), (111), (231), (142) và (241) của cấu trúc lập phương tâm mặt trùng khớp với phổ chuẩn của Ag (JCPDS, file No. 04-0783). Kết quả này chứng tỏ các hạt nano bạc tạo ra trong nghiên cứu này có cấu trúc tinh thể.



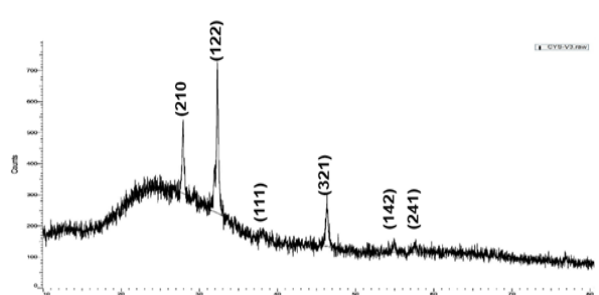
Hình 5. Ảnh của nano Ag qua kính hiển vi điện tử quét (SEM)



Hình 6. Điện thế zeta tại 72 giờ phản ứng

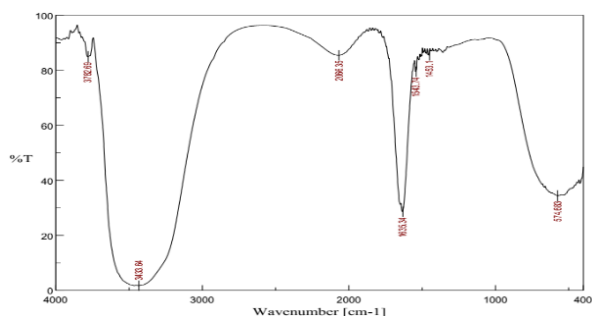


Hình 7. Phân bố hạt nano bạc

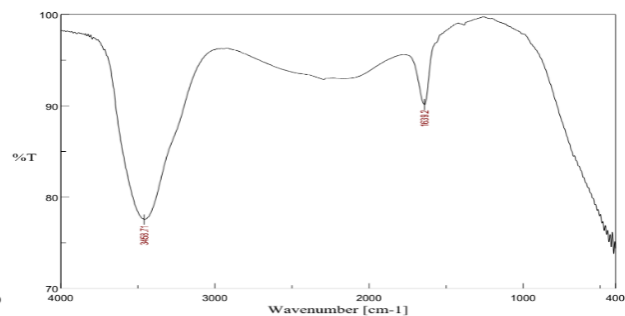


Hình 8. Giản đồ nhiễu xạ của nano Ag

Phổ hồng ngoại (IR): của nano bạc tạo thành ở điều kiện tối ưu được trình bày trên (Hình 9 và 10). Kết quả từ phổ IR của dịch canh trường ở (Hình 9) cho thấy có xuất hiện các peak đặc trưng của các nhóm -NH (3782,68 cm^{-1}), -OH (3433,64 cm^{-1}), -CH (2065,35 cm^{-1}), -CO (1635,34 cm^{-1} ; 1543,74 cm^{-1} và 1453,1 cm^{-1}). Tuy nhiên, phổ IR dung dịch nano bạc tại (Hình 10) chỉ xuất hiện các giải hấp thụ của các nhóm chức -OH (3463,71 cm^{-1}) còn lại một ít nhóm chức -CO (1635,2 cm^{-1}), kết quả này chứng tỏ các gốc bị mất đã tham gia phản ứng với bạc nitrat tạo ra các hạt nano bạc ở nghiên cứu này (Huang *et al.*, 2007).



Hình 9. Phổ hồng ngoại của canh trường lên men của vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3



Hình 10. Phổ hồng ngoại của nano Ag tạo ra từ chủng vi khuẩn *A. nosocomialis* CYS-V3

KẾT LUẬN

Từ các mẫu đất thu thập tại vườn Quốc gia Chư Yang Sin, 15 chủng vi sinh vật đã được phân lập. Trong đó, tuyển chọn được chủng vi khuẩn CYS-V3 có tiềm năng sinh tổng hợp nano bạc. Chủng này được định danh là *Acinetobacter nosocomialis* CYS-V3 theo phương pháp sinh học phân tử. Điều kiện tạo nano bạc thích hợp đã được nghiên cứu và đặc tính của hạt nano bạc được xác định thông qua phân tích quang phổ UV-VIS, hình SEM, TEM, thế zeta, XRD và IR. Kết quả phân tích cho thấy nano bạc tổng hợp được trong nghiên cứu này có dạng hình cầu, phổ UV-VIS hấp thụ trong khoảng 420 - 470 nm, vùng phân bố hạt nano từ 28 ~ 120 nm, có độ bền cao với thế Zeta -58,1 mV.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alexander JW (2009). History of the medical use of silver. *Surgical infections*. 10:289-292.
- Ajith P, Murali AS, Sreehari H, Vinod BS, Anil A, Smitha CS. Green synthesis of silver nanoparticles using *Calotropis gigantea* extract and its applications in antimicrobial and larvicidal activity. *Mater Today Proc*. 2019;18:4987-91. doi: 10.1016/j.matpr.2019.07.491.
- Eckhardt S, Brunetto PS, Gagnon J, Priebe M, Giese B, Fromm KM (2013). Nanobio silver: its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine. *Chemical reviews*. 113, 4708-4754.
- Dong XY, Gao ZW, Yang KF, Zhang WQ, Xu LW (2015). Nanosilver as a new generation of silver catalysts in organic transformations for efficient synthesis of fine chemicals. *Catalysis Science & Technology*. 5, 2554-2574.
- Nguyễn Lâm Dũng (2003). *Vi sinh vật học*, NXB Giáo dục. 517 tr.
- Kalimuthu K, Babu RS, Venkataraman D, Bilal M, Gurunathan S (2008). Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65, 150-153.
- Hồ Đình Quang, Chu Thị Thùy Dung, Nguyễn Thị Quỳnh Giang, Nguyễn Hoa Du, Lê Thế Tâm (2020). "Nghiên cứu chế tạo nano bạc - chitosan theo phương pháp bọc in-situ định hướng làm chế phẩm phòng bệnh trên cây trồng", *Tạp chí khoa học*, Tập 49 - Số A/2020, tr. 51-59.
- Solanki P, Bhargava A, Chhipa H, Jain N, and Panwar J (2015). Nano-fertilizers and Their Smart Delivery System. (*Chapter 4*), in *Nanotechnologies in Food and Agriculture*, 81-101.
- Huang J, Li Q, Sun D, Lu Y, Su Y, Yang X, Wang H, Wang Y, Shao W, He N, Hong J and Chen C (2007). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology* 18 105104.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, Vol. 173, no. 2, pp. 697-703.
- Dandapat S, Kumar M, Ranjan R, Sinha MP (2022). *Ganoderma applanatum* extract mediated synthesis of silver nanoparticles. *Braz. J. Pharm. Sci.* 58, e19173. doi.org/10.1590/s2175-97902022e19173.
- Rajivgandhi GN, Ramachandran G, Kanisha CC, Alharbi NS, Kadaikunnan S, Khaled JM, Alanzi KF, Li WJ (2021). Effect of Ti and Cu doping on the structural, optical, morphological and anti-bacterial properties of nickel ferrite nanoparticles. *Results Phys*. 23:104065. doi: 10.1016/j.rinp.2021.104065.
- Siddiqi KS, Husen A, Rao RAK (2018). A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J Nanobiotechnol*. 16, 14 https://doi.org/10.1186/s12951-018-0334-5.

BIOSYNTHESIS OF SILVER NANO PARTICLES VIA FERMENTATION TECHNOLOGY USING *ACINETOBACTER NOSOCOMIALIS* CYS-V3–A BACTERIAL STRAIN ISOLATED AT CHU YANG SINH NATIONAL PARK

Do Van Chung¹, Phan Tu Quy³, Ho Nhat Duoc², Nguyen Thi Huyen², Nguyen Van Bon^{2*}

¹Western Highlands Agriculture and Forestry science Institute (WASI)

²Institute of Biotechnology and Environment, Tay Nguyen University, Dak Lak, Vietnam

³Department of Chemistry, Tay Nguyen University, Dak Lak, Vietnam

SUMMARY

Green nanotechnology is a simple, easy-to-implement, and reproducible method that provides nanoparticles with stable properties and good dispersion in aqueous solutions. Silver nanoparticles can be effectively synthesized by microorganisms. The goal of this study is to isolate and select bacterial strains to biosynthesize silver nanoparticles using fermentation technology. Among 15 microbial strains isolated from Chu Yang Sinh National Park, bacterial strain CYS-V3 was discovered and selected as a potential strain capable of biosynthesizing silver nanoparticles. Based on the 16S gene sequencing method, this strain was identified as *Acinetobacte nosocomialis* CYS-V3 with 99,93% similarity. In particular, the ability to biosynthesize nanosilver from this bacterium is a new record. Appropriate nanoparticle creation conditions were determined in terms of AgNO₃ solution (concentration 2 mM) mixed with fermentation broth (diluted 5%) at a ratio of 3:1 and the reaction time was 35 hours. Nanoparticle properties were determined through UV-VIS spectroscopy, SEM, XRD spectrum, IR spectrum and Zeta potential. The results show that the silver nanoparticles synthesized in this study have a spherical shape, the absorption UV-VIS spectrum is 420 - 470 nm, and the nanoparticle distribution area is from 28 ~ 120 nm, have high stability with a Zeta potential -58.1 mV.

Keywords: *Acinetobacter nosocomialis*, Indigenous bacteria, green synthesis; silver nanoparticles.

* Author for correspondence: Tel: 0842458283 Email: nvbon@ttn.edu.vn