

SO SÁNH KHẢ NĂNG KHÁNG VI KHUẨN *SALMONELLA ENTERITIDIS* CỦA CÁC VẬT LIỆU NANO TỔ HỢP Fe_3O_4 -Ag VÀ NANO Ag

COMPARISON OF ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF Fe_3O_4 -Ag NANOCOMPOSITES AND Ag NANOPARTICLES AGAINST *SALMONELLA ENTERITIDIS*

Vũ Thị Trang¹, Phùng Thị Hồng Vân², Lê Thị Tâm¹, Vũ Ngọc Phan^{1*}

¹Viện Tiên tiến Khoa học và Công nghệ (AIST)- Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

²Trường Đại học Tài nguyên và Môi trường Hà Nội

Đến Tòa soạn ngày 02/4/2017, chấp nhận đăng ngày 20/4/2017

Tóm tắt: Trong bài báo này, chúng tôi trình bày quy trình tổng hợp vật liệu nano tổ hợp ôxit sắt từ-bạc và nano bạc bằng phương pháp hóa học. Đồng thời so sánh khả năng kháng khuẩn với chủng vi khuẩn gram âm *Salmonella enteritidis* của hai loại vật liệu này. Kết quả nghiên cứu cho thấy cả hai vật liệu nano tổ hợp Fe_3O_4 -Ag và nano bạc đều có khả năng kháng vi khuẩn *Salmonella enteritidis*. Và khả năng kháng khuẩn của vật liệu nano tổ hợp Fe_3O_4 -Ag thấp hơn của vật liệu nano bạc.

Từ khóa: Fe_3O_4 -Ag, vật liệu nano tổ hợp, kháng khuẩn, *Salmonella enteritidis*.

Abstract: In this work, chemical syntheses of iron oxide-silver nanocomposites and silver nanoparticles were reported. Antibacterial activities of these prepared nanomaterials against Gram-negative bacterial strain of *Salmonella enteritidis* were also presented and compared. The results suggest that both iron oxide-silver nanocomposites and silver nanoparticles exhibit antibacterial activities against *Salmonella enteritidis*. However iron oxide-silver nanocomposites have lower antibacterial activity than that of silver nanoparticles.

Keywords: Iron oxide-silver, nanocomposites, antibacterial, *Salmonella enteritidis*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong vài thập kỷ gần đây, rất nhiều nhóm nghiên cứu đã tiến hành kết hợp hai hay nhiều vật liệu nano khác nhau để chế tạo các vật liệu nano tổ hợp nhằm ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như điện tử, xúc tác, cảm biến và y sinh... Trong đó, vật liệu tổ hợp trên cơ sở các hạt nano từ và hạt nano bạc được nghiên cứu mạnh mẽ bởi sự kết hợp này không những có thể mở rộng khả năng ứng dụng của vật liệu trong phát hiện và xử lý tế bào ung thư, xúc tác và xử lý môi trường... mà còn có thể thu hồi bằng từ

trường ngoài và tái sử dụng [1]. Ví dụ, Zhu và cộng sự [2] đã chế tạo thành công vật liệu nano Fe_3O_4 -Ag có cấu trúc dị thể có kích thước khoảng 25 nm. Vật liệu tổ hợp thu được có thể làm tác nhân tương phản hình ảnh trong hai kỹ thuật chụp ảnh trong y tế và sinh học bao gồm chụp ảnh cộng hưởng từ hạt nhân (MRI) và chụp cắt lớp đơn photon (SPECT). Nhóm nghiên cứu của M. Kooti tổng hợp vật liệu nano tổ hợp của bạc và ferrit coban (CoFe_2O_4) bằng phương pháp hai bước nhằm ứng dụng làm vật liệu kháng khuẩn [3]. Kết quả nghiên cứu với một số

loại chủng vi khuẩn như *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* và *P. aeruginosa* cho thấy vật liệu Ag-CoFe₂O₄ thể hiện hoạt tính kháng khuẩn cao hơn hạt nano bạc và cả một số loại thuốc kháng khuẩn thông thường.

Trong công trình này, chúng tôi trình bày quy trình chế tạo vật liệu nano tổ hợp ôxit sắt từ - bạc (Fe₃O₄-Ag) và nano bạc bằng các phản ứng hoá học. Đồng thời, hoạt tính kháng khuẩn của hai vật liệu nano tổ hợp Fe₃O₄-Ag và nano Ag chế tạo được với chủng vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm *Salmonella enteritidis* cũng sẽ được trình bày.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hóa chất

Sắt (II) clorua (FeCl₂·4H₂O, 98%), sắt (III) clorua (FeCl₃·6H₂O, 97%), bạc nitrat (AgNO₃, 99,9%), polyvinylpyrrolidon và dung dịch amoni (NH₄OH, 25%) mua từ Shanghai Chemical Reagent (Trung Quốc). Các hoá chất khác gồm natri hydroxit, rượu etylic và nước khử ion được mua từ Trung Quốc và Việt Nam. Các hóa chất này được sử dụng mà không cần bất kỳ quá trình tinh chế nào.

2.2. Chế tạo hạt nano Fe₃O₄-Ag và Ag

Hạt nano Fe₃O₄-Ag được chế tạo theo phương pháp hai bước: bước thứ nhất tổng hợp các hạt nano Fe₃O₄ bằng phương pháp đồng kết tủa và bước thứ hai tạo các hạt nano Ag trong dung dịch phản ứng có các hạt nano Fe₃O₄. Đầu tiên, 1 mmol FeCl₂·4H₂O và 2,1 mmol FeCl₃·6H₂O lần lượt được hòa tan trong cốc thủy tinh chứa nước khử ion để tạo thành dung dịch màu vàng nâu. Sau đó, nhỏ từ từ 80 ml dung dịch 1M NaOH vào dung dịch trên trong điều kiện khuấy trộn mạnh cho đến khi dung dịch phản ứng chuyển từ màu vàng nâu thành màu đen. Kết tủa của phản ứng (các hạt nano Fe₃O₄) được lọc và rửa nhiều lần với nước

kết hợp với quay ly tâm trong 3 phút với tốc độ quay 3500 vòng/phút.

Tiếp theo, 194 mg các hạt nano Fe₃O₄, 100 mg polyvinylpyrrolidon và 0,5 mmol AgNO₃ lần lượt được cho vào cốc thủy tinh chứa 30 ml nước khử ion rồi được khuấy từ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau đó, nhỏ từ từ 2,5 ml dung dịch NH₄OH vào cốc thủy tinh và tiếp tục khuấy từ trong 1 giờ. Đổ hỗn hợp này vào bình thủy nhiệt có thể tích 70 ml, đưa bình thủy nhiệt vào lò gia nhiệt rồi tiến hành phản ứng ở 200°C trong 1 giờ để tạo thành vật liệu nano tổ hợp Fe₃O₄-Ag. Cuối cùng, kết tủa được lọc và rửa nhiều lần bằng rượu etylic và nước khử ion kết hợp với quay ly tâm trong 3 phút ở tốc độ quay 3500 vòng/phút rồi được bảo quản kín cho các nghiên cứu tiếp theo.

Với một phản ứng tương tự bước thứ hai nhưng không có các hạt nano Fe₃O₄, chúng tôi đã tiến hành tổng hợp các hạt nano bạc bằng phương pháp thủy nhiệt với sự có mặt của polyvinylpyrrolidon và NH₄OH trong cùng các điều kiện đã trình bày ở trên.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Cấu trúc hình thái học của vật liệu được khảo sát bằng phương pháp hiển vi điện tử truyền qua (TEM, JEOL-JEM 1010, 80 kV, Hitachi, Nhật Bản) tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương Hà Nội. Thành phần pha của vật liệu được khảo sát bằng phương pháp phổ nhiễu xạ tia X (XRD, Siemens Bruker D5000) với bức xạ CuKα (λ=1,54056 Å) tại Trường Đại học Khoa học tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội. Tính chất từ của vật liệu được khảo sát bằng máy từ kế mẫu rung (VSM, EZ9, MicroSense) với từ trường tối đa là 20000 Oe tại Viện Tiên tiến Khoa học và Công nghệ - Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.

2.4. Khảo sát khả năng kháng khuẩn

Hoạt tính kháng vi khuẩn gram âm *Salmonella enteritidis* của vật liệu nano tổ hợp Fe₃O₄-Ag được khảo sát bằng phương

pháp khuếch tán đĩa tại Khoa Virus thuộc Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương Hà Nội.

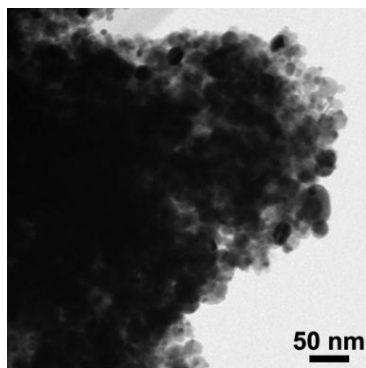
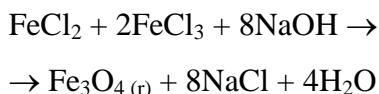
Vi khuẩn *Salmonella enteritidis* được nuôi cấy trên đĩa petri (đường kính 12 cm) trong môi trường Luria-Bertani (pH=7). Nhỏ 5 giọt (20 µl/giọt) dung dịch vi khuẩn *Salmonella enteritidis* ở nồng độ 10^5 CFU/ml lên trên hai đĩa thạch. Dùng tang vô trùng láng đều vi khuẩn trên bề mặt thạch. Sau đó sử dụng các khoanh giấy thấm (Whatman, đường kính 5 mm) đã được sấy vô trùng nhúng vào dung dịch chứa vật liệu nano tổ hợp Fe_3O_4 -Ag và nano Ag chế tạo được có nồng độ từ 96 ppm đến 1542 ppm rồi nhẹ nhàng đặt theo thứ tự trên bề mặt đĩa thạch đã láng vi khuẩn. Ở chính tâm đĩa thạch đặt vòng giấy nhúng nước cất để đối chứng. Duy trì đĩa nuôi vi khuẩn trong tủ ẩm ở 37°C trong 24 giờ.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chế tạo vật liệu nano tổ hợp

Fe_3O_4 -Ag và nano Ag

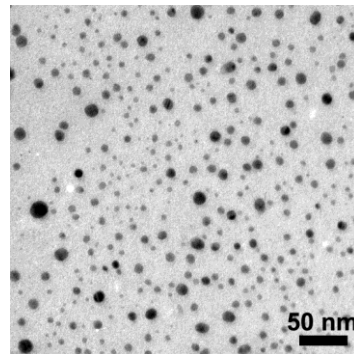
Các hạt nano từ Fe_3O_4 được tổng hợp bằng phương pháp đồng kết tủa trong môi trường kiềm ở nhiệt độ phòng. Phương trình phản ứng tổng hợp các hạt nano Fe_3O_4 như sau:



Hình 1. Ảnh TEM vật liệu nano tổ hợp Fe_3O_4 -Ag

Tiếp theo, vật liệu nano tổ hợp Fe_3O_4 -Ag được tổng hợp bằng phương pháp thủy nhiệt, ở đó muối bạc nitrat được khử trong dung dịch nước chứa các hạt nano Fe_3O_4 , polyvinylpyrrolidon và NH_4OH .

Ảnh hiển vi điện tử truyền qua của vật liệu nano tổ hợp Fe_3O_4 -Ag (hình 1) cho thấy vật liệu nano tổ hợp Fe_3O_4 -Ag có cấu trúc dị thể. Vì mật độ điện tử của các hạt nano Ag lớn hơn mật độ điện tử của các hạt nano Fe_3O_4 mà các hạt nano Ag có độ tương phản sáng hơn các hạt nano Fe_3O_4 . Các hạt nano Fe_3O_4 có kích thước khoảng 20-30 nm trong khi các hạt nano Ag nhỏ hơn, khoảng 6-12 nm.

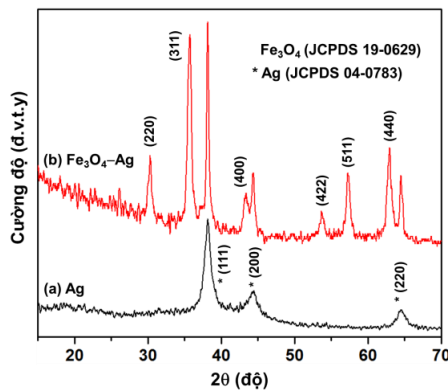


Hình 2. Ảnh TEM các hạt nano Ag

Với phản ứng thủy nhiệt tương tự nhưng không có các hạt nano Fe_3O_4 , chúng tôi cũng thu được kết tủa màu sáng, điều này chứng tỏ các hạt nano bạc đã được tạo thành. Hình 2 là ảnh TEM các hạt nano bạc tổng hợp bằng phương pháp thủy nhiệt ở 200°C trong một giờ với sự có mặt của polyvinylpyrrolidon và NH_4OH . Có thể thấy các hạt nano bạc phân bố khá đều, và có hình dạng cầu với đường kính từ 5 nm đến 22 nm.

Để khảo sát cấu trúc tinh thể cũng như thành phần pha của các vật liệu nano chế tạo được (Fe_3O_4 -Ag và Ag), chúng tôi tiến hành phân tích cấu trúc vật liệu trên máy đo nhiễu xạ tia X Siemens Bruker D5000. Hình 3 là giản đồ nhiễu xạ tia X hai mẫu vật liệu nano Fe_3O_4 -Ag và Ag. Có thể thấy giản đồ nhiễu xạ tia X của hạt nano bạc (hình 3a) có ba đỉnh nhiễu xạ ở các góc $38,1^\circ$; $44,3^\circ$ và $64,4^\circ$ tương ứng với các mặt tinh thể (111), (200) và (220) (JCPDS PDF 04-0783). Còn với vật liệu nano tổ hợp Fe_3O_4 -Ag (Hình 3b), xuất hiện thêm sáu đỉnh nhiễu xạ ở các góc $30,1^\circ$; $35,4^\circ$; $43,0^\circ$; $53,4^\circ$; $56,9^\circ$ và $62,5^\circ$, tương

ứng với các mặt tinh thể (220), (311), (400), (422), (511) và (440) của vật liệu sắt từ có cấu trúc lập phương tâm mặt (fcc) (JCPDS PDF 19-0629). Như vậy, từ các kết quả chụp ảnh TEM và giản đồ nhiễu xạ tia X, có thể khẳng định đã thành công trong việc chế tạo vật liệu nano tổ hợp Fe₃O₄-Ag.

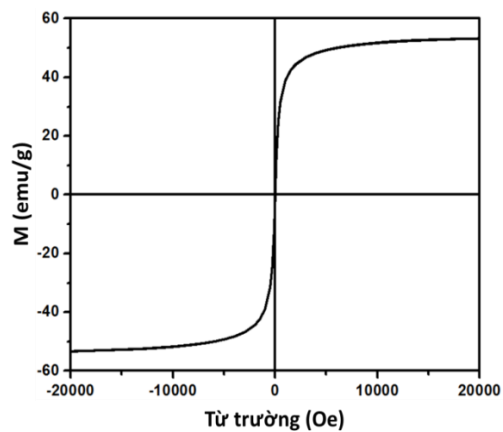


Hình 3. Giản đồ nhiễu xạ tia X của (a) hạt nano Ag và (b) vật liệu tổ hợp Fe₃O₄-Ag

Để giải thích cơ chế hình thành vật liệu nano tổ hợp Fe₃O₄-Ag, cần chú ý tới vai trò của polyvinylpyrrolidon. Trong phản ứng thủy nhiệt trình bày ở trên, polyvinylpyrrolidon vừa là chất ổn định và vừa là chất khử. Đầu tiên, các phân tử polyvinylpyrrolidon bao bọc xung quanh các hạt nano Fe₃O₄ thông qua liên kết giữa nhóm cacbonyl (C=O) trên mạch polyme của polyvinylpyrrolidon với các nguyên tử Fe của các hạt nano Fe₃O₄ [4]. Khi nhỏ từ từ dung dịch amoni vào hỗn hợp phản ứng, bạc nitrat chuyển thành phức [Ag(NH₃)₂]⁺ theo phản ứng:



Sau đó, các ion phức [Ag(NH₃)₂]⁺ được khử bởi các nhóm hydroxyl ở cuối mạch polyme của polyvinylpyrrolidon để tạo thành các hạt nano Ag trên bề mặt các hạt nano Fe₃O₄. Do đó, polyvinylpyrrolidon là cầu nối liên kết giữa các hạt nano Fe₃O₄ và Ag để tạo thành vật liệu nano tổ hợp Fe₃O₄-Ag [5]. Trong một số tài liệu, các tác giả còn cho rằng các nguyên tử Fe(II) trên bề mặt các hạt nano Fe₃O₄ có thể làm xúc tác cho quá trình khử các ion Ag⁺ thành các hạt nano Ag.

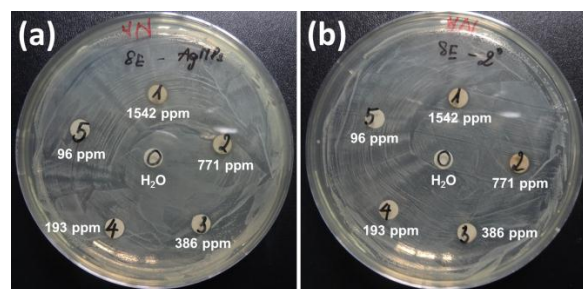


Hình 4. Tính chất từ của các mẫu vật liệu nano tổ hợp Fe₃O₄-Ag

Tính chất từ của vật liệu nano tổ hợp Fe₃O₄-Ag được khảo sát trên máy từ kế mẫu rung (VSM) ở nhiệt độ phòng (300 K) với thang đo từ -20000 đến 20000 Oe. Hình 4 là kết quả đo tính chất từ bằng máy đo từ kế mẫu rung (VSM) ở nhiệt độ phòng của mẫu vật liệu nano tổ hợp Fe₃O₄-Ag. Kết quả khảo sát cho thấy mẫu vật liệu nano tổ hợp Fe₃O₄-Ag thể hiện tính sắt từ ở nhiệt độ phòng với từ trường bão hòa (M_s) là 53,3 emu/g, từ dư (M_r) là 0,54 emu/g và lực kháng từ (H_C) là 3,89 Oe.

3.2. Hoạt tính kháng vi khuẩn *Salmonella enteritidis*

Kết quả khảo sát hoạt tính kháng vi khuẩn gram âm *Salmonella enteritidis* (nồng độ 10⁶ CFU/ml) bằng phương pháp khuếch tán đĩa với các dung dịch chứa nano bạc và vật liệu nano tổ hợp Fe₃O₄-Ag nồng độ lần lượt là 1542 ppm, 771 ppm, 386 ppm, 193 ppm và 96 ppm được trình bày trên hình 5.



Hình 5. Khảo sát khả năng kháng vi khuẩn *Salmonella enteritidis* của hai vật liệu (a) nano Ag và (b) nano tổ hợp

Có thể thấy rằng cả hai vật liệu nano bạc và nano tổ hợp $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ag}$ đều thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với chủng vi khuẩn *Salmonella enteritidis* trong khi mẫu đối chứng (chỉ có nước) không thể hiện hoạt tính này. Ở nồng độ thấp (96 ppm và 193 ppm), vật liệu tổ hợp $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ag}$ (hình 5b) hầu như không có hoạt tính kháng khuẩn. Và khi tăng nồng độ vật liệu nano tổ hợp $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ag}$, vòng vô khuẩn trên đĩa thạch mở rộng ra. Cũng ở hai nồng độ 96 ppm và 193 ppm, các hạt nano bạc (hình 5a) vẫn thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mặc dù vòng vô khuẩn có kích thước khá nhỏ. Như vậy có thể thấy vật liệu nano tổ hợp $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ag}$ có hoạt tính kháng vi khuẩn *Salmonella enteritidis* kém hơn một chút so với hạt nano Ag. Tuy nhiên ở cùng một nồng độ, dung dịch chứa vật liệu nano tổ hợp $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ag}$ có hàm lượng bạc thấp hơn so với dung dịch hạt nano bạc. Ngoài ra, nhờ tính sắt từ mà vật liệu nano tổ hợp $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ag}$ có thể thu hồi và tái sử dụng được bằng cách sử dụng từ trường ngoài.

4. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thành công trong việc chế tạo vật liệu nano tổ hợp $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ag}$ và nano bạc bằng phương pháp hóa học. Trong các phản

ứng tổng hợp, polyvinylpyrrolidon vừa đóng vai trò như một chất hoạt động bề mặt, vừa như một chất khử muối bạc nitrat thành các hạt nano Ag, đồng thời là chất liên kết các hạt nano Ag với các hạt nano Fe_3O_4 . Kết quả nghiên cứu kháng khuẩn cho thấy vật liệu nano tổ hợp ôxit sắt từ - bạc thể hiện hoạt tính kháng khuẩn với chủng vi khuẩn *Salmonella enteritidis* - loại vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm – kém hơn một chút so với vật liệu bạc. Kết quả đo tính chất từ cho thấy, vật liệu nano tổ hợp $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ag}$ có khả năng thu hồi và tái sử dụng bằng từ trường ngoài. Điều này giúp vật liệu nano tổ hợp $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ag}$ không chỉ có thể ứng dụng trong lĩnh vực kháng khuẩn mà cả trong các lĩnh vực khác như phân tách tế bào hay cảm biến sinh học.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số “103.02-2013.35”. Các tác giả chân thành cảm ơn Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương Hà Nội đã giúp đỡ thực hiện các thí nghiệm sinh học. Các tác giả cũng cảm ơn Viện Tiên tiến Khoa học và Công nghệ, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội đã cho phép sử dụng máy từ kế mẫu rung.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N.C. Bigall, W.J. Parak, and D. Dorfs, Fluorescent, magnetic and plasmonic-Hybrid multifunctional colloidal nano objects, *Nano Today*, 7, 4, p. 282-296, 2012.
- [2] J. Zhu, B. Zhang, J. Tian, J. Wang, Y. Chong, X. Wang, Y. Deng, M. Tang, Y. Li, C. Ge, Y. Pan, and H. Gu, Synthesis of heterodimer radionuclide nanoparticles for magnetic resonance and single-photon emission computed tomography dual-modality imaging, *Nanoscale*, 7, 8, p. 3392-3395, 2015.
- [3] M. Kooti, S. Saiahi, and H. Motamedi, Fabrication of silver-coated cobalt ferrite nanocomposite and the study of its antibacterial activity, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 333, p. 138-143, 2013.
- [4] K.M. Koczukur, S. Mourdikoudis, L. Polavarapu, and S.E. Skrabalak, Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis, *Dalton Transactions*, 44, 41, p. 17883-17905, 2015.
- [5] I. Washio, Y. Xiong, Y. Yin, and Y. Xia, Reduction by the end groups of poly (vinyl pyrrolidone): a new and versatile route to the kinetically controlled synthesis of Ag triangular nanoplates, *Advanced Materials*, 18, 13, p. 1745-1749, 2006.

Thông tin liên hệ:

Vũ Ngọc Phan

Điện thoại: 0902713838 - Email: phan.vungoc@hust.edu.vn

Viện Tiên tiến Khoa học và Công nghệ (AIST), Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.

