

TỔNG HỢP XANH VÀ KHẢO SÁT KHẢ NĂNG KHÁNG KHUẨN CỦA NANO VÀNG, BẠC THU ĐƯỢC TỪ CHIẾT XUẤT LÁ CÂY *Callisia fragrans*

NGUYỄN THỊ LAN HƯƠNG

Viện Công nghệ Sinh học & Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh
nguyenthilanhuong@iuh.edu.vn

Tóm tắt. Trong bài nghiên cứu này, chúng tôi đã tổng hợp các hạt nano bạc (AgNPs) và nano vàng (AuNPs) bằng cách sử dụng dịch chiết của lá cây *Callisia fragrans* (Lindl.) Woodson như là tác nhân oxi hóa khử và tác nhân bảo vệ hạt nano tạo thành. Các thông số chính ảnh hưởng đến sự hình thành CF-AgNPs và CF-AuNPs, bao gồm nồng độ ion kim loại, thời gian phản ứng và nhiệt độ phản ứng được tối ưu hóa bằng cách sử dụng phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại và khả kiến (UV-Vis) ở độ hấp thụ cực đại đặc trưng tương ứng ở 420 và 560 nm. Sự hình thành của các hạt nano được xác định thông qua phương pháp UV-Vis. Ảnh hiển vi điện tử quét (SEM) cho thấy CF-AgNPs và CF-AuNPs có dạng gần như hình cầu với sự phân bố kích thước không đồng đều. Phổ XRD cho phép xác định cấu trúc của các pha tinh thể. Quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR) xác định các nhóm chức có khả năng khử từ dịch chiết của lá cây *Callisia fragrans* hình thành các AgNPs, AuNPs. Phổ EDX xác định sự có mặt của các nguyên tố vàng và bạc trong mẫu vật liệu nano. Đối với khảo sát kháng khuẩn, các hạt CF-AgNPs cho thấy khả năng kháng khuẩn chống lại các loại vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* và *Pseudomonas aeruginosa* với đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ $7,2\pm 0,2$ mm đến $11,2\pm 0,2$ mm. Các hạt CF-AuNPs không có khả năng kháng khuẩn với các loại vi khuẩn kể trên. Kết quả thể hiện rằng, *Callisia fragrans* là một nguồn tài nguyên sinh học tiềm năng để tổng hợp AgNPs cho ứng dụng kháng khuẩn, và AuNPs cho các ứng dụng vực khác.

Từ khóa. Nano bạc, nano vàng, tổng hợp xanh, *Callisia fragrans*, hoạt tính sinh học, kháng khuẩn.

GREEN SYNTHESIS AND STUDY ON ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SILVER AND GOLD NANOPARTICLES OBTAINED FROM *Callisia fragrans* LEAF EXTRACT

Abstract. Biogenic silver nanoparticles (AgNPs) and gold nanoparticles (AuNPs) were successfully synthesized by a simple single-step method using extract from *Callisia fragrans* (Lindl.) Woodson (CF) leaves as reducing as well as stabilizing agents. Major parameters affecting the formation of CF-AgNPs and CF-AuNPs, including metal ions concentration, reaction time, and reaction temperature were optimized using ultraviolet-visible (UV-Vis) measurements at characteristic maximum absorbance of about 420 and 560 nm, respectively. The formation of the nanoparticles was determined through the UV-Vis method. Scanning electron microscopy (SEM) images show that CF-AgNPs and CF-AuNPs are nearly spherical in shape with unequal size distribution. X-ray diffraction (XRD) method determined the structure of the crystalline phases. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) identified functional groups present in the leaf extract of *Callisia fragrans* to stabilize AgNPs, AuNPs. EDX spectra confirmed the presence of gold and silver elements in the nanomaterials. For the antibacterial investigation, the CF-AgNPs particles showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* and *Pseudomonas aeruginosa* with antibacterial ring diameters ranging from 7.2 ± 0.2 mm to 11.2 ± 0.2 mm. Meanwhile, CF-AuNPs have no antibacterial ability against the above bacterial strains. The results showed that, *Callisia fragrans* is a potential biological resource in synthesizing AgNPs for antibacterial application, and AuNPs for other applications.

Keywords. Silver nanoparticles, gold nanoparticles, biosynthesis, *Callisia fragrans*, biological activity, antibacterial activity.

1. GIỚI THIỆU

Sự ra đời của công nghệ nano trong những thập kỷ gần đây đã tạo ra một bước tiến vượt bậc trong khoa học vật liệu, bằng cách tạo ra các vật liệu có kích thước nano (10^{-9} m) với các đặc tính hóa lý độc đáo. Vật

liệu nano thể hiện các đặc tính mới, có thể hoàn toàn khác với vật liệu dạng khối do tỷ lệ diện tích bề mặt vượt trội và khả năng xuất hiện của các hiệu ứng lượng tử do kích thước hạt bé [1]. Đặc biệt, các hạt nano kim loại quý như nano bạc (AgNPs) và nano vàng (AuNPs) gần đây đã nhận được sự quan tâm lớn từ giới khoa học nhờ các tính năng hấp dẫn của chúng như các hoạt tính xúc tác và kháng khuẩn tuyệt vời, khả năng tương thích sinh học, hoạt tính quang điện hóa cao, tính trợ hóa học và tổng hợp đơn giản [2]. Với những đặc tính đặc biệt này, MNPs đã trở nên hữu ích trong nhiều lĩnh vực như y học, nông nghiệp, điện tử, kỹ thuật sinh học, xúc tác, cảm biến sinh học, xử lý nước và kiểm soát sự phát triển của vi sinh vật [3]. Một trong những ứng dụng thực tế nổi bật nhất của hạt nano kim loại quý (MNs) là việc sử dụng chúng như một chất kháng khuẩn hiệu quả [4]. Kích thước nhỏ và diện tích bề mặt lớn hơn của MNPs có thể nâng cao độ bền liên kết của màng vi khuẩn với các hạt nano, gây ra hiện tượng quang hóa màng vi khuẩn. Sự bám dính của MNPs trên màng vi khuẩn có thể dẫn đến tăng tính thấm, dẫn đến rò rỉ các chất trong tế bào chất và làm chết tế bào thông qua hiệu ứng Donnan [5]. Mặc dù cho đến nay cơ chế chính xác về tác dụng kháng khuẩn của MNPs vẫn chưa được khám phá đầy đủ, nhưng khả năng kháng khuẩn vượt trội của chúng là không thể bàn cãi.

Hiện nay, các hạt nano kim loại quý đã được sản xuất rộng rãi để đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng trong một số lĩnh vực ứng dụng quan trọng. Có nhiều cách tiếp cận để tổng hợp MNP, bao gồm các phương pháp vật lý, hóa học và sinh học. Tuy nhiên, tổng hợp vật lý và hóa học có những nhược điểm đáng chú ý, chẳng hạn như sử dụng các hóa chất nguy hiểm, tiêu tốn năng lượng, điều kiện tổng hợp phức tạp và chi phí cao [6]. Do đó, việc tổng hợp MNPs bằng vật liệu sinh học có nguồn gốc thực vật được ưa chuộng hơn vì tính đơn giản, thân thiện với môi trường, tiết kiệm chi phí và không chứa bất kỳ hóa chất độc hại nào. Một số loài thực vật như *Eriobotrya japonica* (thunb.) [7], *Bauhinia variegata* [8], *Lactuca indica* [9], *Siraitia grosvenorii* [3], v.v., đã được sử dụng để chế tạo MNPs. Đáng chú ý, MNPs được tạo ra bằng cách tổng hợp sử dụng chiết xuất thực vật được báo cáo là có hoạt tính kháng khuẩn tăng cường và độ ổn định cao do sự hiện diện của một lớp hữu cơ bao quanh các hạt nano này. Ngoài ra, sự đa dạng của các hợp chất hữu cơ có trong chiết xuất của các loại thực vật khác nhau có thể dẫn đến các đặc tính khác nhau của MNPs tổng hợp được [5]. Do đó, hiện nay các loài thực vật mới vẫn đang được khám phá để tổng hợp MNPs.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi lần đầu tiên sử dụng lá cây *Callisia fragrans* (Lindl.) Woodson (cây lược vàng) - một dược liệu trong Đông y, để chế tạo thành công AuNPs và AgNPs. Ở Việt Nam, *Callisia fragrans* thường sinh trưởng tốt nơi có nhiều bóng râm. Đây là loại cây thân thảo, cao khoảng 15-40 cm và có thể phát triển tới 1 mét. Thân cây phân thành nhiều đốt và nhiều nhánh khác nhau, mỗi đốt khoảng 1-2 cm. Lá cây *Callisia fragrans* thuộc lá sấp, lá đơn hoặc mọc so le nhau, phiến có hình ngọn giáo. Lá *Callisia fragrans* được nhiều người biết đến như một vị thuốc cổ truyền của các nước Châu Á, có tác dụng giải độc, thanh nhiệt, cầm máu, hóa đờm và tiêu viêm [10]. Thành phần hóa học của loài này gồm glycosides, photpholipid, carotionit, ascorbic axit, và anthycyans. Lá của *Callisia fragrans* chứa nhiều hợp chất polyphenol, flavonoid hoạt động sinh học, glycol, photpholipid trung tính và các thành phần acid béo [11]. Do đó, việc sử dụng chiết xuất từ lá *Callisia fragrans* để tổng hợp AuNPs và AgNPs có thể sẽ làm tăng tính tương hợp sinh học và hoạt tính sinh học của các MNPs. Các thông số tổng hợp, bao gồm nồng độ ion kim loại, thời gian phản ứng và nhiệt độ, được tối ưu hóa để tìm ra điều kiện tổng hợp tối ưu. Các MNPs sau khi tổng hợp ở các điều kiện tối ưu (ký hiệu là CF-AgNPs và CF-AuNPs) được đặc trưng bởi các kỹ thuật thiết bị phân tích hiện đại, gồm SEM, XRD, FTIR, EDX và sau đó được khảo sát hoạt tính kháng khuẩn đối với *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* và *Pseudomonas aeruginosa*.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

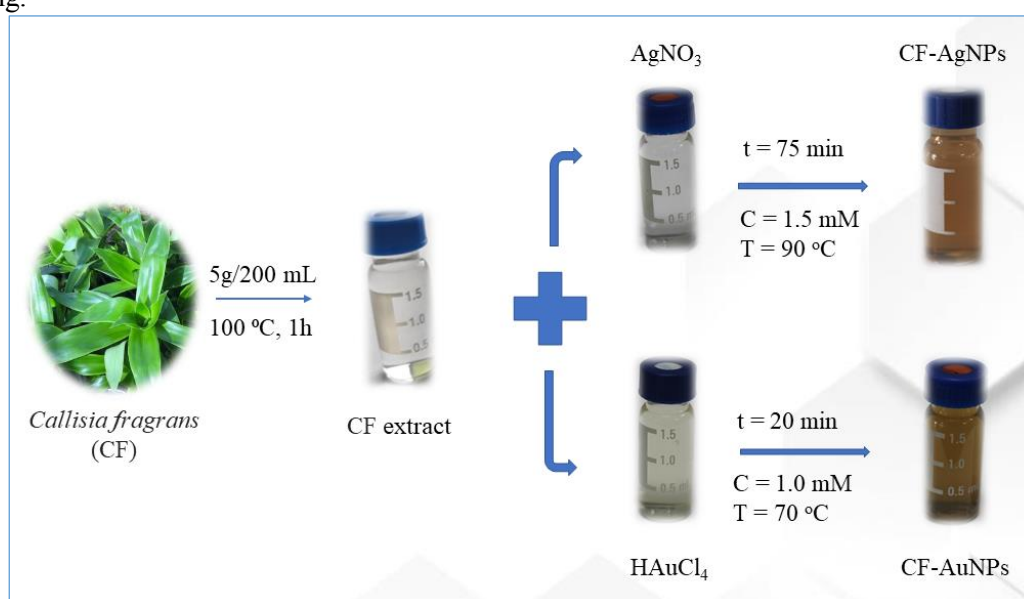
Hydrogen tetrachloroaurate (III) hydrat ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) được đặt từ công ty hóa chất Acros Organics (Belgium). Silver nitrate (AgNO_3) được cung cấp bởi công ty Cemaco (Việt Nam). Mueller Hinton Agar (MHA) được đặt từ công ty HiMedia (Ấn Độ). Địa kháng sinh Gentamycin được mua từ công ty Nam Khoa Bio Tek. (Việt Nam). Tất cả dụng cụ thủy tinh được tráng rửa sạch sẽ bằng nước cất trước khi sử dụng để tránh hiện tượng keo tụ dung dịch nano gây ra bởi các chất điện ly. 6 chủng vi khuẩn *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* lấy từ bộ sưu tập giống phòng Công nghệ Vi sinh, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2 Điều chế dịch chiết

Lá *Callisia fragrans* được thu thập trong khu vực TP. HCM. Lá sau khi lấy về, tuyển chọn những lá già lớn, tươi, sẫm màu, không bị dập. Lá được rửa sạch bằng nước vòi để loại bỏ chất bẩn, sau đó tráng lại bằng nước cất. Tiến hành cắt nhỏ lá, kích thước khoảng 3x5 cm. Cân 5 g lá đã cắt nhỏ cho vào 200 mL nước cất, đun hồi lưu trong 1 giờ. Hỗn hợp được để nguội tự nhiên đến nhiệt độ phòng, và lọc để loại bỏ cặn. Phần dịch chiết được cho vào bình bảo quản trong ngăn mát tủ lạnh, nhiệt độ trong khoảng 2-8°C và được đậy kín. Khuyến nghị sử dụng dịch chiết trong 1 tuần.

2.3 Tổng hợp CF-AgNPs và CF-AuNPs

Quá trình tổng hợp CF-AgNPs và CF-AuNPs được thực hiện với dung dịch AgNO_3 , HAuCl_4 và dịch chiết theo tỉ lệ 1:1 theo sơ đồ Hình 1. Sự thay đổi màu của dung dịch sau phản ứng chứng tỏ CF-AgNPs và CF-AuNPs đã được tổng hợp thành công. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp như nồng độ ion kim loại, nhiệt độ và thời gian cũng được khảo sát. Các yếu tố ảnh hưởng được tối ưu hóa thông qua phép đo UV-Vis với độ hấp thụ cực đại đặc trưng của AgNPs ở 420 nm, và AuNPs ở 540 nm. Các hạt CF-AgNPs và CF-AuNPs sau khi tổng hợp ở ba điều kiện tối ưu được dùng để nghiên cứu đặc tính hóa lý và ứng dụng của chúng.



Hình 1: Sơ đồ tổng hợp CF-AgNPs và CF-AuNPs từ dịch chiết lá *Callisia fragrans*

2.4 Phương pháp phân tích các đặc tính hóa lý của CF-AgNPs và CF-AuNPs

Sự hiện diện của các nhóm chức có trong mẫu nano vàng và mẫu cao dịch chiết khô được phân tích bằng phương pháp phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) trên máy quang phổ 27 Bruker Tensor (Đức) trong phạm vi số sóng 4000-500 cm^{-1} . Cấu trúc tinh thể của mẫu nano vàng được phân tích bằng phương pháp nhiễu xạ tia X trên máy Shimadzu 6100 diffractometer (Nhật Bản), hoạt động ở điện áp 40 kV, dòng điện 30 mA với bức xạ $\text{CuK}\alpha$ có bước sóng 1,5406 nm với tốc độ quét 0,05 °/s, bước nhảy 0,02° trong phạm vi 2 θ từ 10° đến 80°. Hình thái và kích thước của các hạt nano vàng được xác định bởi kính hiển vi điện tử quét (FE-SEM) trên máy FE-SEM S4800 (Nhật Bản). Thành phần các nguyên tố có trong mẫu CF-AgNPs và CF-AuNPs được phân tích bằng phương pháp phổ tán xạ năng lượng tia X, tích hợp trên máy FE-SEM S4800.

2.5 Hoạt tính kháng khuẩn của CF-AgNPs và CF-AuNPs

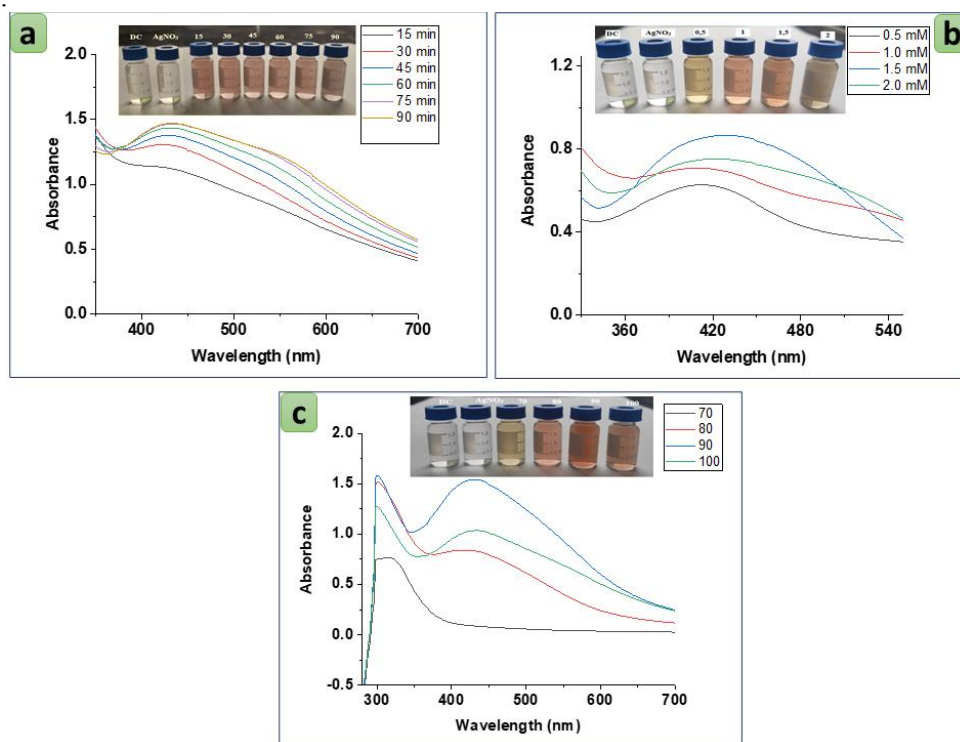
Hoạt tính kháng khuẩn của các mẫu CF-AgNPs và CF-AuNPs được khảo sát dựa trên khả năng kháng 6 chủng vi khuẩn, trong đó có 3 chủng vi khuẩn Gram (+) gồm *Bacillus subtilis*, *B. cereus* và *Staphylococcus aureus* và 3 chủng vi khuẩn Gram (-) gồm *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Escherichia coli*. Các chủng vi sinh vật thử nghiệm được tăng sinh trên môi trường LB Broth trong 12-18 giờ ở 37°C, lắc 150 vòng/phút. Sau đó dịch nuôi cấy vi khuẩn được pha loãng bằng nước muối sinh lý vô trùng đến độ đục tương đương 0,5 MCFarland. Giá trị này nằm ở khoảng từ $1-2 \times 10^8$ CFU/ml. Huyền phù vi khuẩn sẽ được sử dụng trong khảo sát hoạt tính kháng khuẩn [12].

Mẫu nano bạc, vàng được tổng hợp từ dịch chiết lá cây *Callisia fragrans* được pha loãng thành các nồng độ khác nhau (10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 80 ppm). Mẫu đối chứng dương sử dụng kháng sinh Gentamicin. Mẫu đối chứng âm là dịch chiết lá lược vàng. Hoạt tính kháng khuẩn của các mẫu CF-AgNPs và CF-AuNPs được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch [13]. Cây trải 0,1 mL dịch vi khuẩn kiểm định mật độ 1×10^8 CFU/mL đã chuẩn bị lên đĩa môi trường MHA. Trên mỗi đĩa petri đặt một đĩa kháng sinh làm đối chứng dương và đục 5 lỗ thạch với đường kính ($d=6$ mm). Sau đó, bơm vào 4 lỗ thạch lần lượt 30 μ L dịch chiết nano đã pha loãng ở 4 nồng độ khác nhau và 1 lỗ thạch còn lại 30 μ L dịch chiết lá cây làm đối chứng âm. Các đĩa thạch được ủ ở 37°C trong 18-24 giờ. Đường kính vòng kháng khuẩn được đo bằng thước đo đơn vị mm. Đường kính vòng kháng khuẩn trong phần kết quả là đường kính vòng kháng bao gồm kích thước lỗ thạch. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả được xử lý bằng phần mềm Statgraphics18.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tối ưu hóa tổng hợp CF-AgNPs và CF-AuNPs

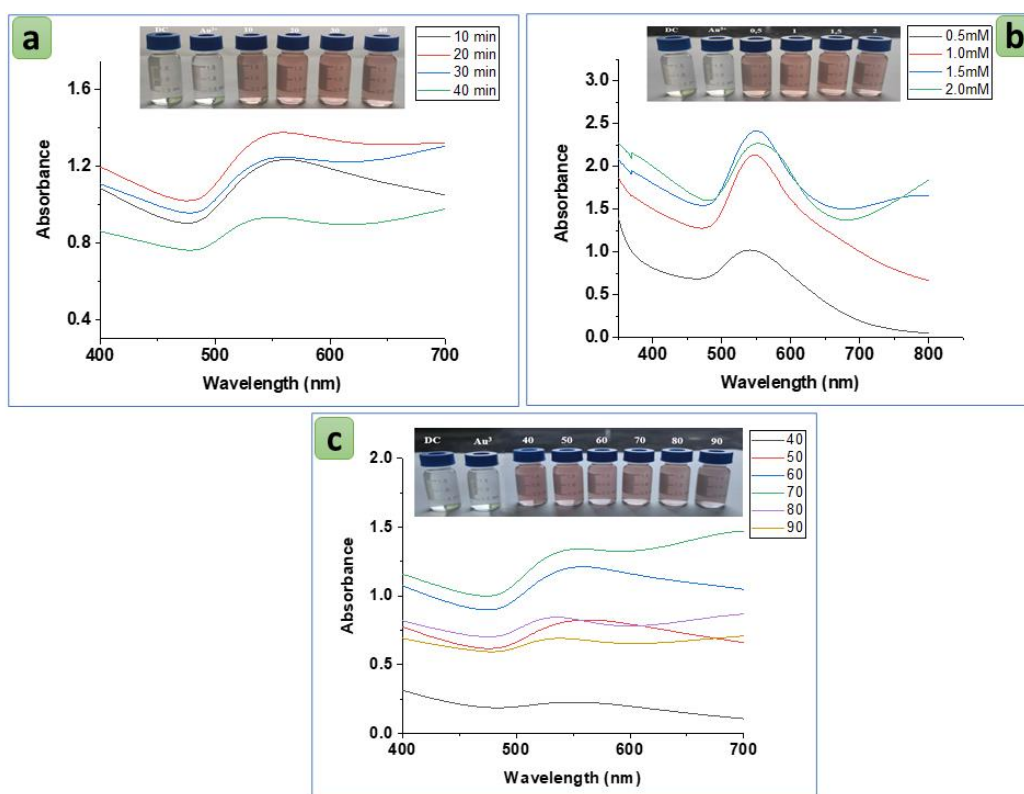
Các thông số tổng hợp bao gồm nồng độ ion kim loại, thời gian phản ứng và nhiệt độ phản ứng đã ảnh hưởng mạnh mẽ đến kích thước của các hạt nano vàng thu được. Quá trình tối ưu hoá các thông số này sẽ giúp thu được các hạt có kích thước hợp lý, dung dịch có độ bền vững nhiệt động cao và khó bị keo tụ hơn theo thời gian.



Hình 2: Phổ UV-Vis của dung dịch CF-AgNPs theo nồng độ (a), thời gian (b) và nhiệt độ (c)

Trong công trình này, thời gian phù hợp cho phản ứng được khảo sát bằng cách mang dung dịch nano đi đo quang một lần sau mỗi 15 phút, trong khi nồng độ và nhiệt độ được giữ cố định (Hình 2a). Kết quả quan sát ở hình 2a cho thấy thời gian tối ưu để tổng hợp nano vàng là 75 phút. Với thời gian tổng hợp lớn hơn 75 phút thì độ hấp thụ quang học hầu như không thay đổi, cho thấy lượng AgNPs sinh ra là cực đại. Nồng độ ion bạc được khảo sát bằng cách thay đổi nồng độ dung dịch AgNO_3 trong khoảng 0,5-2 mM, nhiệt độ và thời gian được giữ cố định (Hình 2b). Kết quả cho thấy nồng độ ion ảnh hưởng nhiều đến sự hình thành của hạt nano, nồng độ càng tăng độ hấp thụ quang học càng cao, số lượng nano sinh ra càng nhiều. Khi đến nồng độ nhất định nào đó thì độ hấp thụ quang học hầu như không đổi, cho thấy lượng nano sinh ra là tối ưu. Qua thực nghiệm xác định được nồng độ thích hợp của AgNO_3 để tổng hợp CF-AgNPs là 1,5 mM. Cuối cùng, nhiệt độ phản ứng được khảo sát trong khoảng 70-100°C, nồng độ và thời gian được giữ cố định (Hình 2c). Kết quả chỉ ra rằng, nhiệt độ càng cao thì độ hấp thụ quang học cũng tăng theo, sau đó đạt tối ưu. Ở nhiệt độ cao hơn, các phân tử chuyển động nhanh, số va chạm hiệu quả tăng nhanh dẫn đến

hạt nano tạo thành nhanh, dễ bị keo tụ, hạt có kích thước lớn gây giảm mật độ quang. Như vậy, nhiệt độ tốt nhất để tổng hợp CF-AgNPs là 90 °C.



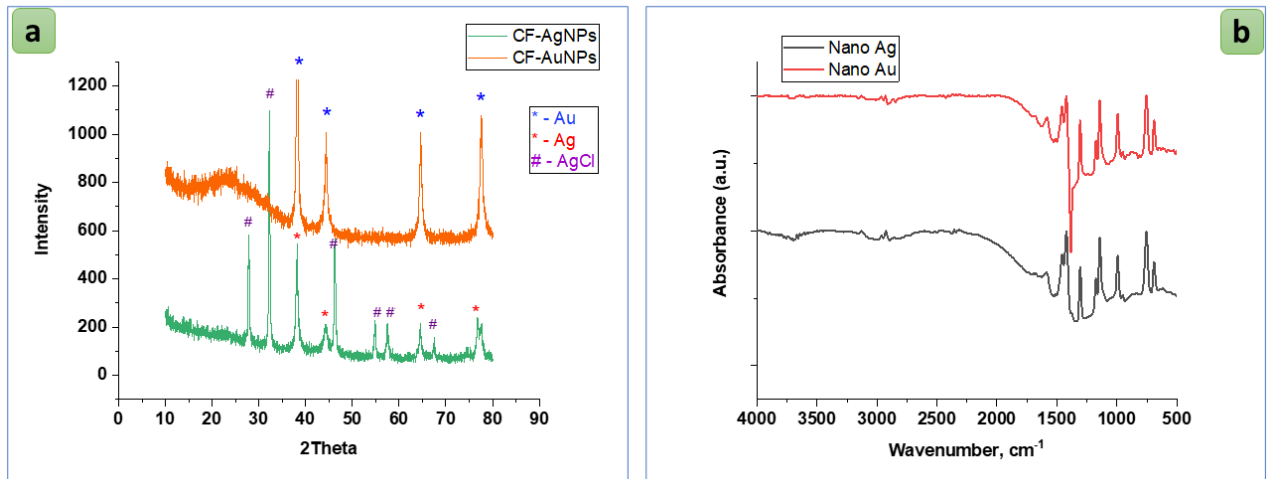
Hình 3: Phổ UV-Vis của dung dịch CF-AuNPs theo nồng độ (a), thời gian (b) và nhiệt độ (c)

Thời gian tổng hợp AuNPs được khảo sát trong khoảng 10 – 40 phút (Hình 3a), nồng độ ion vàng được khảo sát bằng cách thay đổi nồng độ dung dịch HAuCl₄ trong khoảng 0,5-2 mM (Hình 3b), và nhiệt độ được khảo sát trong khoảng 40 – 90 °C (Hình 3c). Khi một thông số được khảo sát, hai thông số còn lại được giữ không đổi, thông số tối ưu sẽ được sử dụng cho các khảo sát tiếp theo. Qua thực nghiệm, xác định được thời gian, nồng độ, và nhiệt độ thích hợp tổng hợp CF-AuNPs lần lượt là 20 phút, 1,5 mM và 70 °C.

3.2. Đặc trưng hóa lý của CF-AgNPs và CF-AuNPs

Kết quả phân tích nhiễu xạ tia X và FT-IR

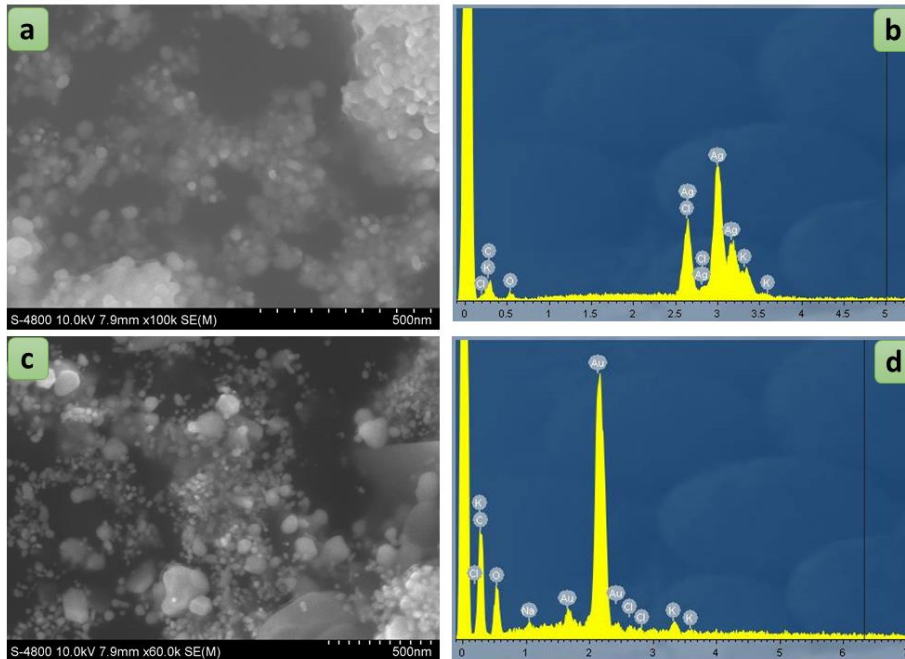
Các đặc điểm cấu trúc tinh thể của mẫu CF-AgNPs và CF-AuNPs được xác định bởi giản đồ XRD, trình bày trong Hình 4a. Giản đồ XRD của mẫu CF-AuNPs hiện thị các peak ở các góc nhiễu xạ 2θ lần lượt là 38,2°, 44,4°, 64,58° và 77,6°, đặc trưng cho các mặt phẳng (111), (200), (220) và (311) của tinh thể lập phương tâm diện Au tương ứng với giản đồ XRD chuẩn PDF ICDD 00-004-0784. Mẫu XRD của CF-AgNPs cho thấy các peak 2θ giá trị 38,32°, 44,42°, 64,82° và 77,82° đặc trưng cho các mặt phẳng (111), (200), (220) và (311) trong tinh thể lập phương tâm diện của AgNPs, tương ứng thể XRD chuẩn số 00-004-0783[4]. Các đỉnh mạnh ở 27,84°, 32,28°, 46,24°, 54,80°, 57,44° và 67,30° tương ứng với phản xạ từ các mặt phẳng (111), (200), (220), (311), (222) và (420) tinh thể AgCl (thể số 00-001-1013). Sự hiện diện của tinh thể AgCl trong CF-AgNPs có thể là do phản ứng của ion Ag⁺ với ion clorua có trong dịch chiết CF [14]. Có thể thấy, đỉnh cao nhất trong giản đồ XRD của CF-AgNPs và CF-AuNPs là ở mặt (111), cho thấy các tinh thể nano phát triển ưu tiên theo mặt (111) này. Như vậy, khi xác định chiều rộng bán đỉnh ở mặt (111), có thể tính ra kích thước trung bình của tinh thể. Kích thước trung bình của tinh thể được xác định theo phương trình Debye-Scherrer $d = 0,9\lambda/\beta\cos\theta$, với d là đường kính trung bình của tinh thể (nm), ‘β’ là $(\pi/180) \times \text{FWHM}$ (full width at half maximum - chiều rộng bán đỉnh); ‘λ’ là nguồn bức xạ tia X (1.540 nm) and ‘θ’ là góc Bragg. Theo đó, kích thước trung bình của tinh thể CF-AgNPs và CF-AuNPs lần lượt là 8,52 và 13,6 nm.



Hình 4: Giản đồ XRD và phổ FTIR của mẫu CF-AgNPs và CF-AuNPs

Kết quả phân tích FTIR của mẫu CF-AgNPs và CF-AuNPs cho thấy sự xuất hiện các dải phổ ở các đỉnh 478, 717, 885, 1065, 1161, 1243, 1354, 1443, 1523, 2864 và 3697 cm^{-1} (Hình 4b). Đặc trưng cho dao động kéo dài của nhóm $-\text{OH}$ là sự xuất hiện đỉnh phổ tại 3697 cm^{-1} [15]. Các đỉnh phổ này có cường độ không lớn, chứng tỏ lượng $-\text{OH}$ có trong mẫu không nhiều. Đỉnh phổ ở vị trí khoảng 2864 cm^{-1} đặc trưng cho liên kết nhóm C-H. Đỉnh phổ tại vị trí 1523 cm^{-1} là do dao động hóa trị bất đối xứng của nhóm chức (COO^-). Các đỉnh ở khoảng 1443 và 1065 cm^{-1} đặc trưng cho dao động của liên kết N-H và C-N. Các đỉnh phổ tại số sóng 1354 cm^{-1} và 1065 cm^{-1} tương ứng với các liên kết C-O và C-O-C [16]. Tất cả các đỉnh phổ trong phổ FTIR của cả hai mẫu CF-AgNPs và CF-AuNPs có độ hấp thụ khá tương tự nhau. Các nhóm chức này là của các hợp chất hữu cơ có trong dịch chiết, bám vào các hạt nano sau khi kết thúc phản ứng giữa dịch chiết và ion kim loại. Chính các hợp chất hữu cơ này đã đóng vai trò là chất ổn định, ngăn cản sự kết tụ các hạt nano.

Ảnh SEM và phân tích thành phần nguyên tố

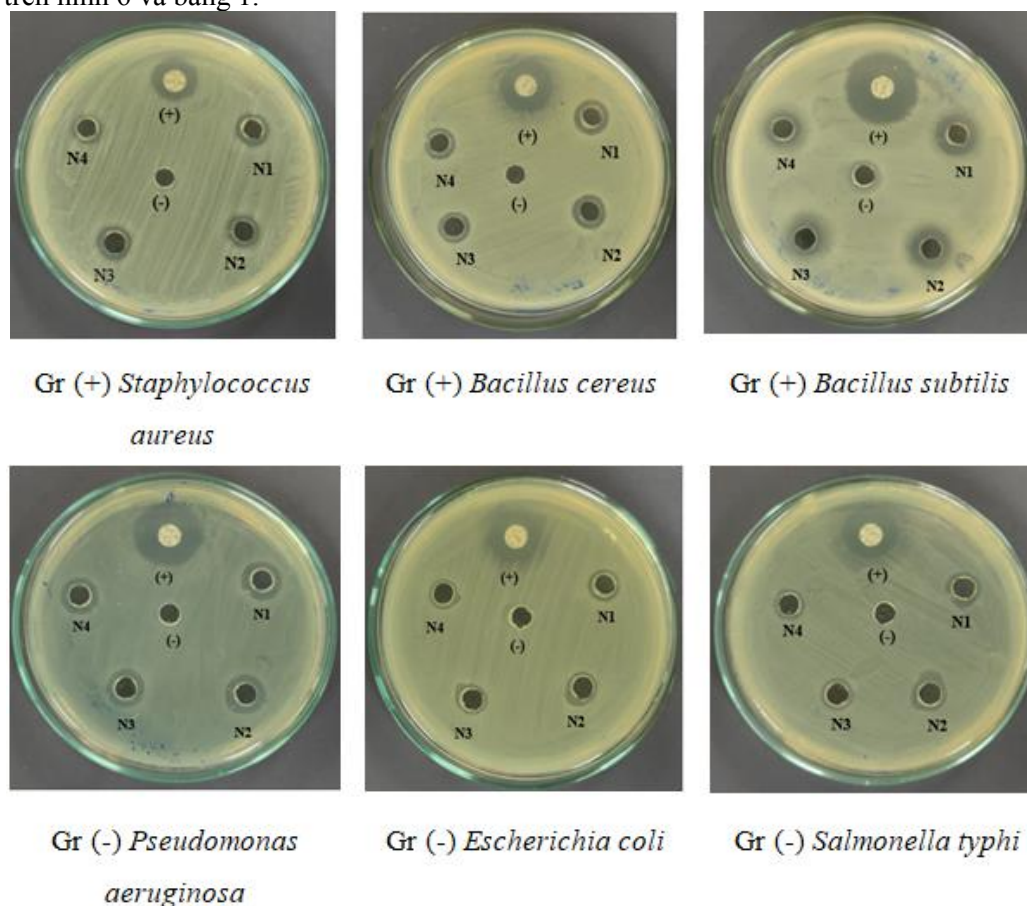


Hình 5: Ảnh SEM và Phổ EDX của PP_AuNPs

Hình thái bề mặt và kích thước của các hạt CF-AgNPs và CF-AuNPs được xác định bằng ảnh chụp SEM. Thành phần nguyên tố hóa học của mẫu CF-AgNPs và CF-AuNPs được phân tích bằng phương pháp quang phổ tán sắc năng lượng tia X. Kết quả phân tích được trình bày trong Hình 5. Hình ảnh SEM cho thấy rằng các hạt CF-AgNPs có dạng hình cầu kích thước khoảng 20-50 nm, phân tán không đồng nhất và hình thành các cụm (Hình 5a). Đối với phân tích EDX, tín hiệu nguyên tố mạnh ở 3.0 keV xác nhận sự hiện diện của bạc trong mẫu (Hình 5b). Sự hiện diện của các nguyên tố cacbon và oxy trong quang phổ cho thấy rằng các phân tử hữu cơ của chiết xuất CF đã bị hấp phụ trên bề mặt của AgNPs. Sự xuất hiện của đỉnh clorua ở 2,6 keV cho thấy thành phần AgCl phù hợp với dữ liệu XRD. Từ dữ liệu phổ EDX về hàm lượng trung bình của các nguyên tố trong CF-AgNPs cho thấy mẫu chứa khoảng 61,8% bạc, 17,1% carbon, 7,1% oxy, 11,1% clorua, và 2.8% kali. Hình ảnh SEM của mẫu CF-AuNPs cho thấy các hạt nano vàng có kích thước trong khoảng 20-100 nm, phân tán tốt hơn trên bề mặt so với nano bạc (Hình 5c). Phổ EDX của mẫu CF-AuNPs xuất hiện các đỉnh tương tự như trong mẫu CF-AgNPs (Hình 5C). Dữ liệu EDX cho thấy vàng có ba tín hiệu mạnh lần lượt tại 2,1, 8,5 và 9,7 keV. Hàm lượng vàng trong mẫu CF-AuNPs khoảng 49,5%, carbon (36,1%) và oxy (12,4). Hàm lượng carbon và oxy trong CF-AuNPs cao hơn so với CF-AgNPs có thể là do ion Au³⁺ có điện tích cao hơn Ag⁺ đã tương tác mạnh hơn với các nhất hữu cơ. Sự hiện diện của nguyên tố K trong cả hai mẫu CF-AgNPs và CF-AuNPs là do sự tồn tại của các khoáng chất có trong chiết xuất thực vật, tương tự một số công trình đã được báo cáo trước đây.

3.3. Khả năng kháng khuẩn

Kết quả thử nghiệm khả năng kháng khuẩn của dung dịch nano được tổng hợp từ lá cây *Callisia fragrans* với 6 loại vi khuẩn, trong đó có 3 chủng Gr (+) gồm: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* và *Bacillus cereus*; 3 chủng vi khuẩn Gr (-) gồm *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Escherichia coli* được thể hiện trên hình 6 và bảng 1.



Hình 6: Kết quả kháng khuẩn của CF-AgNPs

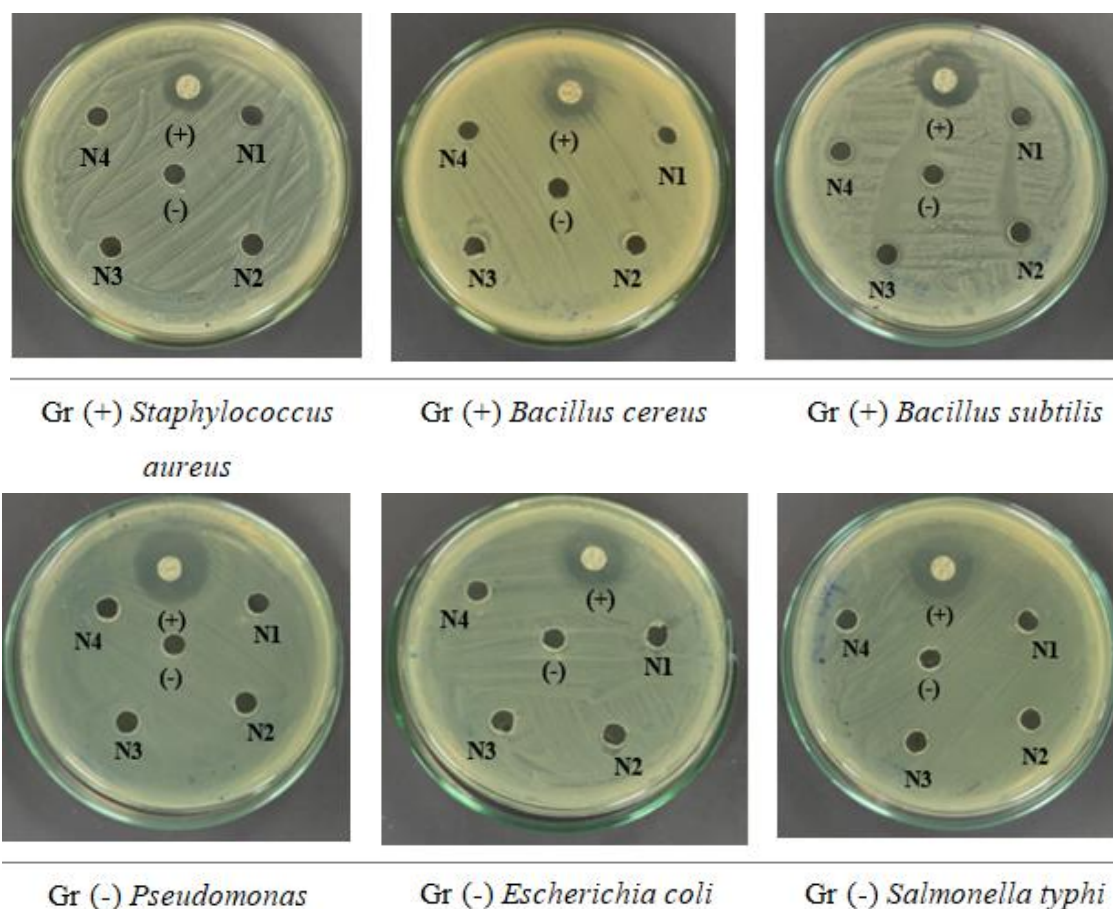
(+): Đối chứng dương (Gentamicin); (-): Đối chứng âm (dịch chiết); N1: Dung dịch CF-AgNPs ban đầu với nồng độ 80 ppm; N2: Dung dịch CF-AgNPs với nồng độ 40 ppm; N3: Dung dịch CF-AgNPs với nồng độ 20 ppm; N4: Dung dịch CF-AgNPs với nồng độ 10 ppm

Bảng 1. Kết quả đường kính vòng kháng khuẩn (mm) của CF-AgNPs ở các nồng độ khác nhau

Vi khuẩn	Đối chứng dương Gentamicin (C=10 µg)	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)			
		Nồng độ của CF-AgNPs			
		N1 (80 ppm)	N2 (40 ppm)	N3 (20 ppm)	N4 (10 ppm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,3 ^a ±0,3	8,2 ^b ±0,2	8,2 ^b ±0,2	8,2 ^b ±0,2	7,3 ^b ±0,2
<i>Bacillus cereus</i>	14,5 ^a ±0,3	9,0 ^b ±0,0	8,7 ^b ±0,3	8,2 ^b ±0,2	8,0 ^b ±0,0
<i>Bacillus subtilis</i>	19,3 ^a ±0,3	11,2 ^b ±0,2	10,3 ^{bc} ±0,2	10,1 ^b ±0,2	9,5 ^c ±0,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17,8 ^a ±0,2	10,1 ^b ±0,2	9,7 ^{bc} ±0,3	9,3 ^{bc} ±0,3	9,0 ^c ±0,0
<i>Escherichia coli</i>	13,5 ^a ±0,3	7,8 ^b ±0,2	7,8 ^b ±0,2	7,7 ^b ±0,2	7,2 ^b ±0,2
<i>Salmonella typhi</i>	13,5 ^a ±0,3	8,2 ^b ±0,2	8,2 ^b ±0,2	7,7 ^b ±0,2	7,3 ^b ±0,2

❖ Trong cùng một hàng các số có chữ số mũ khác nhau thì khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

Từ dữ liệu thu được có thể thấy nano bạc được tổng hợp từ lá cây *Callisia fragrans* có khả năng kháng rõ rệt 3 chủng vi khuẩn *B. subtilis*, *B. cereus* và *P. aeruginosa* với đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ 8,0±0,0 mm đến 11,2±0,2 mm. Trong các chủng vi sinh vật nghiên cứu, dung dịch CF-AgNPs thể hiện khả năng kháng mạnh nhất đối với chủng *B. subtilis* khi đường kính vòng kháng dao động từ 9,5±0,3 mm đến 11,2±0,2 mm. Khả năng kháng yếu đối với 3 chủng *S. aureus*, *S. typhi* và *E. coli* với đường kính vòng kháng khuẩn dao động từ 7,2±0,2 mm đến 8,2±0,2 mm. Như vậy, khả năng kháng 2 chủng vi khuẩn *B. subtilis* và *P. aeruginosa* của dung dịch nano bạc được tổng hợp bằng dịch chiết lá *Callisia fragrans* tương đương với dung dịch nano bạc được tổng hợp từ dịch chiết *Thevetia peruviana* trong nghiên cứu của Omolara O. Oluwaniyi và cs. (2015) [17]. Đối với 3 chủng *S. aureus*, *S. typhi* và *E. coli* dung dịch nano bạc được tổng hợp bằng dịch chiết *Thevetia peruviana* thể hiện tính kháng mạnh hơn [17]. Còn trong nghiên cứu của S. Rashid và cs. (2019), nano bạc được tổng hợp từ dịch chiết rễ cây *Bergenia ciliate*, *Bergenia stracheyi* không có khả năng kháng 2 chủng vi khuẩn *B. cereus* và *E. coli*, còn nano bạc được tổng hợp từ dịch chiết từ rễ cây *Rumex hastatus* kháng *B. cereus* yếu hơn so với nano bạc được tổng hợp từ dịch chiết lá *Callisia fragrans* [18]. Nhìn chung, giữa 3 nồng độ nghiên cứu của dung dịch nano bạc (80, 40, 20 ppm), chúng tôi không nhận thấy sự khác biệt số liệu thống kê về độ lớn vòng kháng khuẩn đối với các chủng vi khuẩn nghiên cứu. Sự khác biệt được nhận thấy khi pha loãng dung dịch nano bạc tới nồng độ 10 ppm. Do đó, để đạt được hiệu quả kháng khuẩn cao nhất có thể lựa chọn nồng độ 20 ppm nhằm tiết kiệm nguyên liệu và chi phí.



Hình 7: Kết quả kháng khuẩn của CF-AuNPs

(+): Đối chứng dương (Gentamicin); (-): Đối chứng âm (dịch chiết lá *Callisia fragrans*); N1: Dung dịch CF-AuNPs ban đầu 100 ppm; N2: Dung dịch CF-AuNPs với nồng độ 50 ppm; N3: Dung dịch CF-AuNPs với nồng độ 25 ppm; N4: Dung dịch CF-AuNPs với nồng độ 12,5 ppm

Từ kết quả nghiên cứu khả năng kháng khuẩn của CF-AuNPs cho thấy, mẫu CF-AuNPs được tổng hợp từ lá *Callisia fragrans* không có hoạt tính kháng đối với các chủng vi khuẩn nghiên cứu *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Escherichia coli*. Kết quả thực nghiệm này tương đồng với nghiên cứu tổng hợp AuNPs từ *Codonopsis pilosula* và lõi bắp của công trình [19].

4. KẾT LUẬN

Các hạt CF-AgNPs và CF-AuNPs hình cầu có kích thước hạt nhỏ trong khoảng từ 20 đến 100 nm đã được sinh tổng hợp thành công bằng phương pháp tổng hợp xanh mà không sử dụng bất kỳ chất khử và chất ổn định thương mại đắt tiền nào. Công trình này đã chứng minh tính hiệu quả của dịch chiết *Callisia fragrans* trong việc khử các ion bạc, vàng thành các hạt nano tương ứng và làm bền các hạt nano tạo thành. Các hạt nano CF-AgNPs và CF-AuNPs phân tán tốt trong môi trường nước và ổn định trong dung dịch hơn một tuần. Đối với khảo sát kháng khuẩn, các hạt CF-AgNPs cho thấy khả năng kháng khuẩn chống lại các loại vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* và *Pseudomonas aeruginosa*. Các hạt CF-AuNPs không có khả năng kháng khuẩn với các loại vi khuẩn kể trên. Kết quả thể hiện rằng, *Callisia fragrans* là một nguồn nguyên liệu tiềm năng để tổng hợp AgNPs cho ứng dụng kháng khuẩn, và AuNPs cho các ứng dụng vực khác, như dẫn truyền thuốc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] V. Soni, P. Raizada, P. Singh, ..., V.H. Nguyen, "Sustainable and green trends in using plant extracts for the

- synthesis of biogenic metal nanoparticles toward environmental and pharmaceutical advances: A review," *Environ. Res.*, 202, 111622, 2021. DOI: 10.1016/J.ENVRES.2021.111622.
- [2] A. Saravanan, P.S. Kumar, S. Karishma, ..., C.S. George, "A review on biosynthesis of metal nanoparticles and its environmental applications," *Chemosphere*, 264, 128580, 2021, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.128580.
- [3] V.T. Le, T.G. Duong, V.T. Le, ..., V.D. Doan, "Effective reduction of nitrophenols and colorimetric detection of Pb(ii) ions by *Siraitia grosvenorii* fruit extract capped gold nanoparticles," *RSC Adv.*, 11, 25, 15438–15448, 2021. DOI: 10.1039/d1ra01593a.
- [4] V.D. Doan, V.S. Luc, T.L.H. Nguyen, T.D. Nguyen and T.D. Nguyen, "Utilizing waste corn-cob in biosynthesis of noble metallic nanoparticles for antibacterial effect and catalytic degradation of contaminants," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 27, 6, 6148–6162, 2020, DOI: 10.1007/s11356-019-07320-2.
- [5] S. Nayak, S.P. Sajankila and C.V. Rao, "Green synthesis of gold nanoparticles from banana pith extract and its evaluation of antibacterial activity and catalytic reduction of Malachite green dye", *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.*, 7, 6, 641–645, 2018, DOI: 10.15414/jmbfs.2018.7.6.641-645.
- [6] O. Pryshchepa, P. Pomastowski and B. Buszewski, "Silver nanoparticles: Synthesis, investigation techniques, and properties," *Adv. Colloid Interface Sci.*, 284, 87–100, 2020, DOI: 10.1016/j.cis.2020.102246.
- [7] C. Yu, J. Tang, X. Liu, ..., L. Wang, "Green biosynthesis of silver nanoparticles using *eriobotrya japonica* (thunb.) leaf extract for reductive catalysis," *Materials (Basel)*, 12, 1, 189, 2019, DOI: 10.3390/ma12010189.
- [8] D. Uzunoğlu, M. Ergüt, C.G. Kodaman, and A. Özer, "Biosynthesized silver nanoparticles for colorimetric detection of Fe³⁺ ions," *Arab. J. Sci. Eng.*, Aug. 2020, DOI: 10.1007/s13369-020-04760-8.
- [9] T.T. Vo, C.H. Dang, V.D. Doan, V.S. Dang and T.D. Nguyen, "Biogenic synthesis of silver and gold nanoparticles from *Lactuca indica* leaf extract and their application in catalytic degradation of toxic compounds," *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.*, 30, 2, 388–399, 2020. DOI: 10.1007/s10904-019-01197-x.
- [10] I.E.M. Santos, "*Callisia fragrans* (Lindl.) Woodson, suculenta de cultivo escasamente divulgado en Cuba," *agrisost*, 26, 2, 1–6, 2020.
- [11] D.N. Olennikov, T.A. Ibragimov, I.N. Zilfikarov and V.A. Chelombit'ko, "Chemical composition of *Callisia fragrans* juice 1. Phenolic compounds," *Chem. Nat. Compd.*, 44, 6, 776–777, 2008. DOI: 10.1007/s10600-009-9174-8.
- [12] I. Wiegand, K. Hilpert and R.E.W. Hancock, "Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances," *Nat. Protoc.*, 3, 2, 163–175, 2008, DOI: 10.1038/nprot.2007.521.
- [13] A.W. Bauer, W.M. Kirby, J.C. Sherris, M. Turck, "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method." *Am. J. Clin. Pathol*, 45, 493-496, 1996.
- [14] V.D. Doan, M.T. Phung, T.L.H. Nguyen, T.C. Mai and T.D. Nguyen, "Noble metallic nanoparticles from waste *Nypa fruticans* fruit husk: Biosynthesis, characterization, antibacterial activity and recyclable catalysis," *Arab. J. Chem.*, 13, 10, 7490–7503, 2020. DOI: 10.1016/j.arabjc.2020.08.024.
- [15] A.M.E. Shafey, "Green synthesis of metal and metal oxide nanoparticles from plant leaf extracts and their applications: A review," *Green Process. Synth.*, 9, 1, 304–339, 2020. DOI: 10.1515/gps-2020-0031.
- [16] P. Trisonthi, A. Sato, H. Nishiwaki and H. Tamura, "A new diterpene from *Litsea cubeba* fruits: Structure elucidation and capability to induce apoptosis in HeLa cells," *Molecules*, 19, 5, 6838–6850, 2014. DOI:

10.3390/molecules19056838.

[17] O.O. Oluwaniyi, H.I. Adegoke, E.T. Adesuji,...,C.O. Oseghale, "Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous leaf extract of *Thevetia peruviana* Juss and its antimicrobial activities," *Appl. Nanosci.*, 6, 6, 903–912, 2016.

DOI: 10.1007/s13204-015-0505-8.

[18] S. Rashid, M. Azeem, S.A. Khan, M.M. Shah and R. Ahmad, "Characterization and synergistic antibacterial potential of green synthesized silver nanoparticles using aqueous root extracts of important medicinal plants of Pakistan," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 179, 317–325, 2019. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.04.016.

[19] V.D. Doan, B.A. Huynh, T.D. Nguyen,...,V.T. Le, "Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using aqueous extract of *Codonopsis pilosula* roots for antibacterial and catalytic applications," *J. Nanomater.*, 2020, 1–18, 2020.

DOI: 10.1155/2020/8492016.

Ngày nhận bài: 04/08/2021

Ngày chấp nhận đăng: 28/09/2021