

**BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**  
**VIỆN NĂNG LƯỢNG NGUYÊN TỬ VIỆT NAM**

**BÁO CÁO TỔNG KẾT**  
**ĐỀ TÀI KHOA HỌC CÔNG NGHỆ CẤP CƠ SỞ**  
**NĂM 2018**

**NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO VẬT LIỆU NANOCOMPOSITE – BẠC NANO/DIATOMITE BẰNG PHƯƠNG PHÁP CHIẾU XẠ CHùm TIA ĐIỆN TỬ ĐỂ XỬ LÝ VI SINH VẬT GÂY BỆNH NHIỄM TRONG NƯỚC NUÔI CÁ TRA**

**Mã số: CS/18/07-01**

**Cơ quan chủ trì: Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ Bức xạ**  
**Chủ nhiệm đề tài: TS., NCVC Trương Thị Hạnh**

**TP. HỒ CHÍ MINH, THÁNG 04/2019**

## **DANH SÁCH NHỮNG NGƯỜI THAM GIA THỰC HIỆN ĐỀ TÀI**

<b>STT</b>	<b>Họ và tên</b>	<b>Chức vụ, chức danh</b>	<b>Tên đơn vị, cơ quan</b>
1	Trương Thị Hạnh	TS, NCVC	Trung tâm Nghiên cứu & Triển khai Công nghệ Bức xạ
2	Nguyễn Quốc Hiến	PGS,TS, NCVCC	-nt-
3	Nguyễn Thị Thu	CN, NCV	-nt-
4	Lê Anh Quốc	ThS	-nt-
5	Lê Hồng Phước	TS, Giám đốc	Trung Tâm Quan Trắc Môi Trường & Bệnh Thủy Sản Nam Bộ - Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 2

### **CƠ QUAN PHỐI HỢP THỰC HIỆN ĐỀ TÀI**

Trung Tâm Quan Trắc Môi Trường & Bệnh Thủy Sản Nam Bộ

Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 2

## MỤC LỤC

Nội dung	Trang
Từ viết tắt, ký hiệu và các thuật ngữ khoa học	3
Danh mục các bảng và hình vẽ	4
Tóm tắt	5
<b>PHẦN I. MỞ ĐẦU</b>	5
1. Nhu cầu, lý do dẫn đến việc thực hiện nhiệm vụ KHCN	6
2. Tóm tắt thông tin liên quan đến nhiệm vụ KHCN:	6
✓ Mục tiêu, nội dung nghiên cứu chính	6
✓ Kết quả chính	7
<b>PHẦN II. LÝ THUYẾT TỔNG QUAN</b>	8
II.1. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước	8
II.2. Cơ sở lý luận, phương pháp luận, công cụ kỹ thuật, biện pháp để thực hiện đề tài	9
<b>PHẦN III. NGHIÊN CỨU THỰC NGHIỆM –THẢO LUẬN KẾT QUẢ</b>	14
<b>III.1. NGHIÊN CỨU THỰC NGHIỆM</b>	
III.1.1. Chế tạo nanocomposite bạc nano diatomite AgNPs/DA	14
III.1.2. Khảo sát các đặc trưng của nanocomposite AgNPs/DA	15
III.1.3. Hoạt tính kháng khuẩn của nanocomposite AgNPs/DA	15
<b>III.2. THẢO LUẬN KẾT QUẢ</b>	17
III.2.1. Chế tạo nanocomposite AgNPs/DA	17
III.2.1.1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ AgNO <sub>3</sub> ban đầu đến kích thước hạt AgNPs trong nanocomposite	18
III. 2.1.2. Môi trường quan giữa liều xạ và kích thước hạt	19
III.2.1.3. Hàm lượng AgNPs trong nanocomposite khi chiếu xạ huyền phù AgNO <sub>3</sub> /DA ( <i>in-situ</i> ) và khi chiếu xạ tạo AgNPs trước ( <i>ex-situ</i> )	21
III.2.2. Những đặc trưng của nanocomposite AgNPs/DA	22
III.2.3. Hoạt tính kháng khuẩn của nanocomposite AgNPs/DA	26
<b>PHẦN IV. KẾT LUẬN</b>	29
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	30
<b>DANH MỤC CÁC BÀI BÁO, BÁO CÁO LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI</b>	34
Phụ lục 1: Bảng 5: Kết quả hoạt tính kháng khuẩn các mẫu nanocomposite AgNPs/DA với <i>A. hydrophila</i>	35
Phụ lục 2: Bảng 6: Kết quả hoạt tính kháng khuẩn các mẫu nanocomposite AgNPs/DA với <i>E. ictaluri</i>	36
Bảng 7: Kết quả hoạt tính kháng khuẩn các mẫu AgNPs/DA với vi khuẩn tổng số	36
Quy trình chế tạo nanocomposite AgNPs/DA theo phương pháp khử <i>in situ</i> bằng bức xạ chùm tia điện tử	
Hợp đồng với Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản 2 và các kết quả phân tích.	
Thuyết minh đề tài	
Báo cáo Hội nghị	
Xác nhận chỉnh sửa báo cáo của cơ quan	
Biên bản xác nhận tài chính	

## TỪ VIẾT TẮT, KÝ HIỆU VÀ THUẬT NGỮ KHOA HỌC

- Liều hấp thụ  $D = dE/dm$  là năng lượng bức xạ được hấp thụ bởi một đơn vị khối lượng vật chất. Đơn vị liều hấp thụ trong hệ SI là Gray (ký hiệu là Gy);  $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$
- EB (Electron beam): chùm tia điện tử
- TEM (Transmission electron microscopy): Kính hiển vi điện tử truyền qua
- SEM (Scanning Electron Microscopy): Kính hiển vi điện tử quét
- EDX: Energy Dispersive X-ray: Tán sắc năng lượng tia X
- ICP-AES (Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy): Phổ phát xạ nguyên tử - Plasma cảm ứng
- nm: Nano mét =  $10^{-9}$  mét; ppm: Nồng độ một phần triệu (part per million)
- 1mM (milimol) =  $10^{-3}$  M: Nồng độ mol
- AgNPs/DA: Bạc nano/diatomite (Công ty diatomite Phú Yên)
- *E. coli*: *Escherichia coli*, *A. Hydrophila*: *Aeromonas hydrophila* và *E. Ictaluri*: *Edwardsiella ictaluri*
- Nanocomposite: Là vật liệu mà hợp phần với ít nhất một “pha” có kích thước nano ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ) trong polyme hoặc chất nền vô cơ [1].
- Các ký hiệu trong các bảng 3, 4, 5, 6:
  - $\text{Ag}^0\text{-DA1S}$ ,  $\text{Ag}^0\text{-DA3S}$ ,  $\text{Ag}^0\text{-DA5S}$ ,  $\text{Ag}^0\text{-DA7S}$ ,  $\text{Ag}^0\text{-DA10S}$ : Nanocomposite với 100, 300, 500, 700, 1000 ppm Ag nano (Diatomite Phú Yên).
  - $\text{Ag}^0\text{-DA1}$ ,  $\text{Ag}^0\text{-DA3}$ ,  $\text{Ag}^0\text{-DA5}$ ,  $\text{Ag}^0\text{-DA7}$ ,  $\text{Ag}^0\text{-DA10}$ : Nanocomposite từ huyền phù  $\text{AgNO}_3/\text{DA}$  1, 3, 5, 7, 10 mM  $\text{Ag}^+$  tương ứng (Diatomite Phú Yên).
  - NT1, NT2, NT3, NT4: Viết tắt nghiệm thức thử nghiệm 1, 2, 3, 4 tương ứng
  - AgNPs/DAT3: Nanocomposite bạc nano và diatomite trên thị trường (Trung Quốc -TQ) – Thử nghiệm đợt 1
  - AgNPs/DAP3: Nanocomposite bạc nano và diatomite Phú Yên – Thử nghiệm đợt 1
  - AgNPs/DAP: Nanocomposite bạc nano và diatomite Phú Yên – Đợt 2
  - 2 % (w/v): Tỷ lệ giữa nanocomposite và nước nuôi cá (vi khuẩn tổng số) hoặc dịch khuẩn (thử vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* và *Edwardsiella ictaluri*)
  - $10^3\text{-}10^4$ : Mật độ vi khuẩn (CFU/ml)

## DANH MỤC CÁC BẢNG VÀ HÌNH VẼ

STT	Bảng	Trang
1	Kích thước hạt bạc nano theo nồng độ AgNO <sub>3</sub> ban đầu	19
2	Mối liên quan giữa liều xạ và kích thước hạt	21
3	Hàm lượng AgNPs theo nồng độ với phương pháp <i>in-situ</i> và <i>ex-situ</i>	22
4	Thành phần nguyên tố của AgNPs/DA nanocomposite	25
5	Kết quả hoạt tính kháng khuẩn của các mẫu nanocomposite AgNPs/DA với <i>Aeromonas hydrophila</i>	35
6	Kết quả hoạt tính kháng khuẩn của các mẫu nanocomposite AgNPs/DA với <i>Edwardsiella ictaluri</i>	36
7	Kết quả hoạt tính kháng khuẩn các mẫu AgNPs/DA với vi khuẩn tổng số	36
<b>Hình vẽ</b>		
1	Cấu trúc của DA và quá trình dehydrate hóa của DA-silica	9
2	Phản ứng của bạc nano với tế bào vi khuẩn	10
3	Cá Tra bị bệnh xuất huyết	13
4	Cá Tra bị bệnh gan thận mũ	13
5	Ảnh TEM của mẫu nanocomposite AgNPs/DA: o) DA; a) DA/3M AgNO <sub>3</sub> ; b) DA/5M AgNO <sub>3</sub> ; DA/7M AgNO <sub>3</sub> ; DA/9M AgNO <sub>3</sub> DA/10M AgNO <sub>3</sub>	18
6	Ảnh TEM và sự phân bố kích thước hạt của AgNPs trong nanocomposite AgNPs/DA tại các liều xạ a) 6,5; b) 13,4; c) 20,2 và d) 25,9 kGy	20
7	7a: Phổ UV-Vis của AgNPs: a) 6,5 kGy; b) 13,4 kGy; 20,2 kGy và 25,9 kGy	23
	7b: Mối liên quan giữa độ hấp thụ quang cực đại và liều xạ	24
8	Phổ tán sắc năng lượng tia X của các mẫu Da (O), nanocomposite AgNPs/DA: a) 6,5; 13,4; 20,2 và 25,9 kGy	25
9	Ảnh SEM: a) DA; b) AgNPs/DA	26
10	Thí nghiệm định tính về hoạt tính kháng khuẩn của AgNPs/DA đối với <i>E. coli</i>	26
11	Kết quả thí nghiệm kháng khuẩn <i>E.coli</i> nồng độ 10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup> CFU/ml với nhóm A: Môi trường LB, nhóm B: có mẫu AgNPs/DA	27
12	Thử nghiệm kháng khuẩn với: A) <i>Aeromonas hydrophila</i> và b) <i>Edwardsiella ictaluri</i> trên môi trường BHIA của mẫu đối chứng – ĐC (có khuẩn lạc và AgNPS/DA (không khuẩn lạc)	28

### NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO VẬT LIỆU NANOCOMPOSITE – BẠC NANO/DIATOMITE BẰNG PHƯƠNG PHÁP CHIẾU XẠ CHÙM TIA

# DIỆN TỬ ĐỂ XỬ LÝ VI SINH VẬT GÂY BỆNH NHIỄM TRONG NƯỚC NUÔI CÁ TRA

## TÓM TẮT

Chiếu xạ chùm tia điện tử hỗn hợp AgNO<sub>3</sub>/chitosan/diatomite để tổng nanocomposite bạc nano (AgNPs)/diatomite (DA) đã được khảo sát. Ion Ag<sup>+</sup> từ dung dịch AgNO<sub>3</sub> 10 mM ban đầu được khử thành Ag<sup>0</sup> và keo tụ trên DA tạo nanocomposite AgNPs/DA. Ảnh TEM đã chứng minh AgNPs hình cầu với đường kính 5-10 nm đạt được ứng với liều hấp thụ từ 5 đến 25 kGy. AgNPs được tách từ huyền phù AgNO<sub>3</sub>/DA đã chiếu xạ có đỉnh đặc trưng ở vùng bước sóng 417- 422 nm. Phổ tán sắc năng lượng tia X (EDX) của DA so với nanocomposite AgNPs/DA xác nhận sự có mặt của nguyên tử Ag<sup>0</sup> trong DA. Hoạt tính kháng khuẩn của AgNPs/DA đối với *E. coli* và vi khuẩn gây bệnh cho cá Tra ((*Pangasianodon hypophthalmus*) như *Aeromonas hydrophila* và *Edwardsiella ictaluri* đã được đánh giá.

## STUDY ON PREPARATION OF SILVER NANOPARTICLES/DIATOMITE NANOCOMPOSITE BY ELECTRON BEAM IRRADIATION METHOD FOR TREATMENT OF PATHOGENOUS BACTERIA IN CULTURE WATER OF TRA CATFISH

### ABSTRACT

Electron beam (EB) irradiation of suspension mixture of AgNO<sub>3</sub>/chitosan/diatomite to synthesise the silver nanoparticles (AgNPs)/diatomite (DA) nanocomposite was investigated. The Ag<sup>+</sup> ions of 10 mM AgNO<sub>3</sub> precursor were reduced to Ag<sup>0</sup> atoms and aggregated on DA forming AgNPs/DA nanocomposite. The TEM images demonstrated the AgNPs were spherical with an average diameter of 5-10 nm obtained by EB irradiation in the range of doses from 5 to 25 kGy. The AgNPs which were separated from irradiated AgNO<sub>3</sub>/DA suspension were characterized by UV-Vis spectra with a maximal peak at around 417- 422 nm. Energy dispersive X-ray (EDX) spectra for DA and AgNPs/DA nanocomposites confirmed the presence of atomic Ag in DA. The antibacterial activity of the AgNPs/DA against bacteria of *E. coli* and infectious pathogens for Tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) catfish such as *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella ictaluri* was evaluated.

## Phần I- MỞ ĐẦU

### 1. Nhu cầu, lý do dẫn đến việc thực hiện nhiệm vụ KHCN:

Việc phát hiện và xử lý sớm môi trường nước ao nuôi cá bị nhiễm khuẩn là vô cùng cần thiết và liên quan đến sản lượng tránh gây thiệt hại về kinh tế.

Sử dụng các hóa chất như vôi bột ( $\text{CaCO}_3$ ), Chlorine hoặc Formadehyde... để xử lý môi trường nước hồ dễ bị tồn dư không an toàn cho người. Ngoài ra, các chế phẩm sinh học có hiệu quả chưa thuyết phục, đó cũng là một rào cản trong xuất khẩu thủy sản. Hiện tại, diatomite tự nhiên đã được sử dụng để làm sạch môi trường hồ cá, hấp phụ các khí  $\text{NH}_4$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ , làm giàu lượng ô-xy trong nước. Nếu vật liệu được biến tính kết hợp thêm tác nhân kháng khuẩn như bạc nano tạo nanocomposite: bạc nano/diatomite thì giá trị sử dụng được sẽ tăng gấp bội. Đề tài này là một nghiên cứu mới sử dụng kỹ thuật bức xạ chế tạo vật liệu nanocomposite, hơn nữa sản phẩm của đề tài đáp ứng nhu cầu cần thiết của ngành nuôi trồng thủy hải sản.

### 2. Tóm tắt thông tin liên quan đến nhiệm vụ KHCN:

#### + Mục tiêu:

Cố định bạc nano trên chất mang diatomite để chế tạo vật liệu có khả năng giảm nhiễm vi sinh gây bệnh đốm đỏ (*Aeromonas hydrophila*) và gan thận mũ (*Edwardsiella ictaluri*) lây lan trong nước nuôi cá Tra.

#### + Nội dung nghiên cứu chính:

- ✓ Nội dung 1: Chế tạo nanocomposite AgNPs/DA bằng phương pháp chiếu xạ chùm tia điện tử:
  - Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ  $\text{Ag}^+$  (1-10 mM)/dung dịch chitosan 1% đến kích thước hạt AgNPs, khi chiếu xạ huyền phù  $\text{AgNO}_3/\text{DA}$
  - Lựa chọn liều xạ để đạt kích thước hạt AgNPs từ 5-30 nm.
  - Xác định hàm lượng AgNPs khi chiếu xạ huyền phù  $\text{AgNO}_3/\text{DA}$  (*in-situ*) và khi chiếu xạ tạo Ag nano trước (*ex-situ*)
- ✓ Nội dung 2: Khảo sát các đặc trưng của vật liệu (UV-Vis, TEM, SEM, EDX, ICP-AES...)
- ✓ Nội dung 3: Hoạt tính kháng khuẩn của AgNPs/DA đối với chủng *Escherichia coli* (*E. coli*)
- ✓ Nội dung 4: Hoạt tính kháng khuẩn của vật liệu AgNPs/DA đối với:

- Vi sinh tổng số
- Vi khuẩn: *Aeromonas hydrophila* (*A. Hydrophila*) - gây bệnh đốm đỏ  
*Edwardsiella ictaluri* (*E. ictaluri*) - gây bệnh gan thận mũ trên cá Tra (*in vitro*)

**+ Kết quả chính:**

- ✓ Chế tạo nanocomposite:
  - Nồng độ Ag<sup>+</sup> (1-10 mM) kích thước hạt trung bình 5 – 10 nm
  - Liều hấp thụ: 6,5; 13,4; 20,2 và 25,9 kGy kích thước hạt tương ứng: 5,5; 6,9; 9,3 và 8,9 nm
  - Nồng độ 1-10 mM AgNO<sub>3</sub> ban đầu hàm lượng AgNPs trong DA 201-1210 mg/kg tổng hợp *ex-situ*; đạt 353-1300 mg/kg tổng hợp *in - situ*
- ✓ Đặc trưng của vật liệu nanocomposite:
 

Phổ UV-Vis có đỉnh hấp thụ cực đại tại 417- 422 nm

Ảnh TEM thể hiện sự hiện diện của Ag nano hình cầu và xác định được kích thước hạt AgNPs < 10 nm.

Ảnh SEM cũng chứng minh AgNPs trong các hốc rỗng của cấu trúc xốp DA, phổ EDX xác nhận thành phần nanocomposite AgNPs/DA có thêm Ag<sup>0</sup> nguyên tử so với DA.
- ✓ Hoạt tính kháng khuẩn:
  - Hiệu ứng kháng khuẩn *E coli* của vật liệu nanocomposite AgNPs/DA (0,5 µg/ml) là 100%
  - Hiệu ứng kháng *Aeromonas hydrophila* và *Edwardsiella ictaluri* tăng theo nồng độ AgNPs trong thành phần nanocomposite đạt 100 % khi có 0,13 % AgNPs trong thành phần.

**+ Kinh phí được cấp:** 80 triệu đồng



## PHẦN II. LÝ THUYẾT TỔNG QUAN

### II.1. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước

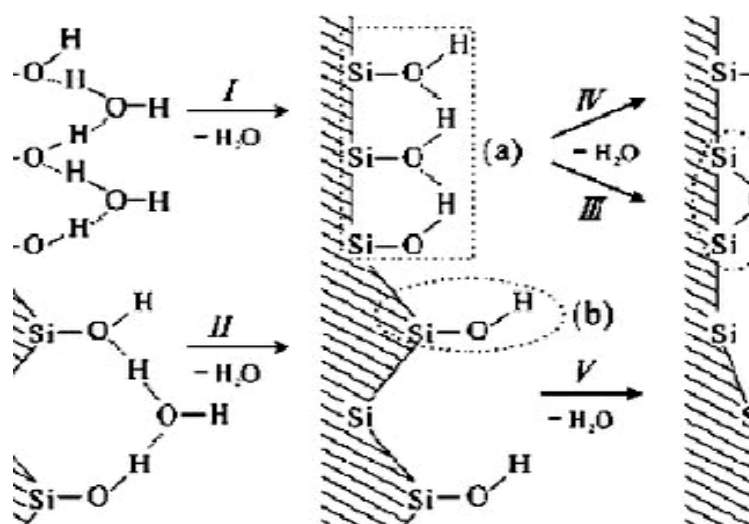
Nanocomposite là vật liệu mà hợp phần có ít nhất một “pha” với kích thước nano ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ) trong polyme hoặc chất nền vô cơ [1].

Vật liệu nanocomposite cải tiến được những đặc trưng vốn có của hạt nano và chất nền. Hạt nano nhận được sự quan tâm trong lĩnh vực vật liệu cũng như hóa học nhờ khả năng phản ứng bề mặt cao và những tính chất hóa lý đồng nhất [2]. Đặc biệt, bạc nano có hoạt tính kháng khuẩn cao ngoài những đặc trưng khác. Nó hạn chế sự phát triển của vi khuẩn, tấn công và phá vỡ màng tế bào của nhiều loại vi khuẩn đơn bào gây hại như: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Klebsiella pneumoniae*, (*K. pneumoniae*), *Escherichia coli* (*E. coli*) ... [3]. Cũng như các kim loại nano khác, bạc nano có thể chế tạo bằng nhiều phương pháp như khử hóa học, quang hóa, điện hóa, bức xạ ... [4, 5, 6]. Tuy nhiên, sử dụng bức xạ gamma hay electron beam (EB) để chế tạo kim loại nano được đánh giá là phương pháp mới và thân thiện môi trường. Ưu điểm của phương pháp khử hóa bức xạ là quy trình đơn giản, sản phẩm có độ tinh khiết cao và kích thước hạt ổn định đồng thời không tạo sản phẩm phụ. Nhiều nhà khoa học đã sử dụng chất bền hóa là polyme tự nhiên như alginate, tinh bột và đặc biệt là chitosan để ổn định kích thước hạt keo [6, 7, 8]. Vỏ bọc chitosan của hạt keo mang điện tích dương có khả năng liên kết với các nhóm chức khác thông qua lực hấp dẫn tĩnh điện hoặc liên kết hydro [8]. Hơn nữa sự có mặt chitosan tăng cường hoạt tính kháng khuẩn của vật liệu.

He và cộng sự (2014) đã công bố rằng khi ngâm silica ( $\text{SiO}_2$ ) trong  $\text{Ag}^0$  nano có chitosan thì lượng  $\text{Ag}^0$  được “gắn” trên silica sẽ cao hơn trong trường hợp không có chitosan. Những nhóm  $-\text{NH}_2$  có thể liên kết với  $\text{Ag}^+$  tạo ra phức “chelate” trước khi khử  $\text{Ag}^+$  tạo  $\text{Ag}^0$  bằng tác nhân sodium borohydride ( $\text{NaBH}_4$ ). Tác giả cũng đã tìm thấy sự bất hoạt *E. coli* đã tăng theo lượng chitosan trong nanocomposite và sản phẩm có triển vọng cho mục đích xử lý nước [9].

So với các chất nền vô cơ khác (Titan oxit -  $\text{TiO}_2$ , alumina -  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), vật liệu  $\text{SiO}_2$  hoặc hợp chất chứa  $\text{SiO}_2$  (Zeolite, montmorillonite, diatomite...) được sử dụng phổ biến làm giá thể cố định bạc nano. Xuất phát do  $\text{SiO}_2$  có tính bền nhiệt, bền hóa học và

có cấu trúc dễ phân tán...[10]. Diatomite – silica là một vật liệu hấp dẫn cho những ứng dụng công nghiệp bởi giá thành thấp, độ xốp cao, kích thước hạt nhỏ và dung lượng hấp phụ lớn [11]. Vật liệu có mặt DA trong thành phần có thể sử dụng làm chất trợ lọc, chất cách nhiệt, chất hấp phụ và chất mang [12]. Những nhóm hydroxyl hoạt hóa ở vùng vô định hình liên quan đến nhiều đặc tính của DA-silica (Hình 1).



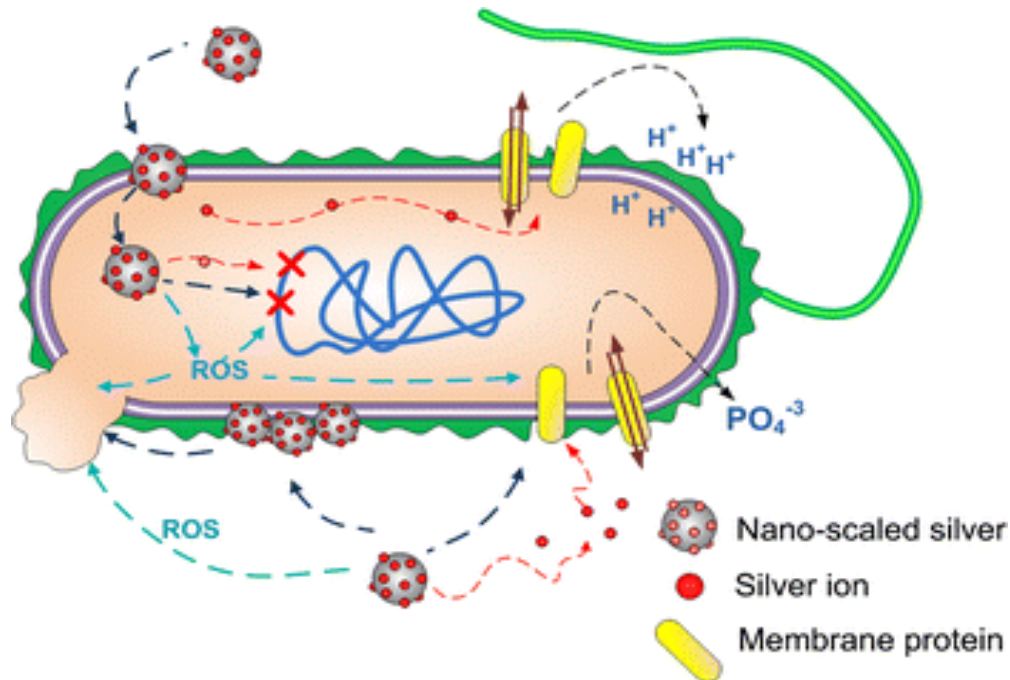
Hình 1: Cấu trúc của DA và quá trình dehydrate hóa của DA-silica [11].

Tại Việt Nam, nhiều nhà khoa học cũng đã và đang quan tâm đến vấn đề chế tạo và ứng dụng của vật liệu nano, nanocomposite. Với các chất khử như formaldehyt, đường gluco hoặc hydroxylamin cũng có thể khử các muối như bạc nitrat tạo bạc nano kích thước ~ 10 nm với chất ổn định polyvinylalcol (PVA). Nếu phủ vật liệu nano này trên silicagel thì khả năng diệt khuẩn rất tốt [13]. Tại Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ Bức xạ đã có đề tài áp dụng phương pháp chiếu xạ chế tạo bạc nano gắn lên vật liệu sứ xốp như phễu lọc vi sinh. Nước lọc qua sứ xốp có Ag nano không bị nhiễm *E. coli* so với mẫu đối chứng có nồng độ vi khuẩn này  $3 \times 10^4$  CFU/100 ml [14].

## II.2. Cơ sở lý luận, phương pháp luận, công cụ kỹ thuật, biện pháp thực hiện đề tài:

Cơ chế kháng khuẩn bạc nano được đề nghị rằng, khi thâm nhập vào màng vách tế bào bạc nano sẽ tăng tính thấm và làm rối loạn quá trình hô hấp. Đồng thời, nó cũng xúc tác phản ứng với oxy tạo những sản phẩm dạng oxy hoạt hóa (reactive oxygen species - ROS) phá vỡ cấu trúc ADN, protein và màng vách tế bào. Xúc tác bạc nano

có thể phá vỡ cầu nối disulfua làm mất tác dụng tổng hợp tế bào vi khuẩn (Hình 2). Những ion bạc được tạo thành bởi sự oxi hóa bạc nano có thể bẻ gãy sản phẩm ATP (adenosine triphosphate) ức chế sự hấp phụ phot-phat của protein [3]. Đó là những lý do mà dẫn đến hoạt tính kháng khuẩn hiệu quả của bạc nano.



Hình 2: Phản ứng của bạc nano với tế bào vi khuẩn

Tổng hợp vật liệu Ag nanocomposite là một phương pháp thích hợp để khai thác tính năng của bạc. Đặc biệt, sử dụng năng lượng bức xạ để chế tạo vật liệu nano và nanocomposite đảm bảo cả về lượng và chất, vừa là kỹ thuật mới về khoa học vừa mang tính thực tiễn cao. Chúng tôi đã chế tạo được vải cotton và peco gắn bạc nano và đã được Viện kiểm nghiệm thuốc Trung Ương thử nghiệm không gây kích ứng da, có khả năng kháng khuẩn đối với hai chủng *S.aureus* và *E.coli* ~100% sau 60 lần giặt. Hoạt tính kháng khuẩn >95% với các chủng vi sinh kháng thuốc khi thử nghiệm lâm sàng tại Bệnh viện [15, 16]. Những kết quả chứng minh rằng vải phủ bạc nano là một vật liệu an toàn và kháng khuẩn hiệu quả có thể sử dụng trong môi trường lây nhiễm cao. Sản phẩm bước đầu đã được thị trường chấp nhận, chúng tôi đã đáp ứng yêu cầu phủ nano bạc lên vải cho một số công ty có nhu cầu để may khẩu trang, quần áo bảo hộ....

Tiếp tục hướng nghiên cứu trên, chúng tôi muốn tổng hợp sản phẩm nanocomposite cho ngành nuôi trồng thủy hải sản được xác định là một ngành kinh tế

mũi nhọn. Hiện nay, các bệnh do các vi khuẩn như *Aeromonas hydrophila* (gây bệnh đốm đỏ), *Edwardsiella ictaluri* (gây bệnh gan thận mũ trên cá) hoặc *Edwardsiella tarda* (gây bệnh nhiễm khuẩn máu) đã và đang gây thiệt hại lớn cho người nuôi cá thâm canh. Tỷ lệ cá chết do nhiễm bệnh từ môi trường là rất cao. Việc phát hiện và xử lý sớm môi trường nước bị nhiễm khuẩn là vô cùng cần thiết tránh gây thiệt hại về kinh tế. Sử dụng các hóa chất như vôi bột ( $\text{CaCO}_3$ ), Chlorine hoặc Formadehyde,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ... để xử lý môi trường nước hồ thủy sản dễ bị tồn dư và không an toàn cho người sử dụng [17]. Ngoài ra, các chế phẩm sinh học và men vi sinh có hiệu quả chưa thuyết phục, đó cũng là một rào cản trong xuất khẩu thủy sản. Nghiên cứu chế tạo vật liệu mới thân thiện môi trường thay thế hóa chất truyền thống và đạt tỉ lệ kháng khuẩn cao là một hướng nghiên cứu thiết thực.

*Aeromonas hydrophila* gây bệnh xuất huyết còn được gọi là bệnh đốm đỏ hoặc bệnh nhiễm trùng máu [18]. Đây là một trong những bệnh xuất hiện tần số cao nhất trên cá Tra ở đồng bằng sông Cửu Long (Hình 3). Bệnh thường xuất hiện hầu như quanh năm, đặc biệt là khi cá bị sốc, môi trường ao nuôi không đảm bảo.

Vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* là tác nhân chính gây ra bệnh gan thận mũ [19]. Vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh chủ yếu ở cá da trơn nuôi thâm canh và trên một số loài cá da trơn khác (Hình 4). Điều trị bệnh sẽ có hiệu quả hơn nếu phát hiện ở giai đoạn sớm. Tuy nhiên, theo các kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy vi khuẩn gây bệnh này đã có hiện tượng kháng thuốc. Xử lý môi trường ao nuôi bằng những sản phẩm “xanh” có nguồn gốc tự nhiên để phòng bệnh cho cá, tránh tồn dư hóa chất độc hại là yếu tố phát triển bền vững cho hệ sinh thái.

Theo Handy (2012), giá trị nồng độ gây chết (LC50) trong 48 - 96 giờ của nano kim loại (NP) ở cá và động vật không xương sống chủ yếu ở 1-10 mg/l [20]. Những giá trị này biểu thị độc tính cấp tính thấp đối với nhiều NP như Ag, Cu, Zn, do đó mối đe dọa đối với hệ thống nuôi trồng thủy sản và nghề cá của NP rất nhỏ. Arora và cộng sự (2009) đã nghiên cứu phản ứng của AgNP với các tế bào động vật có vú, kết quả cho thấy hình thái nguyên bào sợi sơ cấp và tế bào gan vẫn không thay đổi khi có sự hiện diện của AgNP với nồng độ lần lượt là 25  $\mu\text{g/ml}$  và 100  $\mu\text{g/ml}$  [21]. Sử dụng AgNP đường uống với liều giới hạn 5.000 mg/kg không có dấu hiệu độc tính cấp đối với chuột, các chất có giá trị LD50 lớn hơn 5.000 mg/kg trọng lượng cơ thể được coi là có độc tính thấp [22]. Kiểm soát nồng độ AgNP phù hợp để xử lý vi khuẩn gây bệnh

trong ao nuôi cá, dựa trên dữ liệu độc tính sinh thái môi trường nuôi trồng thủy sản và để đảm bảo an toàn cho tế bào động vật, ở mức độ cao hơn cho sức khỏe người tiêu dùng là quan trọng nhất.

Hiện tại, diatomite ( $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ) tự nhiên đã được sử dụng để làm sạch môi trường hồ cá, hấp phụ các khí  $\text{NH}_4$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ , làm giàu ô-xy trong nước, ổn định lượng thức ăn có trong ao. Nếu diatomite (DA) được biến tính kết hợp thêm tác nhân kháng khuẩn như bạc nano (AgNPs) tạo composite: bạc nano/diatomite (AgNPs/DA) thì giá trị sử dụng sẽ tăng gấp bội.

Trên cơ sở đó, chúng tôi mở đề tài: **“Nghiên cứu chế tạo vật liệu nanocomposite - bạc nano/diatomite bằng phương pháp chiếu xạ chùm tia điện tử để xử lý vi sinh vật gây bệnh nhiễm trong nước nuôi cá Tra”**.



*Hình 3: Cá tra bị bệnh xuất huyết*



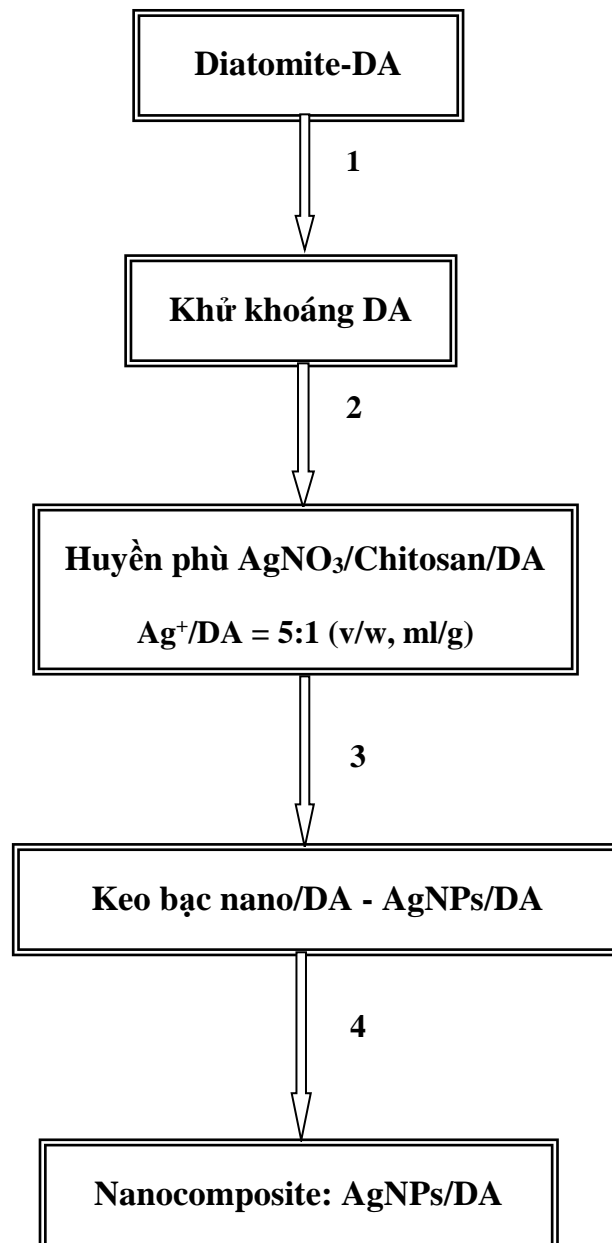
*Hình 4: Cá Tra bị bệnh gan, thận mũ*

## PHẦN III. NGHIÊN CỨU THỰC NGHIỆM – THẢO LUẬN KẾT QUẢ

### III.1. NGHIÊN CỨU THỰC NGHIỆM

#### III.1.1. Chế tạo nanocomposite bạc nano diatomite AgNPs/DA

##### 1. Khử in-situ



Sơ đồ 1: Sơ đồ khối các công đoạn thực hiện quy trình chế tạo nanocomposite AgNPs/DA theo phương pháp khử in situ bằng bức xạ chùm tia điện tử

Mô tả các công đoạn:

*Công đoạn 1:* Mẫu DA được ngâm trong dung dịch 3% HCl để loại khoáng, rồi rửa cho đến trung tính bằng nước cất và sấy ở 110°C.

*Công đoạn 2:* Khuấy dung dịch huyền phù AgNO<sub>3</sub>/chitosan 1%/DA tỉ lệ 5:1 = 50 ml Ag<sup>+</sup>/chitosan:10 g DA (2).

*Công đoạn 3:* Đóng gói mẫu trong túi PE dày 1cm, rồi chiếu xạ trên máy EB từ 5-25 kGy với cùng suất liều 5 kGy/s.

*Công đoạn 4:* Tách nanocomposite khỏi dung dịch huyền phù, rửa rồi sấy 80°C. Thu sản phẩm nanocomposite: AgNP/DA dạng bột.

## **2. Phương pháp ex-situ (Tạo bạc nano trước)**

Chiếu xạ dung dịch AgNO<sub>3</sub> với các nồng độ 1, 3, 5, 7, 10 mM tại 20 kGy. Ngâm DA trong dung dịch chất “gắn kết” amino silan: 3-amino propyl triethoxysilan (APTES) 1% trong ethanol. Rồi sấy DA đã xử lý trước khi khuấy với dung dịch keo bạc nano đã chiếu xạ cũng với tỉ lệ Ag<sup>+</sup>/DA = 5:1 (v/w, ml/g).

### **III.1.2. Khảo sát các đặc trưng của nanocomposite AgNPs/DA**

Phổ UV-Vis của AgNPs được tách ra từ huyền phù AgNO<sub>3</sub>/DA đã chiếu xạ được ghi đo trên máy quang phổ V-630 (Jasco V-630, Nhật Bản) trong vùng bước sóng từ 200-600 nm. Phổ EDX và ảnh SEM được thực hiện trên thiết bị SEM S4800 (Hitachi, Nhật Bản) tích hợp với dụng cụ phân tích X-ray (H7593 (Horiba, England). Ảnh TEM được chụp với kính hiển vi điện tử JEM-1400 ở 100 kV (JEOL, Nhật Bản). Kích thước hạt và tần số được xác định dựa vào ảnh TEM, bằng phương pháp đếm, sử dụng phần mềm Adobe Photoshop CS2 phiên bản 9.0. Hàm lượng AgNPs trong nanocomposite được xác định qua phổ phát xạ nguyên tử cảm ứng plasma (ICP-AES, Perkin Elmer Optima 5300 DV, USA).

### **III.1.3. Hoạt tính kháng khuẩn của nanocomposite AgNPs/DA**

#### **✓ *E coli:***

- Thử nghiệm khuếch tán đĩa được thực hiện bằng cách đặt các mẫu giấy hình cầu có tẩm nước cất khử trùng (mẫu trắng) và mẫu AgNPs/DA trên những đĩa agar có cấy vi khuẩn *E. coli*. Hiệu ứng kháng *E. coli* dựa vào đường kính vùng ức chế vi khuẩn sau 24 giờ nuôi cấy ở 37°C.
- Hiệu ứng kháng khuẩn của nanocomposite AgNPs/DA đối với *E. coli* (ATCC 6538) được xác định theo phương pháp trải trên đĩa agar có một vài cải biến [23]. Huyền phù dịch khuẩn được chuẩn bị ở nồng độ 10<sup>6</sup> CFU/ml. Rồi 500 mg chất



thử AgNPs/DA cho vào 10 ml dịch khuẩn, ủ trong 3 giờ. Ly tâm thu dịch nổi, pha loãng ở các nồng độ thích hợp. Từ mỗi hỗn dịch pha loãng lấy 0,1 ml cấy trải trên các đĩa thạch LB, ủ tại nhiệt độ 37°C, rồi đếm sau 24 giờ. Phần trăm khử khuẩn được xác định dựa trên số đếm khuẩn lạc trên đĩa mẫu thí nghiệm so với đối chứng (nước khử trùng).

✓ **Vi sinh tổng số (từ nước bể nuôi cá)**

- *Nghiệm thức thử nghiệm:*

Nước thử nghiệm được lấy ở bể composite nuôi cá Tra mật độ 2000 con/bể 2 m<sup>3</sup>, trọng lượng cá ở thời điểm lấy nước là 15-20 g/con.

Thu 10 ml nước vào ống nghiệm, kiểm tra mật độ vi khuẩn ban đầu. Sau đó bổ sung 0,2 g chất kháng khuẩn nanocomposite – Bạc nano/Diatomite, ký hiệu: AgNPs/DAT3 hoặc AgNPs/DAP3, lắc đều.

- *Đối chứng:*

Thu 10ml nước trong cùng bể composite với nghiệm thức thử nghiệm trên cho vào ống nghiệm, không bổ sung AgNPs/DAT3 hoặc AgNPs/DAP3.

Tất cả các mẫu thử nghiệm và đối chứng đều ủ ở nhiệt độ phòng.

Thu mẫu sau mỗi 3h và 24h, trải mẫu trên môi trường BHIA (Brain Heart Infusion Agar), ủ ở 30°C. Đếm mật độ vi khuẩn.

Hiệu ứng kháng khuẩn (R%) được xác định dựa trên số khuẩn lạc sống sót trên đĩa từ những mẫu có thời gian tiếp xúc 0 giờ, 3 giờ và 24 giờ (A) so với đối chứng (B) – Chuẩn AATCC Test Method 100-2004 [24]:

$$R(\%) = (B-A)/B \times 100 \quad (1)$$

✓ **Vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* và *Edwardsiella ictaluri***

- *Nghiệm thức thử nghiệm:*

Vi khuẩn được nuôi trên môi trường thạch máu (Blood Agar- BA), sau đó được pha với nước muối 0,85% để đạt nồng độ 10<sup>8</sup> CFU/ml (ống chuẩn 0.5 McFarland). Tiếp tục pha loãng trong môi trường LB (Luria Bertani Broth) để đạt nồng độ vi khuẩn 10<sup>4</sup> và 10<sup>3</sup> CFU/ml.

Bổ sung chất kháng khuẩn AgNPs/DAT3 hoặc AgNPs/DAP3, nồng độ 0,2g chất kháng khuẩn/10ml LB, lắc đều.

- *Đối chứng:*

Môi trường LB chứa mật độ vi khuẩn  $10^3$ - $10^4$  CFU/ml, không bổ sung chất kháng khuẩn.

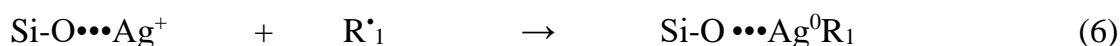
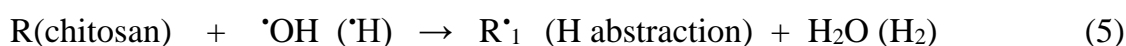
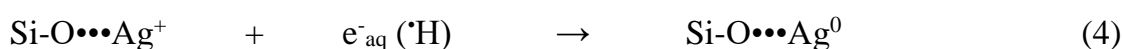
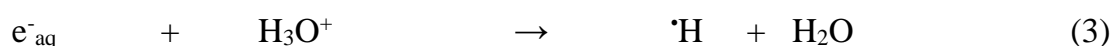
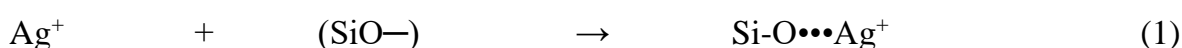
Tất cả mẫu ủ ở nhiệt độ phòng. Thu mẫu sau mỗi 3 giờ và 24 giờ, trải mẫu trên môi trường BHIA, ủ ở  $30^\circ\text{C}$ . Sau 24 giờ, đếm mật độ vi khuẩn.

Hiệu ứng kháng khuẩn được xác định dựa trên số khuẩn lạc sống sót trên đĩa cho các mẫu có thời điểm tiếp xúc 0 giờ, 3 giờ và 24 giờ tương ứng so với đối chứng (công thức 1).

## III.2. THẢO LUẬN KẾT QUẢ

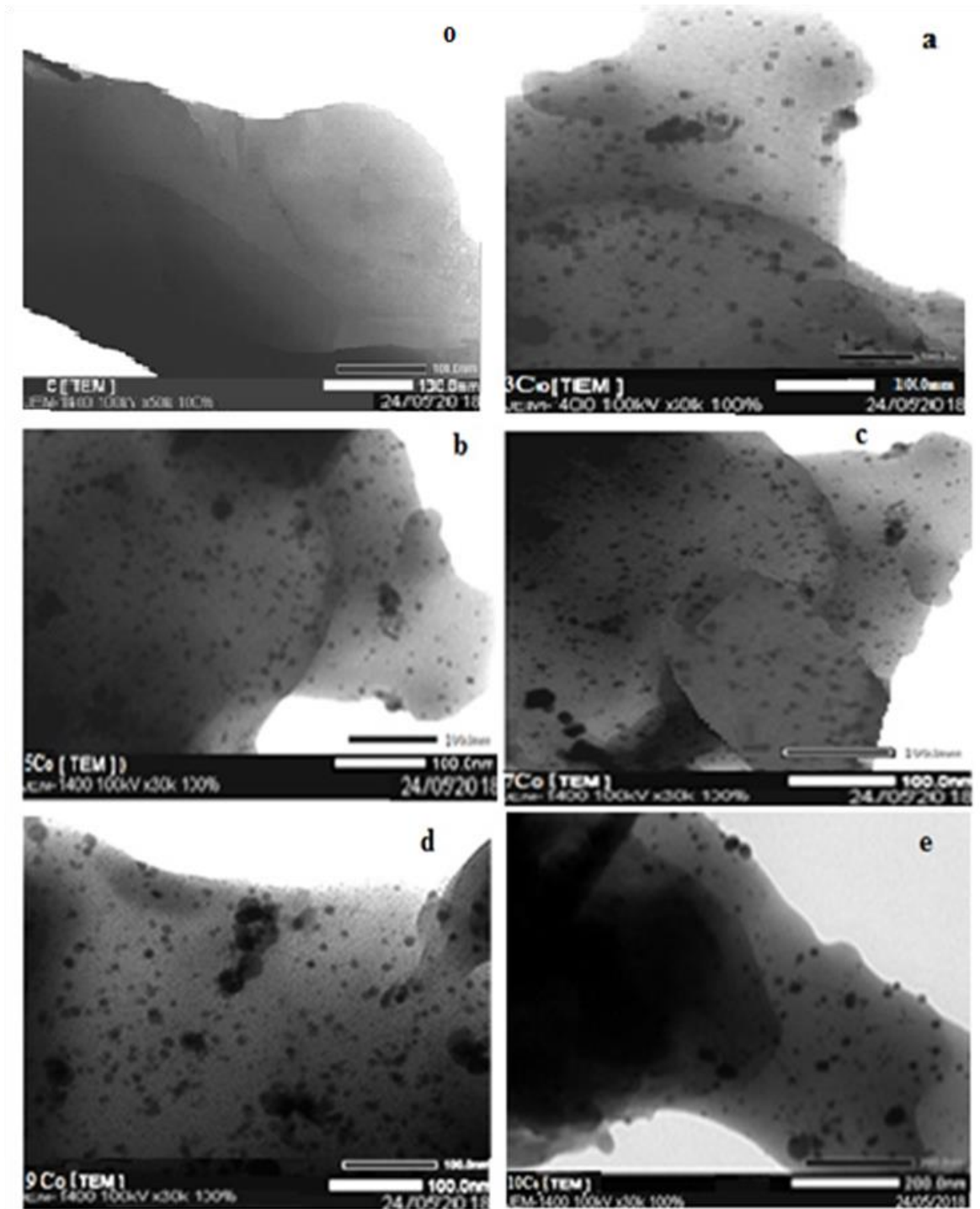
### III.2.1. Chế tạo nanocomposite AgNPs/DA

Huyền phù  $\text{AgNO}_3$ /dung dịch chitosan 1%/DA được chỉnh bằng dung dịch amoni đến pH 5-6 trước khi chiếu xạ. Reyad (2003) và Caliskan (2011) đã xác định pHzpc – điểm đẳng điện của diatomite  $\sim 4$ , vì vậy bề mặt của diatomite sẽ mang điện tích âm với pH trên [25]. Ion  $\text{Ag}^+$  được hấp phụ trên bề mặt và trong vùng vô định hình của  $\text{SiO}_2$  bởi nhóm nucleophilin  $\text{SiO}^-$  trong khi khuấy tạo huyền phù [26]. Electron solvate hóa ( $e^-_{\text{aq}}$ ) và gốc  $\cdot\text{H}$  được phát sinh bởi sự xạ ly nước có thể khử ion  $\text{Ag}^+$  đến  $\text{Ag}^0$  rồi keo tụ tạo “cluster” bạc nano AgNPs. Những nhóm  $\cdot\text{OH}$  xạ ly có thể kết hợp với H tách ra từ phân tử chitosan tạo gốc thứ cấp  $\text{R}\cdot_1$  cũng là tác nhân khử. Cơ chế phản ứng cho quá trình khử  $\text{Ag}^+$  đã hấp phụ trên silica tạo AgNPs trong huyền phù  $\text{AgNO}_3$ /chitosan/DA được đề nghị như sau:



Chitosan đóng vai trò là chất ổn định kích thước hạt keo do  $\text{NH}_2$  bị proton hóa ( $\text{R-NH}_3^+$ ) tạo xung đẩy tĩnh điện [27].

#### III.2.1.1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ $\text{AgNO}_3$ ban đầu đến kích thước hạt AgNPs trong nanocomposite



Hình 5: Ảnh TEM của mẫu nanocomposite AgNPs/DA: o) DA; a) DA/3mM AgNO<sub>3</sub>; b) DA/5mM AgNO<sub>3</sub>; c) DA/7mM AgNO<sub>3</sub>; d) DA/9 mM AgNO<sub>3</sub> và e) DA/10 mM AgNO<sub>3</sub>

Trong thí nghiệm này, hạt AgNPs được nhận diện rõ trên chất nền silica dựa vào ảnh TEM, khi nồng độ dung dịch AgNO<sub>3</sub> ≥ 3mM (Hình 5). Kích thước hạt đã tăng từ 6-9 nm khi nồng độ AgNO<sub>3</sub> tăng tương ứng từ 3 đến 10 mM như trong bảng 1. Số lượng ion Ag<sup>+</sup> tăng khả năng kết hợp tạo hạt lớn trên bề mặt silica (SiO<sup>-</sup>) thuận lợi. Sự va chạm tăng khi độ nhớt tăng theo nồng độ dung dịch vì vậy khả năng keo

tụ giữa các hạt nhỏ dễ dàng hơn. Ngoài ra, sự tích tụ càng nhiều nguyên tử  $Ag^0$  trên bề mặt hạt nano khi nồng độ  $Ag^+$  tăng làm giảm năng lượng bề mặt, vì vậy giảm khả năng “capping” của phân tử polyme ổn định kích thước, vì vậy hạt lớn khi nồng độ ion ban đầu tăng [28, 29].

*Bảng 1: Kích thước hạt bạc nano theo nồng độ  $AgNO_3$  ban đầu*

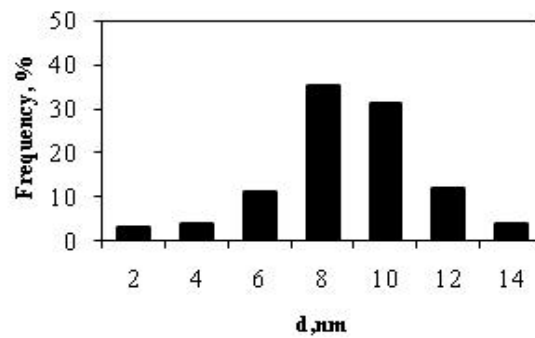
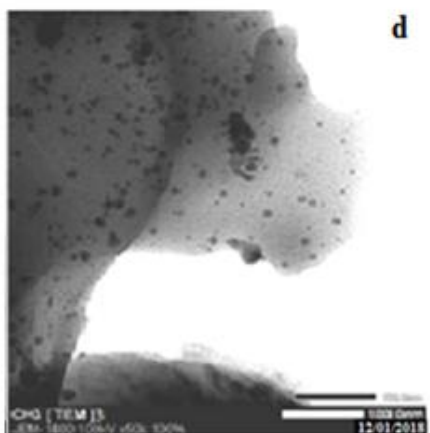
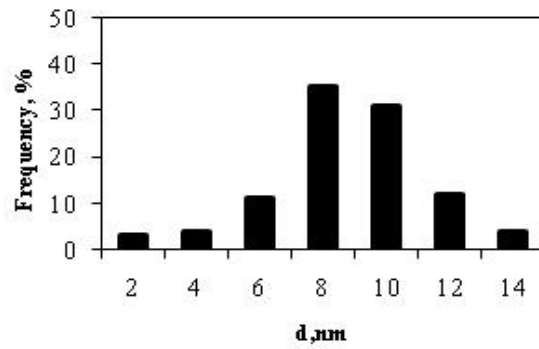
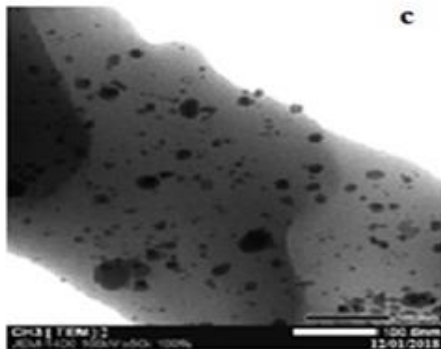
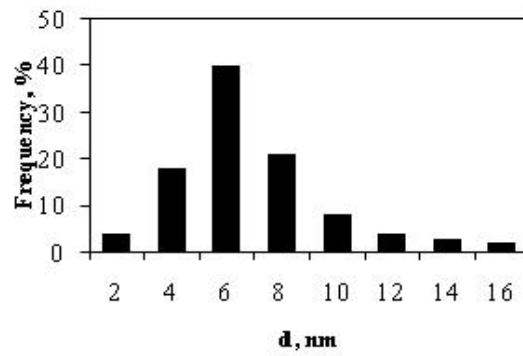
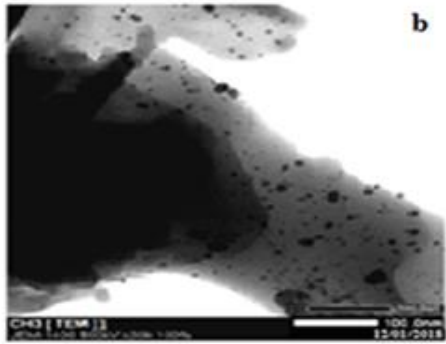
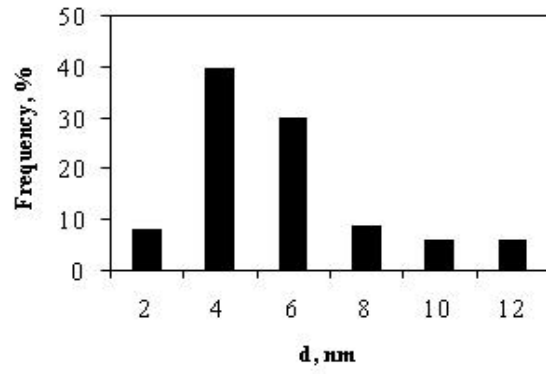
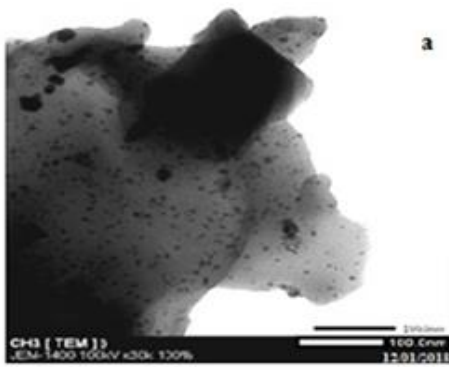
STT	Nồng độ $AgNO_3$ (mM)	Kích thước hạt AgNPs (nm)
1	3	$6,0 \pm 1,0$
2	5	$6,5 \pm 1,1$
3	7	$7,1 \pm 0,9$
4	9	$9,0 \pm 1,2$
5	10	$9,2 \pm 1,3$

Kết quả trong bảng 1 cho thấy khi sử dụng nồng độ  $AgNO_3$  ban đầu từ 3-10 mM, kích thước hạt tăng tương ứng trong khoảng từ 6 nm đến 9 nm.

#### *II.2.1.2. Mối tương quan giữa liều xạ và kích thước hạt*

Trong phương pháp chế tạo kim loại nano bằng bức xạ, liều hấp thụ đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành và phát triển hạt keo. Nếu liều xạ quá thấp hạt nano chưa được hình thành, với liều xạ quá cao sẽ tạo hạt keo quá lớn thậm chí tạo kết tủa. Theo D. Long hạt bạc nano chưa được tạo thành tại liều EB <5 kGy, tuy nhiên với liều hấp thụ >25 kGy có hiện tượng kết tủa, khi chiếu xạ dung dịch  $AgNO_3$  cùng nồng độ  $1,2 \cdot 10^{-4}$  M trong 0,04% chitosan [8].

Khi chiếu xạ dung dịch huyền phù  $AgNO_3$ /chitosan/DA, nanocomposite AgNPs/DA được tạo thành bởi sự tổng hợp *in situ*, trong đó  $Ag^+$  của  $AgNO_3$  bị khử và đồng thời tạo AgNPs dạng hình cầu, không keo tụ trên bề mặt silica. Đường kính trung bình của hạt nano được xác định dựa vào ảnh TEM là  $5,5 \pm 1,0$  nm;



Hình 6: Ảnh TEM và sự phân bố kích thước hạt của AgNPs trong nanocomposite AgNPs/DA tại liều xạ a) 6,5; b) 13,4; c) 20,2 và d) 25,9 kGy

6,9 ± 1,2 nm; 9,2 ± 1,3 nm và 8,9 ± 1,0 nm tương ứng với các liều xạ: 6,5; 13,4; 20,2 và 25,9 kGy tại cùng suất liều 5 kGy/s. Các hạt bạc nano tăng kích thước với sự gia tăng liều hấp thụ, khi các thông số như năng lượng chùm tia, cường độ dòng và nồng độ ban đầu của dung dịch chiếu xạ là tương tự. Số lượng e<sup>-</sup><sub>aq</sub> và <sup>•</sup>H tăng theo liều xạ do đó phản ứng khử Ag<sup>+</sup> và keo tụ tạo AgNPs ở liều cao có ưu thế hơn so với liều thấp. Trong nghiên cứu này, kích thước hạt có thay đổi tăng từ 5,5 ± 1 nm đến 9,2 ± 1,3 nm ứng với liều hấp thụ từ 6,5 kGy đến 20,2 kGy, nhưng có suy giảm ở liều cao hơn (8,9 ± 0,1 nm) tại 25,9 kGy, khi hầu hết các ion Ag<sup>+</sup> đã được chuyển hóa tạo Ag<sup>0</sup> nano. Ngoài ra, tại liều cao có sự phân mảnh của chất ổn định kích thước hạt – Chitosan cũng là nguyên nhân ức chế tạo hạt lớn. Sự phân bố kích thước hạt với tần số chủ yếu trong khoảng 4-12 nm, biểu thị kích thước hạt nhỏ và đồng đều. Sự thuận lợi khi gắn AgNPs trên silica là sự phân tán của hạt nano qua giá thể này tránh được sự keo tụ, kích thước AgNPs nhỏ với đường kính đặc trưng ≤ 10 nm được tạo thành [30].

*Bảng 2: Mối liên quan giữa liều xạ và kích thước hạt*

STT	Liều xạ hấp thụ (kGy)	Kích thước hạt AgNPs (nm)
1	6,5	5,5 ± 1,0
2	13,4	6,9 ± 1,2
3	20,2	9,2 ± 1,3
4	25,9	8,9 ± 1,0

### *II.2.1.3. Hàm lượng AgNPs trong nanocomposite khi chiếu xạ huyền phù AgNO<sub>3</sub>/DA (in situ) và khi chiếu xạ tạo AgNPs trước (ex situ)*

Kết quả trong bảng 3 cho thấy hàm lượng của AgNPs trong composite đã tăng theo nồng độ AgNO<sub>3</sub>. Khả năng liên kết của Ag<sup>0</sup> hoặc Ag<sup>+</sup> (do oxi hóa Ag<sup>0</sup>) với SiO<sub>2</sub> tăng theo nồng độ AgNPs được sử dụng phối trộn ban đầu với SiO<sub>2</sub> trong DA. Hơn nữa, chất ổn định kích thước hạt AgNPs chitosan với nhóm chức –NH<sub>2</sub> có thể tạo liên kết hydro với những nhóm –OH hoạt hóa của DA.

Theo phương pháp chiếu xạ *in-situ*, cơ chế tạo và liên kết bạc nano trong chất nền diatomite có SiO<sub>2</sub> đã được trình bày ở trên, theo đó nồng độ Ag<sup>0</sup> keo tụ tạo bạc nano phụ

thuộc vào lượng ion  $Ag^+$  ban đầu hấp phụ trên silica trong diatomite. Do vậy kết quả trong bảng 3 cho thấy hàm lượng AgNPs trong composite đã tăng theo chiều tăng của nồng độ  $AgNO_3$  ban đầu. Tại cùng một liều hấp thụ, với các mẫu có nồng độ  $Ag^+$  cao:  $Ag^0$ -DA7 và  $Ag^0$ -DA10 hàm lượng AgNPs lần lượt là 1276 và 1307 mg/kg đã không có sự thay đổi nhiều, khi hầu hết sản phẩm xạ ly  $e^-_{aq}$  hoặc  $\cdot H$  đã được sử dụng cho phản ứng khử  $Ag^+$ .

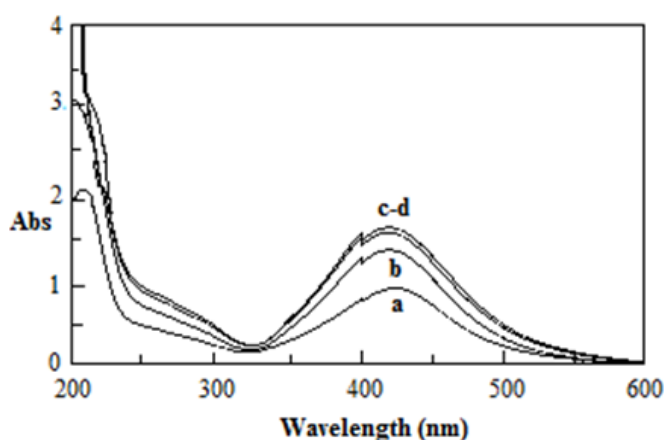
Bảng 3: Hàm lượng AgNPs theo nồng độ với phương pháp *in-situ* và *ex-situ*

STT		Mẫu	Chỉ tiêu kiểm nghiệm	Đơn vị	Kết quả
1	<b>Tổng hợp <i>in-situ</i></b>	$Ag^0$ -DA1	Ag	mg/kg	$353 \pm 7$
2		$Ag^0$ -DA3	Ag	mg/kg	$579 \pm 13$
3		$Ag^0$ -DA5	Ag	mg/kg	$792 \pm 20$
4		$Ag^0$ -DA7	Ag	mg/kg	$1276 \pm 36$
5		$Ag^0$ -DA10	Ag	mg/kg	$1307 \pm 42$
6	<b>Tổng hợp <i>ex-situ</i></b>	$Ag^0$ -DA1S	Ag	mg/kg	$201 \pm 6$
7		$Ag^0$ -DA3S	Ag	mg/kg	$350 \pm 10$
8		$Ag^0$ -DA5S	Ag	mg/kg	$367 \pm 14$
9		$Ag^0$ -DA7S	Ag	mg/kg	$787 \pm 20$
10		$Ag^0$ -DA10S	Ag	mg/kg	$1210 \pm 40$

Sự tương tác tĩnh điện giữa những ion  $Ag^+$  và bề mặt mang điện tích (–) của silica ở pH 5-6, dẫn đến kết quả hàm lượng AgNPs trong DA có cao hơn trường hợp chế tạo nanocomposite AgNPs/DA theo phương pháp *ex-situ*. Mặc dù, DA xử lý trước trong APTES có nhóm amino  $NH_2$  làm cầu nối giữa nguyên tử Ag với Si-O-Si (silic dioxide) trong DA [31].

### III.2.2. Những đặc trưng của nanocomposite AgNPs/DA

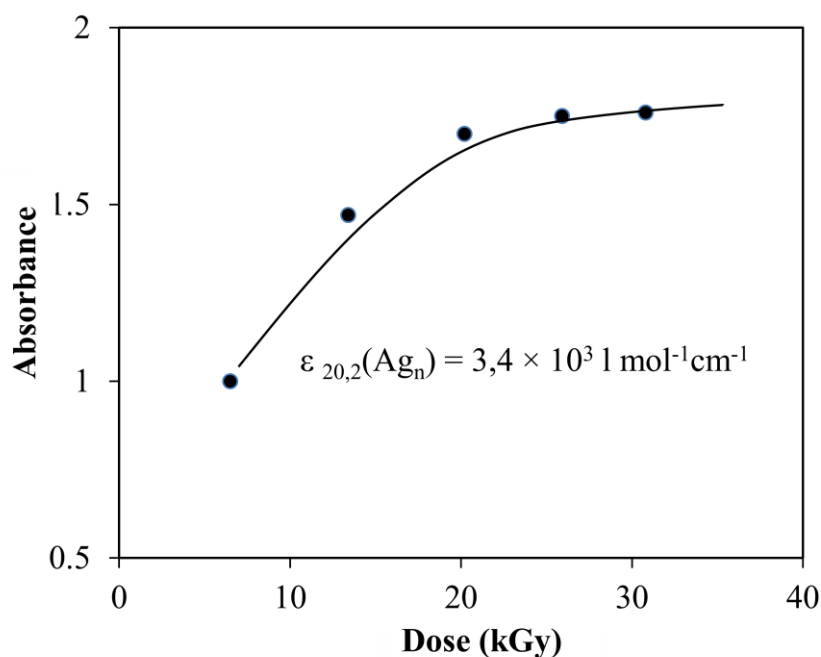
Hình 7 hiển thị phổ UV-Vis của dung dịch keo bạc nano được tách ra từ huyền phù AgNPs/DA. Phổ có đỉnh hấp thụ cực đại ( $\lambda_{max}$ ) từ 417 - 422 nm tăng tương ứng theo liều xạ từ 6,5 đến 20,2 kGy. Tại liều xạ cao hơn (25,9 kGy) cường độ hấp thụ thay đổi không đáng kể. Như vậy, liều xạ 20,2 kGy là tối ưu để chuyển hóa hoàn toàn 10 mM AgNO<sub>3</sub> thành AgNPs trong huyền phù DA chứa 1% dung dịch chitosan. Vai trò chitosan không chỉ là chất ổn định (stabilizer) kích thước hạt mà còn là chất gắn kết (binder) Ag<sup>0</sup> với DA thông qua liên kết hydro giữa các phân tử, tạo cầu nối trung gian giữa Ag<sup>0</sup> và DA.



Hình 7a: Phổ UV-Vis của AgNPs: a) 6,5 kGy, b) 13,4 kGy, c) 20,2 kGy và d) 25,9 kGy.

Mối liên quan giữa hấp thụ quang cực đại và liều xạ được thể hiện trong hình 7b. Hệ số tắt phân tử của keo bạc nano tại  $\lambda = 420$  nm suy từ độ hấp thụ quang ổn định và nồng độ nguyên tử Ag là 10 mM ( $10^{-2}$  M) tại 20,2 kGy:  $\epsilon_{20,2} (Ag_n) = 3,4 \times 10^3$  l mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Nếu hệ số tắt phân tử được sử dụng ở bất kỳ liều nào thì hiệu suất khử xạ ly ( $G_{red}$ ) ở 20,2 kGy được xác định là  $G_{red} = 0,49$   $\mu$ mol.J<sup>-1</sup>. Giá trị này thấp hơn  $G_{red} = 0,57$   $\mu$ mol.J<sup>-1</sup> của 10 mM AgNO<sub>3</sub> trong dung dịch chitosan 1% không có diatomite tại 17,6 kGy [16]. Sự chênh lệch này có thể được giải thích rằng, trong một hệ dị thể chiếu xạ, khi hai pha thành phần là đáng kể về khối lượng thì năng lượng ion hóa sẽ được hấp thụ bởi hai pha. Do đó,  $G_{red}$  của nước hấp phụ trong hệ dị thể gồm silica/nước thấp hơn  $G_{red}$  của nước “tự do”. Le Caër đã nghiên cứu bức xạ nước hấp phụ trên những oxit khác nhau và cho thấy rằng, sự khác nhau về năng lượng liên kết và năng lượng truyền giữa pha rắn và dung dịch hấp phụ có thể tương ứng với sự thay đổi liều hấp thụ cũng như hiệu suất khử bức xạ [32].

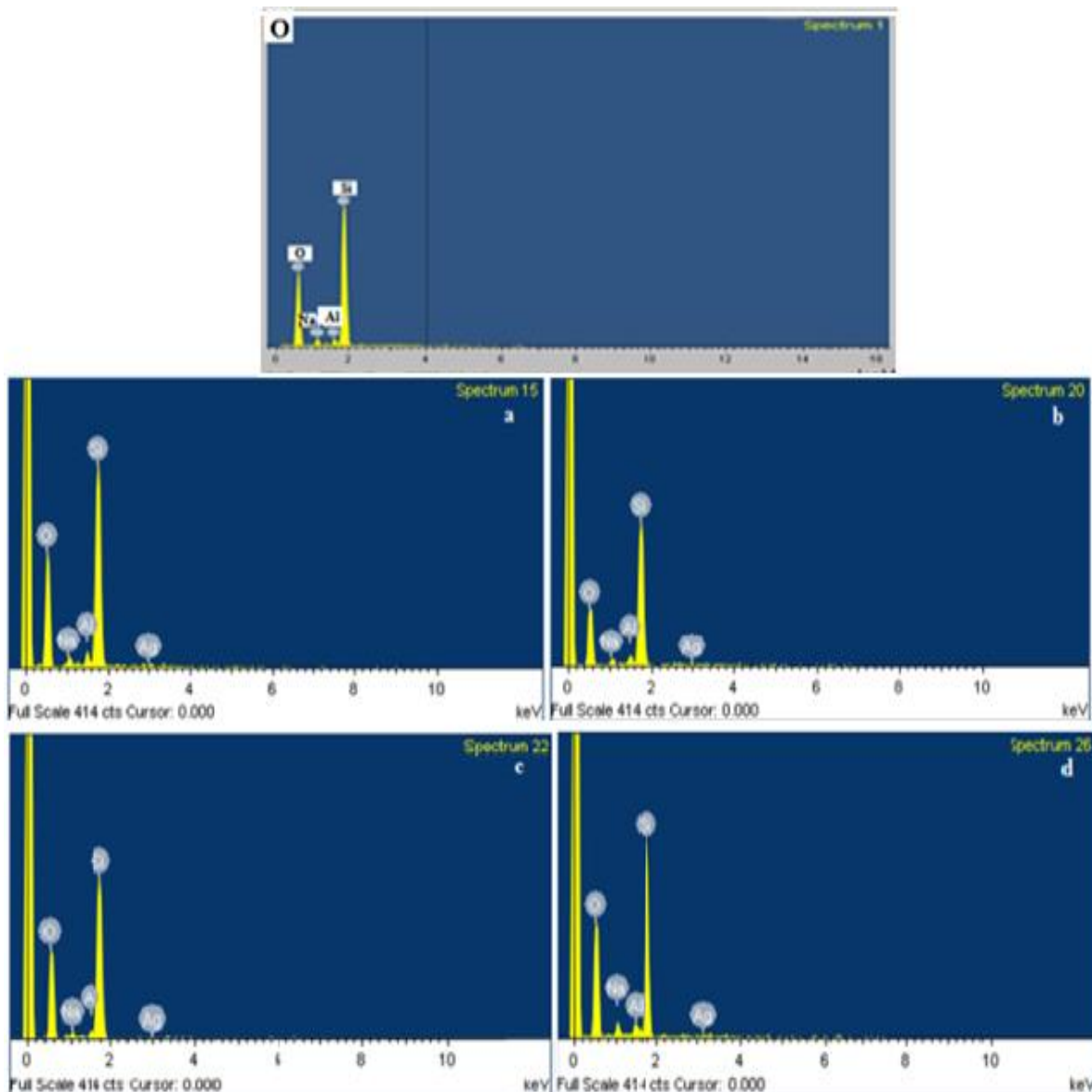




Hình 7b: Mối liên quan giữa độ hấp thụ quang cực đại và liều xạ

Phổ EDX của DA có những đỉnh của các nguyên tố O, Na, Al và Si tại 0,5; 1,1; 1,5 và 1,8 keV tương ứng (Hình 30). Ngoài ra, phổ EDX của nanocomposite AgNPs/DA được chế tạo ở các liều xạ 6,5; 13,4; 20,2 và 25,9 kGy có thêm đỉnh mới tại 3 keV, đặc trưng cho Ag ngoài hợp phần nguyên tố như DA (Hình 8a, b, c, d)

Ảnh SEM của các mẫu DA trong hình 9a biểu hiện hình thái cấu trúc xốp rỗng của DA, trong khi mẫu AgNPs/DA các hốc rỗng được “nạp” đầy có thể là AgNPs (hình 9b). Kết quả này phù hợp với ảnh chụp TEM về sự hiện diện của Ag nano trên DA cũng như phổ EDX về thành phần nguyên tố của Ag trong mẫu AgNPs/DA. Kết quả phân tích hợp phần nguyên tố của Ag nano là 0,13% trong mẫu tổng hợp *in situ* từ 10 mM AgNO<sub>3</sub>/DA chiếu xạ 20 kGy (Bảng 4). Kết quả này phù hợp với phân tích AES-ICP mẫu Ag<sup>0</sup>-DA10 trong bảng 3.

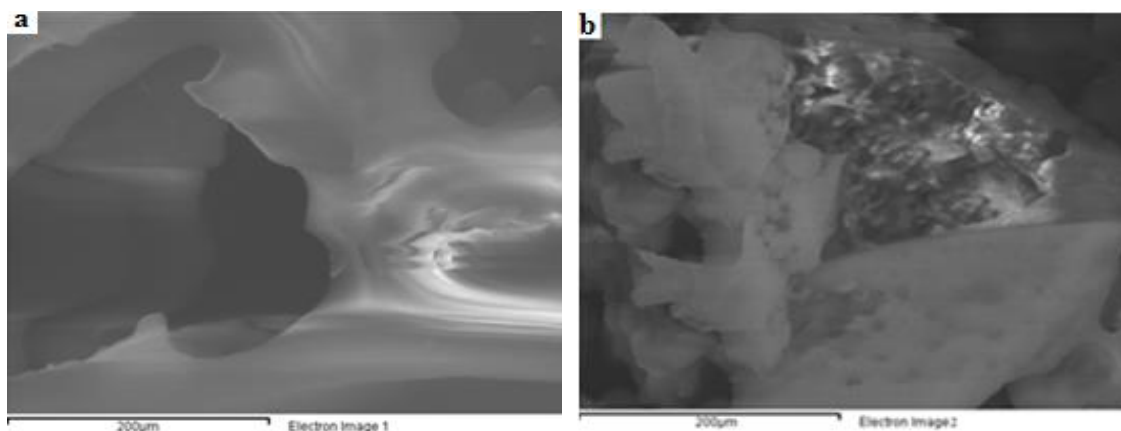


Hình 8: Phổ tán sắc năng lượng tia X của các mẫu DA (O), nanocomposite - AgNPs/DA: a) 6,5; b) 13,4; c) 20,2 và d) 25,9 kGy.

Bảng 4: Thành phần nguyên tố của AgNPs/DA nanocomposite

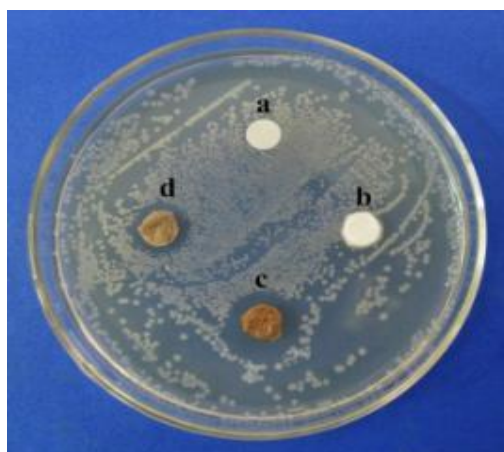
Vật liệu	Nguyên tố	O	Na	Al	Si	Ag	Total (%)
Diatomite	Trọng lượng (%)	57.63	1.76	1.63	38.98		100
	Nguyên tử (%)	70.25	1.49	1.18	27.08		100
AgNPs/diatomite (20.2 kGy)	Trọng lượng %	57.68	1.64	1.95	38.60	<b>0.13</b>	100
	Nguyên tử %	71.07	1.38	1.38	25.87	0.3	100

Mặc dù trong thành phần của DA vẫn còn Al và Na dưới dạng  $Al_2O_3$  và  $Na_2O$  sau quá trình loại khoáng với hàm lượng thấp. Vì vậy, các hợp chất này có thể không ảnh hưởng đến quá trình khử và tạo keo bạc nano trên DA.



Hình 9: Ảnh SEM: a) DA; b) AgNPs/DA

### II.3.3. Hoạt tính kháng khuẩn của nanocomposite AgNPs/DA

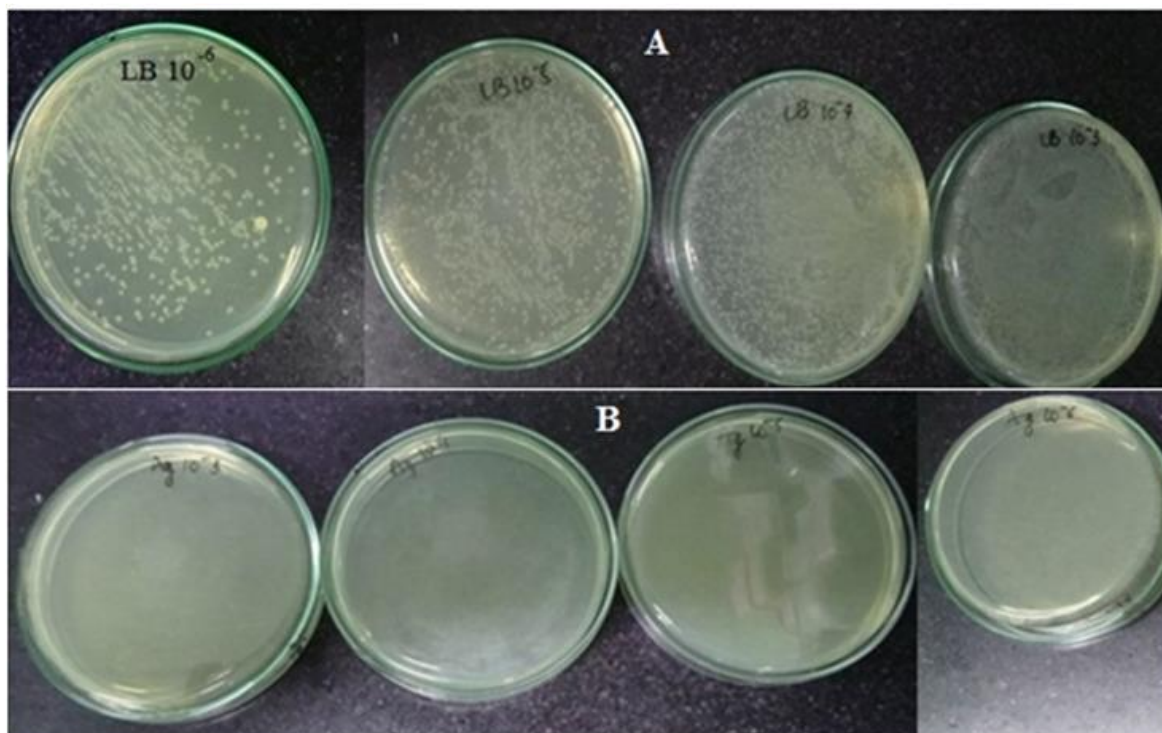


Hình 10: Thí nghiệm định tính về hoạt tính kháng khuẩn của AgNPs/DA với *E. coli*

Hình 10 biểu thị kết quả thí nghiệm định tính về hiệu ứng kháng *E. coli* của nanocomposite AgNPs/DA. Mẫu đối chứng (10a và 10b) không có khả năng ức chế chủng *E. coli*. Trong khi các mẫu trong hình 10c và 10d có tấm nanocomposite thành phần AgNPs lần lượt là 0,13% và 0,079% trong nanocomposite có hiệu ứng kháng *E. coli*, đường kính vùng ức chế lớn hơn và lan rộng hơn trên đĩa petri ứng với mẫu có nồng độ AgNPs cao hơn (10c).

Hình 11A chỉ sự tăng trưởng nhanh của vi khuẩn *E. coli* trên môi trường dinh dưỡng LB. Ngược lại, không một khuẩn lạc nào xuất hiện trên môi trường có nanocomposite AgNPs/DA với thời gian ủ của vật liệu và dịch khuẩn là 3 giờ, nồng độ

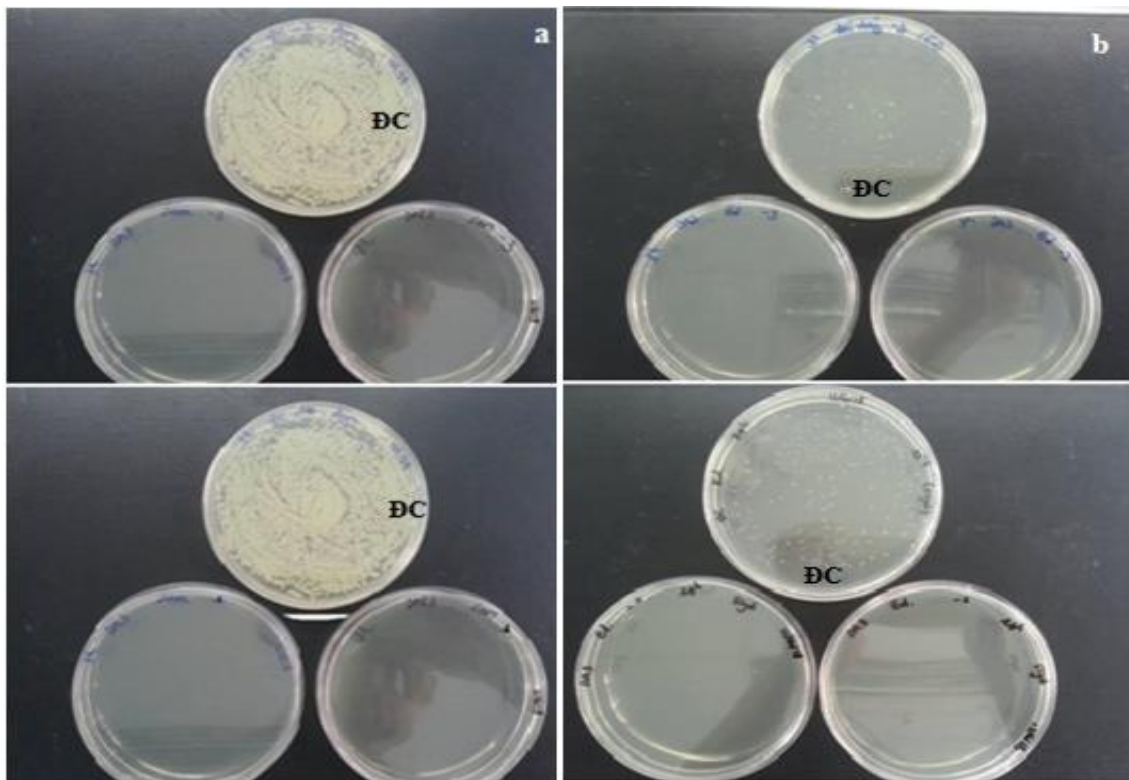
vi khuẩn  $\leq 10^6$ . Kết quả hiệu ứng kháng *E. coli* của AgNPs/DA (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) là 100%. Nếu thời gian tiếp xúc của nanocomposite và dịch khuẩn là 30 phút thì hiệu ứng là 60 % ở cùng điều kiện thực nghiệm [33]. Theo nhiều tác giả, vật liệu silica rất phù hợp để làm giá thể cho tác nhân kháng khuẩn hoặc phân phối thuốc như vắc-xin ngừa bệnh cho cá trong môi trường thủy sản [34].



Hình 11: Kết quả thí nghiệm kháng khuẩn *E. coli* nồng độ  $10^3$ - $10^6$  CFU/ml với nhóm A: môi trường LB, nhóm B: có mẫu AgNPs/DA

Trong đề tài này, nanocomposite chứa 0,13% AgNPs thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn đối với *Aeromonas hydrophila* và *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh trên cá Tra từ môi trường nước. Hình 12 biểu thị sự phát triển vi khuẩn với nồng độ  $10^3$  và  $10^4$  trên các đĩa môi trường BHIA. Số khuẩn lạc tăng trưởng nhanh (over growth) trên các đĩa mẫu đối chứng (ĐC) không chất kháng khuẩn. Ngược lại, các đĩa có nanocomposite AgNPs/DA hầu như không có sự sống sót của vi khuẩn, hiệu ứng kháng khuẩn là 100%. Nanocomposite AgNPs/DA đã ức chế hiệu quả sự phát triển vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila*. Kết quả này cho thấy sử dụng  $\text{AgNO}_3$  nồng độ 10 mM, chiếu xạ 20 kGy là phù hợp để ức chế vi khuẩn nhiễm bệnh cho cá. Xử lý kháng khuẩn bằng AgNPs được công nhận bởi nhiều chuyên gia trên thế giới, Swain và cộng sự cũng đã chế tạo AgNPs 10 mM bền hóa trong axit chanh kháng khuẩn cao và đặc biệt với *A. hydrophila* gây bệnh cho cá [35]. Tuy nhiên, khi lượng

AgNPs trong nanocomposite thấp (0,079%) ứng với nồng độ  $\text{Ag}^+$  ban đầu là 5 mM, hiệu ứng kháng *A. hydrophila* nồng độ  $10^3$  và  $10^4$  CFU/ml là ~ 97 và 34% ứng với thời gian tiếp xúc là 3 giờ. Những vi khuẩn sống sót phát triển nhanh trong môi trường dinh dưỡng thích hợp, tăng sinh đến  $10^7$ - $10^8$ , khi kéo dài thời gian tiếp xúc đến 24 giờ (Bảng 1-phụ lục). Trong khi vi khuẩn *E. ictaluri* ở cùng điều kiện thực nghiệm có hiệu ứng kháng 100% khi kéo dài thời gian phản ứng 24 giờ (Bảng 2-phụ lục). Mẫu AgNPs/DAT3 có hàm lượng AgNPs ~ 0,13% trong DA (TQ) cũng có hiệu ứng kháng khuẩn cao tương tự DA Phú Yên.



Hình 12: Thử nghiệm kháng khuẩn với a) *Aeromonas hydrophila* và b) *Edwardsiella ictaluri* trên môi trường BHIA của mẫu đối chứng - ĐC (có khuẩn lạc) và AgNPs/DAP (không khuẩn lạc).

Hoạt tính kháng khuẩn với tổng vi khuẩn hiếu khí được thực nghiệm với nước nuôi cá trong bể composite. Với nồng độ vi khuẩn ban đầu trong môi trường là  $2,42 \times 10^4$ , hàm lượng AgNPs trong composite 0,13%, hiệu ứng kháng khuẩn với vi khuẩn tổng số >99% (Bảng 3-Phụ lục).

✓ Từ các số liệu trên chứng tỏ nanocomposite AgNPs/DA có hiệu ứng kháng khuẩn cao với các chủng gây bệnh cho cá Tra đã thử nghiệm. Vật liệu nanocomposite

trong đề tài này phù hợp cho hướng ứng dụng mới, xử lý môi trường thủy sản như hồ nuôi cá Tra bị nhiễm khuẩn.

#### PHẦN IV. KẾT LUẬN

- Bạc nano được tạo thành từ dung dịch huyền phù  $\text{AgNO}_3$  10 mM/DA theo phương pháp khử *in situ* bằng bức xạ EB có kích thước hạt từ 5-10 nm, ứng với liều hấp thụ 5-25 kGy như quy trình mô tả. Liều xạ tối ưu được lựa chọn là 20,2 kGy.
- Đặc trưng của nanocomposite AgNPs/DA thể hiện qua ảnh chụp TEM, phổ EDX và ảnh SEM. Bạc nano hiện diện trong nanocomposite là hình cầu, phân bố đều trên chất nền diatomite.
- Lượng AgNPs trong nanocomposite đã tăng theo nồng độ dung dịch  $\text{AgNO}_3$  sử dụng ban đầu, đạt 1300 và 1200 ppm cho mẫu tổng hợp *in-situ* và *ex-situ* tương ứng từ 10 mM  $\text{AgNO}_3$
- Hiệu ứng kháng *E. coli* của AgNPs/DA (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 100%
- Hiệu ứng kháng các chủng vi khuẩn gây bệnh cho cá Tra *Aeromonas hydrophila* và *Edwardsiella ictaluri* ( $10^3$ - $10^4$  CFU/ml) đạt 100% với mẫu AgNPs/DAP có hàm lượng bạc nano 1300 ppm.
- Hiệu ứng khử vi khuẩn tổng số ( $10^3$ - $10^4$  CFU/ml) trong môi trường nước nuôi cá Tra >99% với cùng mẫu thí nghiệm trên.
- Vật liệu nanocomposite AgNPs/DA thích hợp cho xử lý nhiễm khuẩn trong hồ nuôi cá Tra.

#### Kiến nghị:

- Cần khảo sát thêm về lượng Ag nano phóng thích ra môi trường theo thời gian
- Đánh giá độc tính cấp của nanocomposite AgNPs/DA đối với động vật
- Thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn đối với các chủng *Aeromonas hydrophila* và *Edwardsiella ictaluri* trong điều kiện *in vivo* từ môi trường bể nuôi cá Tra.
- Ảnh hưởng của nanocomposite AgNPs/DA đến hệ sinh thái

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Camargo P. H. C., Satyanarayana K. G., Wypych F., Nanocomposites: Synthesis, Structure, Properties and New Application Opportunities, *Materials Research* 12 (1), pp. 1-39, 2009.
- [2] Hussain F., Hojjati M., Okamoto M., Gorga R. E., Polymer-matrix nanocomposites, processing, manufacturing and application: An overview, *Journal of Composite Materials* 40, pp. 1511-1575, 2006.
- [3] Jone C.M. & Hoek E.M.V, A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment, *Journal of Nanoparticle Research* 12, pp.1531-1551, 2010.
- [4] Szczepanowics K., Stefanska J., Socha R.P., Warszynski P., Preparation of silvernanoparticles via chemical reduction and their antimicrobial activity, *Physicochemical Problems of Mineral Processing* 45, pp. 85-98, 2010.
- [5] Hannan N. & Subbalaxmi S., Green synthesis of silver nanoparticles using *Bacillus Subtillus* IA751 and its antibacterial activity, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 1 (2), pp. 87-94, 2011.
- [6] Liu Y. et al., Preparation of high-stable silver nanoparticle dispersion by using sodium alginate as a stabilizer under gamma radiation, *Radiation Physics and Chemistry* 78 (4), pp. 251-255, 2009.
- [7] Kassae M.Z. et al.,  $\gamma$ -Ray synthesis of starch- stabilized silver nano particles with antibacterial activities, *Radiation Physics and Chemistry* 77 (9), pp. 1074-1078, 2008.
- [8] Long D. et al., Preparation of oligochitosan stabilized silver nano particles by gamma irradiation, *Radiation Physics and Chemistry* 76, pp. 1126-1131, 2007.
- [9] He D., Kacopeiros M., Ikeda-Ohno A., Waite T.D., Optimizing the Design and Synthesis of Supported Silver Nanoparticles for Low Cost Water Disinfection, *Environmental Science & Technology* 48 (20), 12320-12326, 2014.
- [10] Hornebecg V., Antonietti M., Cardinal T., Treguer-Delapierre M., Stable silver nanoparticles immobilized in mesoporous silica, *Chemistry of Materials* 15 (10), pp. 1993-1999, 2003.

- [11] Yuan, P., Wu, D.Q., He, H.P., Lin, Z.Y, The hydroxyl species and acid sites on diatomite surface: a combined IR and Raman study. *Applied Surface Science* 227, pp. 30-39, 2004.
- [12] Reza A.P.S., Hasan A.M., Ahmad J.J., Zohreh F., Jafar T., The effect of acid and thermal treatment on a natural diatomite, *Chemistry Journal* 2(4), 144-150, 2015.
- [13] Trần Hồng Côn, Đồng Kim Loan, Phạm Phương Thảo, Điều chế bạc kim loại kích thước nanomet và ứng dụng làm vật liệu khử trùng nước, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 47 (2), pp. 83-89, 2009.
- [14] Nguyễn Quốc Hiến và cộng sự, Nghiên cứu áp dụng phương pháp chiếu xạ chế tạo bạc nano gắn lên vật liệu sứ xốp ứng dụng xử lý nước, *Báo cáo tổng kết đề tài khoa học công nghệ cấp Bộ* ĐTCB/11/07-01, 2013.
- [15] Truong Thi Hanh et al., Gamma irradiation of cotton fabrics in AgNO<sub>3</sub> solution for preparation of antibacterial fabrics, *Carbohydrate Polymers* 101, 2014, 101, pp. 1243-1248, 2014.
- [16] Truong Thi Hanh et al., Preparation of silver nanoparticles fabrics against multidrug-resistant bacteria, *Radiation Physics and Chemistry* 121, pp. 87-92, 2016.
- [17] Mitchell A.J., Collins C., Review of the therapeutic uses of hydrogen peroxide in fish production. *Aquaculture Magazine* 23(3):74-79, 1997.
- [18] Laith A.R. and Najiah M., *Aeromonas hydrophila*: Antimicrobial Susceptibility and Histopathology of Isolates from Diseased Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), *Journal of Aquaculture Research & Development* 5:2, 2013.
- [19] Crumlish M., Dung T.T., Turnbull J.F., Ngoc N.T.N., Ferguson, Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam, *Journal of Fish Diseases* 25 (12), 733-736, 2002.
- [20] Handy R.D., FSBI Briefing paper: Nanotechnology in fisheries and aquaculture, ©2012 Fisheries Society of the British Isles.



- [21] Arora, S., Jain, J., Rajwade, J.M., Paknikar, K.M., Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and live cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 236, 310–318, 2009.
- [22] Maneewattanapinyo, P., Banlunara, W., Thammachareon, C., Ekgasit, S., Kaewamatawong, An evaluation of acute toxicity of colloidal silver nanoparticles. *J. Vet. Med. Sci.* 73(11), 1417–1423, 2011.
- [23] Ma J., Guo S., Guo X., Ge H., Modified photodeposition of uniform Ag nanoparticles on TiO<sub>2</sub> with superior catalytic and antibacterial activities, *Journal of Sol-Gel Science Technology* 75 (2), pp. 366-373, 2015.
- [24] AATCC Test Method 100-2004, The American Association of Textile Chemists and Colorists USA 142, 2009.
- [25] Reyad A.S., Maha F.T., Experimental study and modeling of basic dye sorption by diatomaceous clay, *Applied Clay Science* 24, pp.111 – 120, 2003.
- [26] Caliskan N., Kul A.R., Alkan S., Sogut E.G., Alacabey I., Adsorption of zinc (II) on diatomite and manganese-oxide-modified diatomite: A kinetic and equilibrium study, *Journal of Hazardous Materials* 193, pp. 27-36, 2011.
- [27] Chen P., Song L., Liu Y., Fang Y., Synthesis of silver nanoparticles by  $\gamma$ -ray irradiation in acetic water solution containing chitosan. *Radiation. Physics and Chemistry* 76(7), 1165-116, 2007.
- [28] Lawless D., Kapoor S., Kennepohl P., Meisel D., Serpone N., 1994. Reduction and aggregation of silver ions at the surface of colloidal silica, *Journal Physics and Chemistry* 98(38), pp. 9619-9625, 1994.
- [29] Lv. Y., Liu H., Wang Z., Liu S., Hao. L., Sang Y., Liu D., Wang J., Boughton R.I., Silver nanoparticle-decorated porous ceramic composite for water treatment. *Journal of Membrane Science* 331, 50-56, 2009.
- [30] Abedini A., Daud A.R., Abdul Hamid M.A., Kamil Othman N., Saion E., A review on irradiation-induced nucleation and growth of colloidal metallic nanoparticles, *Nanoscale Research Letter* 13: 8(1), p. 474, 2013.
- [31] Egger S., Lehmann R.P., Height M.J., Loessner M.J., Schuppler M., Antimicrobial properties of a novel silver-silica nanocomposite, *Applied and Environmental Microbiology* 75(9), pp. 2973-2976, 2009.

- [32] Le Caër S., Review Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H<sub>2</sub> Production under Ionizing Radiation, *Water* 3, pp. 235-253, 2011.
- [33] Truong Thi Hanh et al., Synthesis and characterization of silver/diatomite nanocomposite by electron beam irradiation, *Radiation Physics and Chemistry* 139, 141-146, 2017.
- [34] Stromme M., Brohede U., Atluri R., Garcia-Bennetts A.E. “Mesoporous silica base nanomaterials for drug delivery: Evaluation of structural properties associated with release rate”, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 1, pp. 140-148, 2009.
- [35] Swain P., Nayak S. K., Sasmal A., Behera T., Barik S. K., Swain S. K., Mishra S. S, Sen A. K., Das J. K., Jayasankar P., Antimicrobial activity of metal based nanoparticles against microbes associated with diseases in aquaculture, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30, pp. 2491–2502, 2014.

## **DANH MỤC CÁC BÀI BÁO VÀ BÁO CÁO LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI**

1. Truong Thi Hanh et al., Synthesis and characterization of silver/diatomite nanocomposite bằng cách chiếu xạ EB, *Radiation Physics and Chemistry* 139, 141-146, 2017.
2. Trương Thị Hạnh và cộng sự, Chế tạo vật liệu nanocomposite – Bạc nano/diatomite bằng phương pháp chiếu xạ chùm tia điện tử, *Hội nghị Khoa học và Công nghệ hạt nhân toàn quốc lần thứ 12*, Nha Trang 02-04/8/2017
3. Trương Thị Hạnh, Nguyễn Thị Thu, Lê Anh Quốc (cán bộ trẻ), Khảo sát các đặc trưng của vật liệu nanocomposite-bạc nano/diatomite chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ chùm tia điện tử, *Hội nghị Khoa học và Công nghệ hạt nhân cán bộ trẻ ngành năng lượng nguyên tử lần thứ năm*, 03-04/10/2018.