

HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA NANO LƯỠNG KIM BẠC – VÀNG TRÊN NỀN DEXTRAN

Phan Hà Nữ Diễm¹
Tôn Nữ Mỹ Phương²
Trần Thái Hòa²

TÓM TẮT

Kim loại quý ở kích thước nano được coi là chất kháng vi sinh vật tiềm năng vì hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm cũng như khả năng tương thích sinh học của chúng rất tốt. Ở bài báo này, chúng tôi đề cập quy trình tổng hợp nano lưỡng kim Ag–Au trên nền dextran tương đối đơn giản và nhanh. Các hạt nano kim loại quý thu được trong quá trình tổng hợp có dạng hình cầu và phân tán tốt trong dextran. Sản phẩm của quá trình tổng hợp được thử nghiệm khả năng kháng khuẩn và kháng nấm đối với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) và nấm *Magnaporthe grisea* (*M. grisea*). Khi hạt nano lưỡng kim có hàm lượng bạc càng cao thì thể hiện khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn và nấm càng tốt.

Từ khóa: Lưỡng kim bạc – vàng nano hình cầu, kháng vi sinh vật, vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), nấm *Magnaporthe grisea* (*M. grisea*)

1. Giới thiệu

Ở dạng khối, vàng là một kim loại quý, trơ về mặt hóa học nhưng là một trong những chất dẫn điện tốt, nhờ đặc tính này mà vàng được sử dụng trong suốt chiều dài lịch sử nhân loại như trang sức, dùng trong nha khoa, điện tử. Tuy nhiên, ở kích thước nano, vàng đã thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học bởi chúng được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như: xúc tác [1], cảm biến sinh - hóa [2, 3], điều trị ung thư và truyền thuốc [4, 5].

Từ thời xa xưa, bạc đã được coi là một chất diệt khuẩn hiệu quả [6]. Ngày nay, công nghệ nano đã tạo điều kiện thuận lợi cho việc tổng hợp Ag nano nhằm tăng tỷ lệ giữa diện tích bề mặt và thể tích. Người ta chấp nhận rằng, kích thước Ag nano càng nhỏ thì hoạt tính kháng khuẩn càng mạnh [7, 8] nhưng một vài công bố chỉ ra rằng các hạt nano Ag thể hiện hiệu quả độc tính trên tế bào của những động vật có vú [6].

Tuy Au có độc tính thấp và kháng sinh an toàn [9] nhưng chi phí cao và hoạt tính kháng khuẩn yếu [10]. Nhằm cải thiện hoạt tính kháng khuẩn của các hạt nano Au cũng như giảm độc tính của các hạt nano Ag, các nhà khoa học quan tâm đến nano lưỡng kim Ag–Au trong lĩnh vực y sinh. Vì hoạt tính kháng khuẩn của chúng có thể được điều chỉnh bởi thành phần hoặc cấu trúc của hạt nano, độ ổn định trong không khí và tính tương thích sinh học cao [11].

Dextran là polysaccharic gồm nhiều monome glucose kết hợp lại với nhau bằng các liên kết ưu tiên ở 1,6- α -D-glucopyranosyl. Hàng năm, trên thế giới đã sản xuất khoảng 500 tấn dextran [12]. Dextran dễ tan trong nước và là chất có độ ổn định rất tốt đối với các chất điện phân. Đặc biệt, có phạm vi sử dụng rộng trong thực phẩm, các lĩnh vực liên quan đến y tế, và các chức năng sinh học [13, 14]. Những ứng dụng trong lĩnh vực y – sinh học thì hạt

¹Trường Đại học Đồng Nai

Email: phannudiem@gmail.com

²Trường Đại học Khoa học – Đại học Huế

nano kim loại hòa tan trong dung môi nước là rất cần thiết [15].

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (Xoo) và *Magnaporthe grisea* – *M. grisea* (*Magnaporthe oryzae*) được biết đến như là tác nhân gây bệnh bạc lá và bệnh đạo ôn ở lúa [16, 17]. Ở bài báo này, chúng tôi tổng hợp hạt nano lưỡng kim Ag–Au, sử dụng dextran vừa là chất khử, vừa là chất bảo vệ và ứng dụng trong kháng nấm, kháng khuẩn *M. grisea* và Xoo.

2. Thực nghiệm

2.1. Hóa chất

Bạc sulfat (Ag_2SO_4 , Đức) và Hydrogen tetrachloroaurate trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Merck, Đức) được dùng như tiền chất của kim loại để tổng hợp nano lưỡng kim Ag–Au. Amoniac ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Merck, Đức) được dùng để tăng tốc độ phản ứng trong sự hình thành hạt Ag nano. Dextran ($M = 60.000\text{--}90.000$, Himedia, Ấn Độ) được dùng làm chất khử và chất ổn định nhằm ngăn chặn sự kết dính giữa các hạt nano. Agar (Việt Nam); Peptone (Hàn Quốc); Cao thịt (Hàn Quốc) được dùng làm môi trường nuôi cấy vi khuẩn, nấm.

2.2. Tổng hợp nano lưỡng kim Ag–Au sử dụng dextran làm chất khử và chất ổn định

Các chất được hòa tan riêng biệt bằng nước cất 2 lần ở nhiệt độ phòng. Nước cất 2 lần được dùng trong suốt quá trình thí nghiệm. Tất cả các dụng cụ thủy tinh được rửa bằng nước javen và rửa lại bằng nước cất. Tất cả các dụng cụ dùng để cấy khuẩn và nấm đều được khử trùng trong tủ cấy, đặt tia UV khoảng 15 phút. Sự tinh khiết của nước và các chất phản ứng cũng như độ sạch

của các dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh là những thông số quan trọng.

Quá trình tổng hợp nano Ag–Au dựa trên ý tưởng của tài liệu khoa học số [3] có cải biến.

Chuẩn bị dung dịch Ag_2SO_4 20 mM: Cân 3,118 gam Ag_2SO_4 ($M = 311,799$) hòa tan trong nước cất 2 lần, định mức đến 500 mL.

Chuẩn bị dung dịch $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]_2\text{SO}_4$ 1 mM: Lấy 5 mL dung dịch Ag_2SO_4 20 mM và 2 mL NH_3 5% pha trong nước cất 2 lần và định mức đến 100 mL.

Chuẩn bị dung dịch HAuCl_4 50 mM: Cân 0,98458 gam $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($M = 393,83$ đvC) pha trong nước cất 2 lần và định mức đến 50 mL thu được dung dịch HAuCl_4 50 mM.

Chuẩn bị dung dịch HAuCl_4 1 mM: Lấy 1 ml dung dịch HAuCl_4 50 mM pha trong nước cất 2 lần và định mức đến 50 mL.

Cho x mL dung dịch $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]_2\text{SO}_4$ 1 mM vào y mL dung dịch HAuCl_4 1mM, khuấy nhẹ, giữ ở nhiệt độ 90°C trong 15 phút. Sau đó, thêm 1 mL dextran 5% và 7 mL NH_3 5%. Dung dịch keo lưỡng kim Ag - Au nano. Dùng cồn 96° hòa tan, rồi li tâm, bỏ nước lọc, thu kết tủa, sấy ở 60°C được nano Ag – Au.

Để tổng hợp nano lưỡng kim Ag–Au, với dextran vừa là chất khử vừa là chất ổn định, chúng tôi dùng 10 mL hỗn hợp tiền chất theo quy trình ở mục 2.2. Ngoài tỷ lệ $x:y = 3:7$, $5:5$ và $7:3$ được kí hiệu bởi các mẫu tương ứng là S_3 , S_5 và S_7 . Chúng tôi còn dùng tỷ lệ $10:0$ và $0:10$ tương ứng với Ag và Au nano đơn kim loại.

2.3. Khả năng kháng khuẩn và kháng nấm của nano lưỡng kim Ag-Au

Ức chế sự phát triển của vi sinh vật bằng nano lưỡng kim Ag – Au trên nền dextran đã được tiến hành với khuẩn *Xoo* và nấm *M. grisea* [18]. Chúng tôi sử dụng những môi trường khác nhau, tương thích với từng loại để nuôi cấy. Đối với kháng khuẩn, chúng tôi sử dụng môi trường MB (Men B) và Wakimoto, với kháng nấm thì chúng tôi sử dụng môi trường thạch Dextrose khoai tây (PDA - Potato Dextrose Agar).

2.3.1. Thử nghiệm kháng khuẩn

Môi trường MB (Men B): Một hỗn hợp bao gồm 6g cao nấm men, 3g pepton, 4g cao thịt, 20g agar, được hòa tan trong nước cất để tạo 1L huyền phù. Sau đó, tiệt trùng bằng nồi hấp ở 125 °C trong 15 phút. Thu được môi trường dùng để nuôi cấy khuẩn *Xoo*.

Môi trường Wakimoto: Một hỗn hợp bao gồm dịch chiết từ 300g khoai tây, 5g peptone, 2g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 15g sacarozơ và 17g thạch, được khuấy trong nước cất để tạo thành 1L huyền phù. Sau đó, tiệt trùng bằng nồi hấp ở 125°C trong 15

phút. Thu được môi trường dùng để nuôi cấy khuẩn *Xoo*.

Cho 10mL môi trường MB hoặc Wakimoto vào đĩa petri và 0,1 mL dung dịch keo Ag – Au/dextran (ước tính, mật độ Ag –Au được sử dụng trong thử nghiệm này khoảng 6,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Tiếp theo, trải 1mL huyền phù *Xoo* vi khuẩn lên đĩa petri này. Sau đó, ủ ở 28°C cho 72 giờ. Trong đó, có một mẫu đối chứng, là mẫu duy nhất không chứa vật liệu nano.

2.3.2. Thử nghiệm kháng nấm

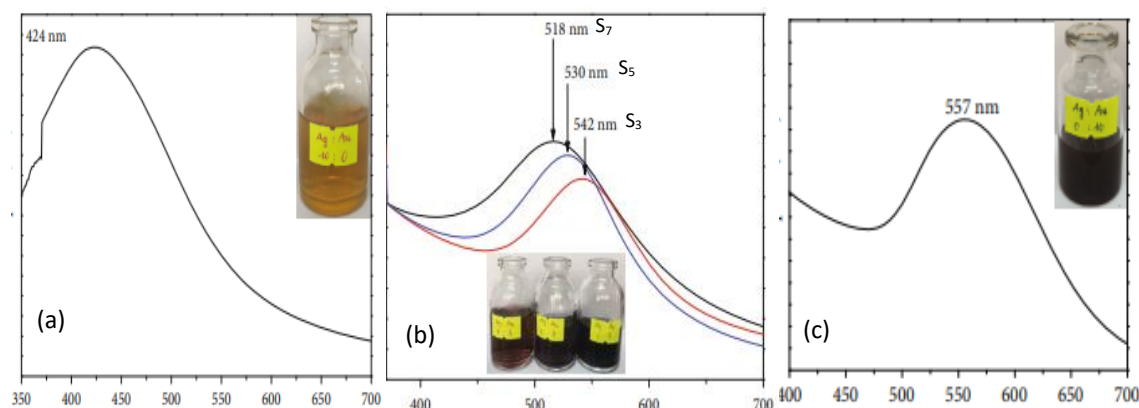
Một hỗn hợp bao gồm 20g khoai tây, 20g glucose, 20g agar, được khuấy trong nước cất để tạo thành 1L huyền phù. Sau đó, tiệt trùng bằng nồi hấp ở 125°C trong 15 phút. Thu được môi trường dùng để nuôi cấy khuẩn *Xoo*.

Lấy 10 mL môi trường PDA cho vào đĩa petri và 0,1 mL vật liệu nano. Tiếp theo, cấy 1mL *M. grisea* được vào đĩa petri.

Sau đó, ủ ở 28°C cho 72 giờ. Tạo một mẫu đối chứng, là mẫu không chứa vật liệu nano.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân tích phổ UV - Vis



Hình 1: Phổ UV – Vis của nano Ag/dextran (a); Các mẫu nano lưỡng kim Ag – Au/dextran của các mẫu S₃, S₅, S₇ (b) và nano Au/dextran (c)

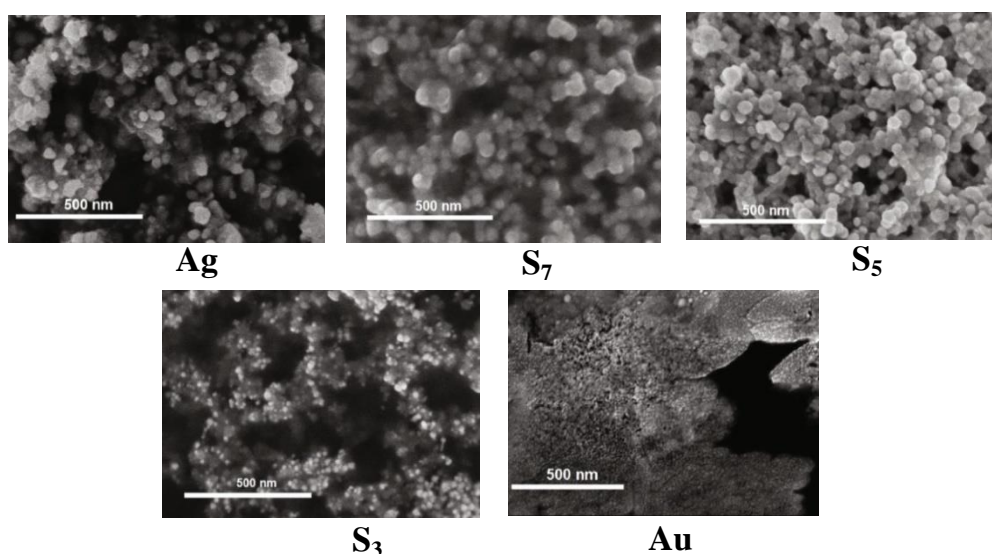
Từ phổ UV-Vis của Ag nano (hình 1a) cho thấy $\lambda_{\max} = 424$ nm, khi giảm dần nồng độ của $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]_2\text{SO}_4$, đồng thời tăng dần nồng độ của HAuCl_4 thì các pik cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) liên tiếp dịch chuyển đỏ, nghĩa là sang vùng có bước sóng lớn hơn, từ 442 nm đến 518, 530, 542 nm (hình 1b) và 557 nm (hình 1c). Kết quả này được chúng tôi giải thích như sau: pik hấp thụ của Ag nano hình cầu có bước sóng cực đại, $\lambda_{\max} = 395 - 450$ nm và Au nano hình cầu là 550 – 630 nm. Do đó, dung dịch keo của nano lưỡng kim Ag–Au thể hiện pik SPR có bước sóng cực đại $\lambda_{\max}(\text{Ag}) < \lambda_{\max}(\text{Ag-Au}) < \lambda_{\max}(\text{Au})$, phù hợp với các tài liệu [3, 6, 11].

3.2. Phân tích ảnh của vật liệu qua kỹ thuật hiển vi điện tử quét (SEM) và hiển vi điện tử truyền qua (TEM)

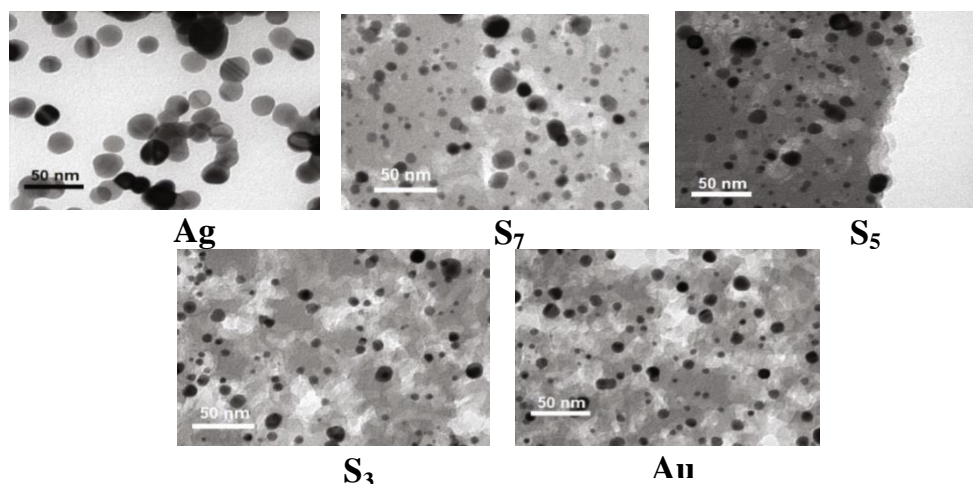
Từ những ảnh ghi nhận được bởi SEM (hình 2) và TEM (hình 3), cho

thấy vật liệu có dạng hình cầu và có độ phân tán cao trong dextran. Nano Ag/dextran, có kích thước từ 3 – 55 nm, kích thước trung bình $\sim 17,5$ nm. Trong khi đó, kích thước của các lưỡng kim Ag – Au/dextran giảm đáng kể, đường kính trung bình của ~ 5 nm (tương tự kích thước của các hạt nano Au/dextran).

Khi nồng độ của Ag càng tăng (S_7) thì hạt có kích thước càng lớn, đường kính từ 20 – 40 nm. Mẫu S_5 , kích thước hạt có giảm nhưng không đáng kể so với mẫu S_7 . Đối với S_3 , kích thước hạt từ 3 – 25 nm và có phân bố kích thước hạt hẹp. Kết quả này thể hiện khả năng phản ứng của hợp chất chứa Ag^+ cao hơn so với chất chứa Au^{3+} , giải thích này phù hợp với công bố của K. Sapkota và cộng sự [17].



Hình 2: Ảnh SEM của của vật liệu đơn và lưỡng kim Ag – Au

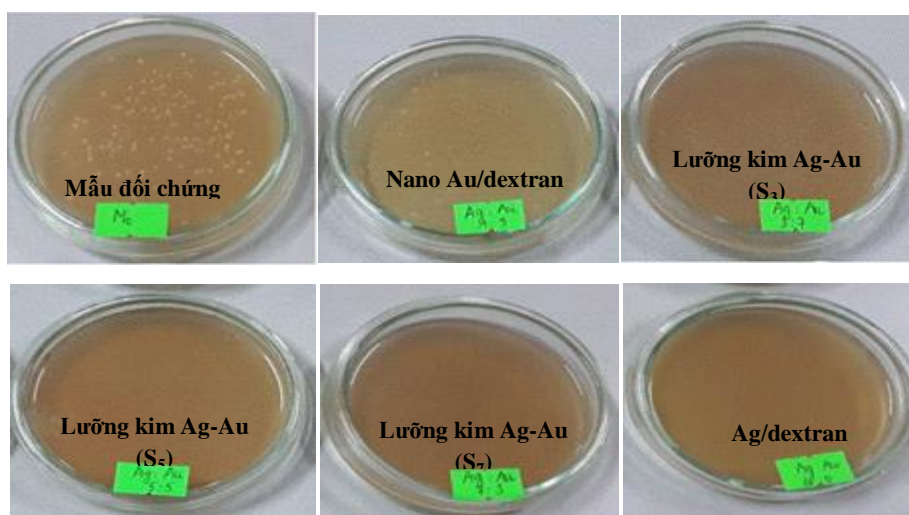


Hình 3: Ảnh TEM của của vật liệu đơn và lưỡng kim Ag – Au

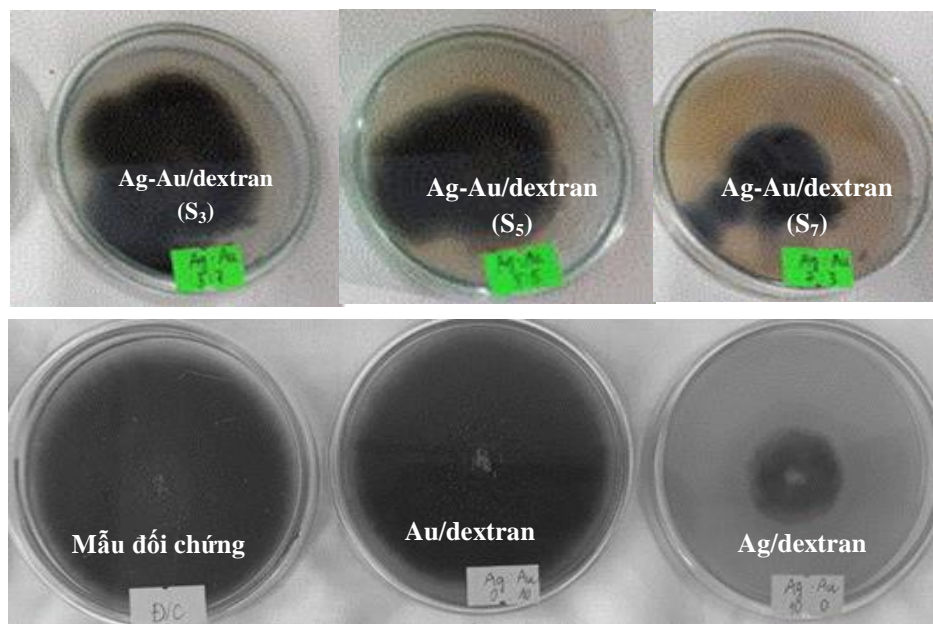
3.3. Thử nghiệm tính kháng khuẩn của nano lưỡng kim Ag – Au

Chúng tôi thử nghiệm khả năng kháng khuẩn, kháng nấm của các loại nano đơn và lưỡng kim loại Ag, Au và Ag – Au trên nền dextran. Ở đây, chúng tôi chọn hai loại vi sinh vật, đó là vi khuẩn *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* (*Xoo*) là loài gây bệnh bạc lá lúa và nấm *Magnaporthe grisea* (*M. grisea*, còn được gọi là *Magnaporthe oryzae*) là nguyên nhân gây bệnh đạo ôn ở lúa. Kết quả cho thấy, mẫu đối chứng và mẫu

chứa nano Au (ở đây, là lưỡng kim với tỷ lệ Ag: Au = 1:9) có vi khuẩn phát triển, làm cho môi trường MB bị vẩn đục (hình 4). Các mẫu còn lại, chứa nano Ag, S₇, S₅ và S₃ không còn vi khuẩn nghĩa là, vật liệu lưỡng kim có khả năng ức chế sự phát triển của *Xoo*. Vậy hàm lượng bạc càng cao, có thể kháng được khuẩn *Xoo* càng tốt. Phù hợp với nghiên cứu của X. Ding và cộng sự [16] và J. M. Vincent và cộng sự [18].



Hình 4: Kết quả kháng khuẩn của nano Ag, Au và Ag – Au



Hình 5: Kết quả kháng nấm của nano Ag, Au và Ag – Au

Hoạt tính kháng nấm của các nano Ag, Au và lưỡng kim Ag – Au trong dextran đã được kiểm tra bởi chủng *M. grisea*. Hình 5, biểu thị khả năng kháng nấm của nano Ag/dextran gây ức chế sự phát triển của *M. grisea*, đạt 69,72%. Tương tự, khả năng ức chế của các mẫu chứa S₇, S₅ và S₃ lần lượt là 38,6%, 31,1%, và 18,6%, trong khi hiệu suất ức chế của nano Au/dextran chỉ là 4,72%, cho thấy Au/dextran có hiệu quả thấp để kháng *M. grisea*.

Kết quả cho thấy rằng, vật liệu lưỡng kim có hàm lượng bạc càng cao (S₇, S₅) thì hoạt tính kháng khuẩn *Xoo*

và nấm *M. grisea* càng tốt. tốt hơn rất nhiều so với nano Au/dextran.

4. Kết luận

Nano lưỡng kim Ag-Au có dạng hình cầu được tạo thành do dextran vừa làm chất khử vừa làm chất bảo vệ có độ phân tán tốt và khả năng kháng khuẩn *Xoo* và nấm *M.gresia* cao. Khi hàm lượng của Ag trong lưỡng kim càng cao, khả năng kháng khuẩn càng tốt, trong khi nano Au đơn chất hầu như không có khả năng kháng khuẩn. Vì vậy, chúng tôi tin rằng các vật liệu nano tổng hợp của kim loại quý có thể là những kháng sinh có tiềm năng trong lĩnh vực sát trùng và dược phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ma T., Yang W., Liu S., Zhang H. and Liang F (2017), “A Comparison Reduction of 4-Nitrophenol by Gold Nanospheres and Gold Nanostars”, *Catalysts* 7 (38), pp. 1-10
2. Vigderman L., Bishnu P. K., Euger R. Z. (2012), “Functional Gold Nanorods: Synthesis, Self-assembly and Sensing Applications”, *Advanced Materials*, 24, pp. 4811-4841

3. Bankura K. P., Maitya D., Mollicka M. M. R., Mondala D., Bhowmick B., Roy I., Midyaa, Sarkar J., Rana D., Acharya K., Chattopadhyay D. (2014), “Antibacterial activity of Ag–Au alloy NPs and chemical sensor property of Au NPs synthesized by dextran”, *Carbohydrate Polymers*, 107, pp. 151–157
4. Cai W., Gao T., Hong H., Sun J. (2008), “Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology”, *Nanotechnology Science and Applications*, 1, pp. 17-32
5. Muddineti O. S., Ghosh B., and Biswas S., (2015), “Current trends in using polymer coated gold nanoparticles for cancer therapy”, *International Journal of Pharmaceutics*, 484 (1-2), pp. 252–267
6. Hien, N.Q., Van Phu, D., Duy, N.N., Quoc, L.A., Lan, N.T.K., Quy, H.T.D., Van, H.T.H., Diem, P.H.N. and Hoa, T.T. (2015), “Influence of Chitosan Binder on the Adhesion of Silver Nanoparticles on Cotton Fabric and Evaluation of Antibacterial Activity”, *Advances in Nanoparticles*, 4, 98-106
7. N. Yadav, A.K. Jaiswal, K.K. Dey, V.B. Yadav, G. Nath, A.K. Srivastava, R.R. Yadav (2018), “Trimetallic Au/Pt/Ag based nanofluid for enhanced antibacterial response”, *Mater. Chem. Phys.* 218, 10–17
8. Lu, Z., Rong, K., Li, J., Yang, H. and Chen, R. (2013), “Size-Dependent and Antibacterial Activities of Silver Nanoparticles against Oral Anaerobic Pathogenic Bacteria”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24, 1465-1471
9. Y. Chang, Z. Liu, X. Shen, B. Zhu, D.K. Macharia, Z. Chen, L. Zhang (2018), “Synthesis of Au nanoparticle-decorated carbon nitride nanorods with plasmon-enhanced photoabsorption and photocatalytic activity for removing various pollutants from water”, *J. Hazard. Mater.* 344, 1188–1197
10. L. Yang, W. Yan, H. Wang, H. Zhuang, J. Zhang (2017), “Shell thickness-dependent antibacterial activity and biocompatibility of gold@silver core-shell nanoparticles”, *RSC Adv.* 7, 11355–11361
11. W. Liao, Q. Lin, Y. Xu, E. Yang, Y. Duan (2019), “Preparation of Au@Ag core-shell nanoparticle decorated silicon nanowires for bacterial capture and sensing combined with laser induced breakdown spectroscopy and surface-enhanced Raman spectroscopy”, *Nanoscale.* 11, 5346–5354
12. Belder A. N., (1993) “Dextran, Industrial gums: polysaccharides and their derivatives”, in A. N. de Belder, Whistler and R. L., BeMiller J. L., Eds., *Academic Press*, pp. 399–425
13. Bankura K. P., Maity D., Mollick M. M. R. (2012), “Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran stabilized silver nanoparticles in aqueous medium”, *Carbohydrate polymers*, 89(4), pp. 1159–1165
14. Belder A. D. (1996), “Medical applications of dextran and its derivative, polysaccharides in medicinal applications”, in Belder A. N., Dumitriu S., Ed., *Marcel Dekker, New York, USA.* pp. 505–523
15. Wang Y., Zheng Y., Huang C. Z., Xia Y. (2013), “Synthesis of Ag Nanocubes 18 – 32 nm in Edge Length: The Effects of Polyol on Reduction Kinetics,

Size Control, and Reproducibility”, *Journal of the American Chemical Society*, 135, pp. 1941–1951

16. Ke Y., Wu M., Zhang Q., Li X., Xiao J., Wang S. (2019), “Hd3a and OsFD1 negatively regulate rice resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola*”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 513, 775–780

17. Liang Y., Yang D., Cui J. (2017), “A graphene oxide/silver nanoparticle composite as a novel agricultural antibacterial agent against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* for crop disease management”, *New J. Chem.* 41, 13692–13699

18. Vincent J. M., “Distortion of fungal hyphae in the presence of certain inhibitors”, *Nature*, vol. 159, p. 850, 1947

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SILVER - GOLD BIMETALLIC NANOPARTICLES DECORATED DEXTRAN

ABSTRACT

*Precious metal nanoparticles (NPs) are considered as potential antimicrobial agents because of their good antibacterial and antifungal activities as well as biocompatible nature. In this article, the writers introduce a relatively simple and fast dextran-based bimetallic Ag – Au Nano synthesis process. The product of the synthesis process is tested for its antibacterial and antifungal properties against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) and the fungus *Magnaporthe grisea* (M. grisea). The higher the silver content of the bimetallic nanoparticles, the better it displayed to inhibit the growth of bacteria and fungi.*

Keywords: Silver – gold bimetallic nanoparticles, antimicrobial, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) bacteria, *Magnaporthe grisea* (M. grisea) fungi

(Received: 22/12/2020, Revised: 27/1/2021, Accepted for publication: 8/3/2021)