

HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA HẠT NANO BẠC CHẾ TẠO BẰNG PHƯƠNG PHÁP POLYOL ĐỐI VỚI *E.COLI*, *S.AUREUS* VÀ *P.AERUGINOSA*

NGUYỄN THỊ KIM ANH¹, MAI BÍCH DUNG¹, LÂM HOÀNG ANH THU²

¹Viện Công nghệ Sinh học – Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh

² Phòng Công nghệ Sinh học, Trung tâm R&D, Khu Công nghệ cao TP. HCM
nguyenthikimanh@iuh.edu.vn

Tóm tắt. Khả năng kháng khuẩn của nano bạc chế tạo bằng phương pháp polyol sử dụng chất khử EG và chất bảo vệ PVP với *E.coli*, *S.aureus* và *P.aeruginosa* được nghiên cứu. Hạt nano bạc có kích thước <20nm, có độ ổn định sau thời gian 28 ngày về độ hấp thu. Hiệu suất diệt khuẩn đạt >99% với *E.coli* sau thời gian tiếp xúc 1 phút ở nồng độ 25ppm, >60% với *P.aeruginosa* và >40% với *S.aureus* sau thời gian tiếp xúc 5 phút ở nồng độ 100ppm. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là 3,125ppm, 12,5ppm và 6,25ppm và nồng độ giết chết tối thiểu (MBC) tương ứng là 6,25ppm, 25ppm và 12,5ppm lần lượt với *E. coli*, *S. aureus* và *P.aeruginosa*. Nano bạc được tạo ra với chất khử không có độc tính và khả năng diệt khuẩn hiệu quả có thể là nguồn nguyên liệu cho các ứng dụng trong lĩnh vực y sinh.

Từ khóa. Hiệu suất diệt khuẩn, MIC, MBC, nano bạc, polyol

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES PRODUCED BY POLYOL METHOD AGAINST *E.COLI*, *S.AUREUS* AND *P.AERUGINOSA*

Abstracts. Antibacterial activity of silver nanoparticles produced by polyol using EG as a reductant and PVP as a protectant against *E.coli*, *S.aureus*, and *P.aeruginosa* was studied. Nanoparticles were less than 20nm in size and stable after a period of 28 days. The sterilization efficiency was >99% with *E.coli* after 1 minute exposure at 25ppm of silver nanoparticle concentration; meanwhile it were >60% and >40% with *P.aeruginosa* and *S.aureus* after 5 minutes exposure at the concentration of 100ppm. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nano particles on *E. coli*, *S. aureus* and *P.aeruginosa* were 3,125ppm, 12,5ppm, 6,25ppm and 6,25ppm, 25ppm, 12,5ppm, respectively. Silver nanoparticles that is produced using non-toxic reductant and having efficient antibacterial activity could be a source for biological medical application.

Keywords. MIC, MBC, polyol, silver nanoparticles, sterilization efficiency

1. GIỚI THIỆU

Nano kim loại đóng vai trò quan trọng và được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như chẩn đoán hình ảnh, đánh dấu sinh học, quang tử học, quang điện tử [1]. Trong số các nano kim loại, nano bạc được nhiều tác giả nghiên cứu về các đặc tính quang, điện tử và hóa học tùy thuộc vào hình dạng và kích thước hạt nano liên quan tới các ứng dụng khác nhau. Nano bạc đã được sử dụng trong các hoạt động chống ung thư, hấp thu, xúc tác và trị liệu vết thương [2]; trong cảm biến hóa học và sinh học do các tính chất tán xạ Raman, các thiết bị điện tử và ứng dụng quang điện tăng cường nhờ tính dẫn điện và dẫn nhiệt cao [3]; sử dụng trong băng vết thương và dụng cụ y sinh học nhờ tính kháng khuẩn [4,5].

Cho đến hiện tại có nhiều phương pháp khác nhau để điều chế nano bạc như: tổng hợp hóa học, vật lý, hóa lý kết hợp, sinh tổng hợp và tổng hợp hóa thực vật. Mỗi phương pháp đều có ưu, nhược điểm riêng liên quan đến các vấn đề như giá thành, khả năng triển khai, kích thước và sự phân bố hạt nano [6,7]. Trong các phương pháp chế tạo nano bạc thì phương pháp hóa học được sử dụng phổ biến nhất [8]. Phản ứng khử để

dàng thực hiện được cũng như không yêu cầu thiết bị phức tạp. Kích thước, hình dạng và độ bền của hạt nano bạc phụ thuộc vào phương pháp chế tạo, đặc tính của dung môi, chất khử sử dụng và nhiệt độ [9,10,11]. Trong nghiên cứu này chúng tôi tổng hợp nano bạc bằng phương pháp polyol sử dụng ethylene glycol (EG) làm chất khử kết hợp với gia nhiệt từ 150°C – 200°C và chất ổn định là polyvinylpyrrolidone (PVP) trong 1 giờ. Ion Ag⁺ dưới tác dụng của chất khử EG tạo ra nguyên tử Ag. Sau đó, các nguyên tử này kết hợp với nhau tạo thành các hạt Ag có kích thước nano.

Dung dịch nano bạc sau khi được chế tạo tiếp tục được tiến hành kiểm tra các đặc tính và thử nghiệm kháng khuẩn trên một số chủng vi khuẩn bao gồm *E.coli*, *S.aureus* và *P.aeruginosa*. Đã từ lâu, ion bạc được biết đến là có khả năng ức chế cũng như có phổ diệt khuẩn rộng [12]. Nano bạc được quan tâm nghiên cứu gần đây và dần được sử dụng trong nông nghiệp và y tế như một vật liệu có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm và chống oxy hóa. Nano bạc được cho là ngăn cản quá trình nhân lên của rất nhiều loại vi khuẩn như *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter koseri*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Vibrio parahaemolyticus* và nấm *Candida albicans* theo cơ chế bám Ag/Ag⁺ vào các phân tử sinh học có trong tế bào vi khuẩn [13]. Hạt nano bạc có khả năng kháng khuẩn phổ rộng [10,14,15]. Nano bạc được ứng dụng trong các thiết bị điện tử, điện hóa, dược phẩm và kiểm soát sự phát triển của vi sinh vật trong các hệ thống sinh học nhằm giúp các hệ thống này thân thiện với hệ sinh thái [9,14,15,16].

2. VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

2.1. Tổng hợp nano bạc (AgNPs) bằng phương pháp polyol

Nano bạc được Kim và cs. (2006) [1] chế tạo thành công bằng phương pháp polyol sử dụng chất khử là hợp chất polyol để khử tiền chất kim loại với sự có mặt của chất bảo vệ và có sự tác động của nhiệt độ cao. Kết hợp polyvinyl pyrrolidone (PVP) (99.9%, Mw= 40000, Sigma Aldrich) với ethylene glycol (EG), khuấy từ 500 – 700 vòng/phút đến khi PVP tan hoàn toàn trong EG. Bổ sung bạc nitrate (99.9%, Mw= 169,87 g/mol, Sigma Aldrich) vào hỗn hợp dung dịch nói trên và vẫn tiếp tục khuấy từ. Sau khi muối bạc đã tan hoàn toàn, gia nhiệt lên 170°C – 200°C trong 40 phút. Làm lạnh nhanh cốc thủy tinh chứa dung dịch nano bạc trong 20 phút và thu dung dịch cho các thí nghiệm.

2.2. Kiểm tra đặc tính (hình dạng, kích thước, độ bền) hạt nano bạc

Kính hiển vi điện tử quét (Scanning electron microscope, SEM) được sử dụng để quan sát hình ảnh bề mặt, phân tích kích thước, hình dạng, sự phân bố, độ tinh khiết và mức độ kết tập hạt nano bạc. SEM có độ phân giải cao nên có thể xác định hình thái học của các hạt nano có kích thước <10 nm [5]. Dung dịch nano bạc được đưa vào lưới đồng và làm khô tự nhiên, tránh làm khô bằng nhiệt sẽ làm dung môi bay hơi nhanh khiến các hạt nano bạc bị tụ lại, kết đám với nhau, trước khi được chụp SEM.

Sử dụng phổ hấp thụ phân tử (Ultraviolet–visible spectroscopy, UV – vis) để xác định hình dạng, kích thước, nồng độ của nano bạc dựa vào các thuộc tính quang học của dung dịch chứa hạt nano bạc. Do hạt nano bạc có kích thước nhỏ hơn 20 nm chỉ có một bề mặt plasmon duy nhất nên trong phổ UV – vis của chúng chỉ xuất hiện 1 đỉnh (peak) duy nhất. Đặc tính của các hạt nano bạc được xác nhận bằng sự hình thành đỉnh cao giữa khoảng 410 – 420 nm trong quang phổ UV – vis.

2.3. Kiểm tra khả năng kháng khuẩn của nano bạc

2.3.1. Phương pháp thử nghiệm diệt khuẩn (Phương pháp đếm khuẩn lạc)

Chủng vi khuẩn *Escherichia coli* ATTC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 và các môi trường thạch dinh dưỡng nuôi cấy vi khuẩn trên lần lượt là Mueller Hinton agar (Sharlau), Baird Parker agar (Merck), *Pseudomonas* agar F và canh dinh dưỡng là Luria broth (LB, Invitrogen). Ở mỗi ống thí nghiệm: bổ sung dịch khuẩn vào sao cho nồng độ cuối cùng của ống có số vi khuẩn đạt 10⁵ - 10⁶ CFU/ml và nồng độ nano bạc bổ sung sao cho cuối cùng đạt 100ppm, 50ppm, 25ppm; vortex. Sau 1, 3, 5 phút, hút 100μl dịch trải đều lên môi trường thạch dinh dưỡng tương ứng. Sau thời gian nuôi cấy, tiến hành đếm khuẩn lạc.

2.3.2. Phương pháp thử nghiệm ức chế vi khuẩn (Phương pháp đo vòng ức chế vi khuẩn trên đĩa thạch)

Tính nhạy cảm của các chủng vi khuẩn với nano bạc được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán đĩa. Pha loãng dịch khuẩn tới nồng độ tế bào vi khuẩn đạt 10⁵ - 10⁶CFU/ml. Hút 100μl dịch khuẩn đã pha loãng cấy

trải đều lên trên bề mặt thạch dinh dưỡng tương ứng với từng loài vi khuẩn. Đục tạo các giếng trên các đĩa thạch (4 giếng/đĩa). Hút 100 μ l dung dịch nano bạc ở nồng độ từ 400 μ g/ml – 0,195 μ g/ml theo dãy pha loãng bậc 2 cho vào các giếng và đối chứng âm sử dụng EG. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ và thời gian thích hợp. Sau thời gian ủ tiến hành đo vòng ức chế vi khuẩn. Kết quả là vòng ức chế sự phát triển vi khuẩn của nano bạc [17].

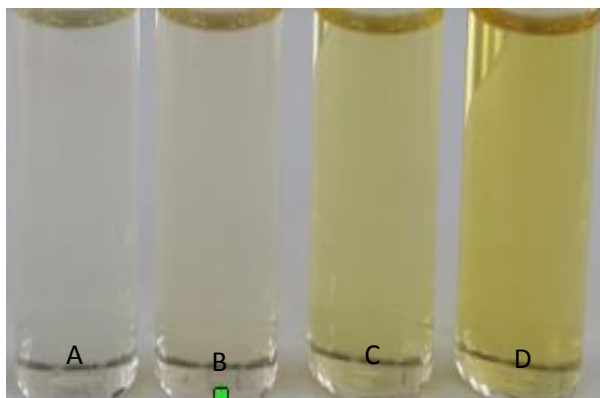
2.3.3. Phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu – minimum inhibitory concentration (MIC) và nồng độ giết chết tối thiểu – Minimum bactericidal concentration (MBC)

Hiệu quả ức chế vi khuẩn của các nano bạc được kiểm tra bằng phương pháp MIC. MIC được xác định trong môi trường LB sử dụng pha loãng bậc 2 của AgNPs với nồng độ từ 100 μ g/ml đến 0,195 μ g/ml với nồng độ vi khuẩn được điều chỉnh bằng máy đo quang phổ (BioSpectrometer basic, Eppendorf) ở bước sóng 625 nm là 0,1 (1×10^8 CFU/ml; tiêu chuẩn 0,5 McFarland). Dung dịch nano bạc theo các nồng độ tương ứng và môi trường canh LB với nồng độ vi khuẩn cuối cùng đạt 5×10^5 CFU/ml; đối chứng thay dung dịch nano bạc bằng nước muối sinh lý và thời gian và nhiệt độ ủ là 6 giờ ở 37 $^{\circ}$ C [18].

MIC là nồng độ thấp nhất của nano bạc ức chế sự phát triển của vi sinh vật 99%. MIC đã được ghi nhận bởi độ đục của ống trước và sau khi ủ với vi khuẩn. Sau khi xác định MIC của các AgNPs, 100 μ l các mẫu không cho thấy sự phát triển của vi khuẩn được cấy trải vào đĩa thạch tương ứng từng loài vi khuẩn, ủ trong 24 giờ ở 37 $^{\circ}$ C. MBC đã được quan sát thấy sự có mặt hoặc không có sự phát triển của vi khuẩn trong các đĩa thạch sau khi ủ. Điểm cuối của MBC được định nghĩa là nồng độ thấp nhất của tác nhân kháng khuẩn giết chết 99,9% lượng vi khuẩn ban đầu.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

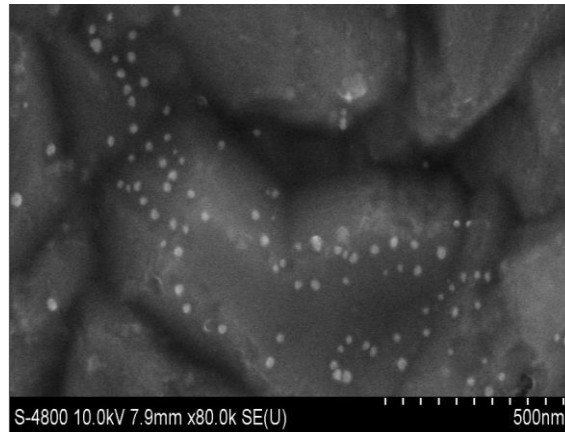
3.1. Chế tạo nano bạc



Hình 1. Dung dịch nano bạc ở các nồng độ khác nhau (A. 25ppm, B. 50ppm, C. 100ppm, D. 500ppm)

Dung dịch nano bạc được chế tạo ở dạng trong suốt, có màu vàng, không có hiện tượng lắng cặn hay kết tủa. Nồng độ muối bạc ban đầu có ảnh hưởng nhất định đến hình dạng hạt nano bạc tạo thành. Nếu nồng độ dung dịch AgNO₃ ban đầu quá lớn các hạt nano bạc sẽ tụ lại với nhau thành những hạt lớn hơn rất nhiều. Mặt khác, nếu nồng độ dung dịch muối bạc ban đầu quá thấp thì các hạt nano bạc tạo thành có nhiều kích thước khác nhau và kém bền. Các hạt nano bạc có hiện tượng cộng hưởng plasmon bề mặt do đó tùy thuộc vào nồng độ và kích thước hạt nano mà dung dịch chứa hạt nano bạc có màu sắc từ vàng nhạt đến cam.

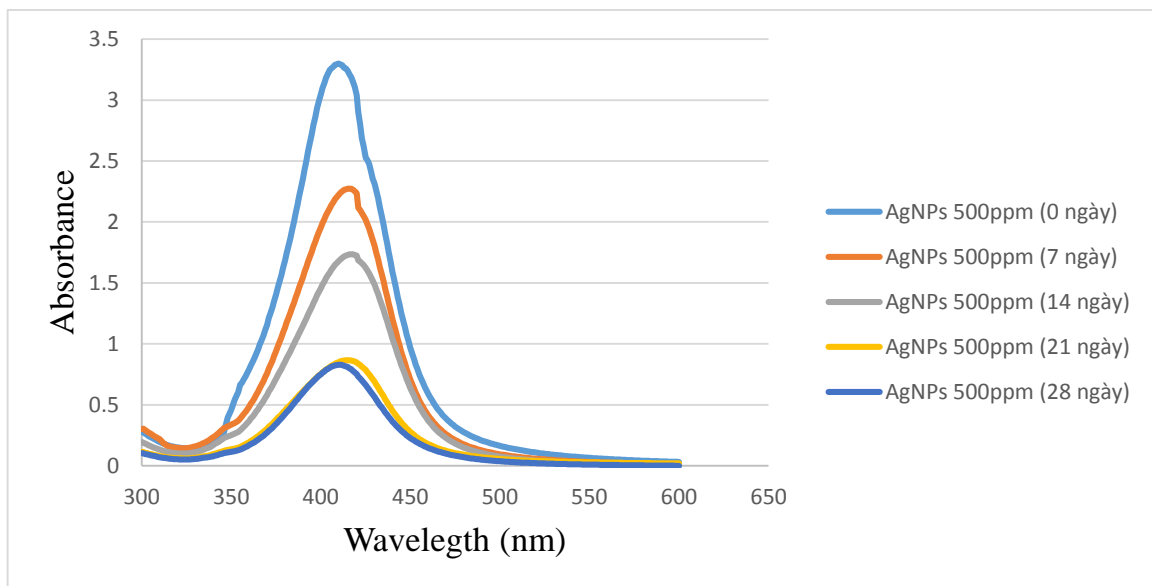
Các hạt nano bạc chế tạo trong nghiên cứu này có dạng hình cầu, phân tán đều, không bị kết đám, kích thước <20nm. Hạt nano bạc có kích thước từ 5- 100nm được cho là có hiệu quả diệt khuẩn tốt, và đạt hiệu quả diệt khuẩn cao nhất khi hạt nano bạc có kích thước 5nm [19]. Nồng độ và các điều kiện chế tạo bạc khác nhau ảnh hưởng trực tiếp đến kích thước hạt nano bạc. Do đó, muốn chế tạo nano bạc có kích thước và tính chất như nhau qua các lần chế tạo, phải đảm bảo chế tạo trong các điều kiện giống nhau như tốc độ khuấy, thời gian, nhiệt độ khử.



Hình 2. Các hạt nano bạc được chụp dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM)

3.2. Kiểm tra độ bền hạt nano bạc

Để bảo đảm được các tính chất các hạt nano thì việc chế tạo hạt nano bạc có độ ổn định tốt đóng vai trò rất quan trọng. Đỉnh (peak) của dung dịch nano bạc có nồng độ 500ppm thì độ hấp thụ cực đại tại bước sóng 410nm.



Hình 3. Phổ UV- vis so sánh độ bền dung dịch nano bạc 500ppm sau 0, 7, 14, 21, 28 ngày.

Peak có hiện tượng giảm mạnh sau 7 ngày chế tạo vì trong dung dịch tồn tại một số hạt nano bạc chưa được bao bọc bởi chất bảo vệ (ở đây là PVP) nên theo thời gian các hạt nano bạc này sẽ kết tụ thành hạt lớn hơn hay bị oxi hóa trở thành muối bạc. Tuy nhiên, sau 28 ngày chế tạo, dung dịch nano bạc cho thấy sự ổn định về độ hấp thụ (Hình 3).

3.3. Kiểm tra khả năng kháng khuẩn của hạt nano bạc

3.3.1. Kết quả diệt khuẩn của nano bạc

Nano bạc có hiệu suất diệt *E.coli* rất mạnh. Sau thời gian tiếp xúc khoảng 1 phút khi sử dụng dung dịch nồng độ bạc 25ppm hầu hết toàn bộ vi khuẩn đã bị tiêu diệt. Trong khi đó, hơn 60% *P.aeruginosa* và hơn 40% *S.aureus* bị tiêu diệt sau khoảng thời gian tiếp xúc 5 phút khi sử dụng nồng độ nano bạc 100ppm.

Bảng 1. Hiệu suất diệt khuẩn (%) của nano bạc đối với *E.coli*, *S.aureus* và *P.aeruginosa*.

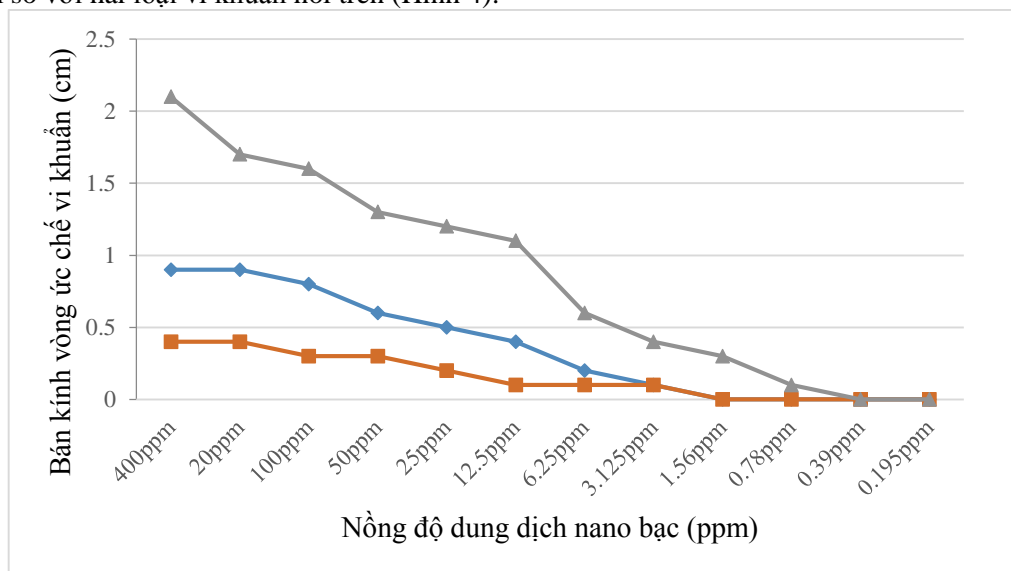
Nồng độ nano bạc	Thời gian tiếp xúc	Hiệu suất diệt khuẩn (%)		
		<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>
100ppm	1 phút	99,29	29,12	43,41
	3 phút	99,78	47,19	46,07
	5 phút	99,97	63,51	48,89
50ppm	1 phút	98,01	18,33	35,37
	3 phút	99,44	36,14	36,25
	5 phút	99,84	56,67	37,22
25ppm	1 phút	96,95	15,53	25,64
	3 phút	98,77	27,11	35,54
	5 phút	99,31	42,72	36,16

Ghost và Ramamoorthy (2010) [20] công bố kết quả *E.coli* DH5 α bị ức chế 60% sau 30 phút và 100% sau 4 giờ khi sử dụng hàm lượng bạc 50ppm. Trong nghiên cứu về cơ chế nano bạc tác động tới DNA của *S.aureus* [21], sau thời gian tiếp xúc 6 giờ với hàm lượng bạc 50ppm khiến cho DNA của tế bào vi khuẩn bị co lại và mất khả năng sao chép và khi tiếp xúc tới 12 giờ thì tế bào bị phá vỡ và giải phóng các bào quan ra ngoài.

3.3.2. Thử nghiệm ức chế vi khuẩn của dung dịch nano bạc

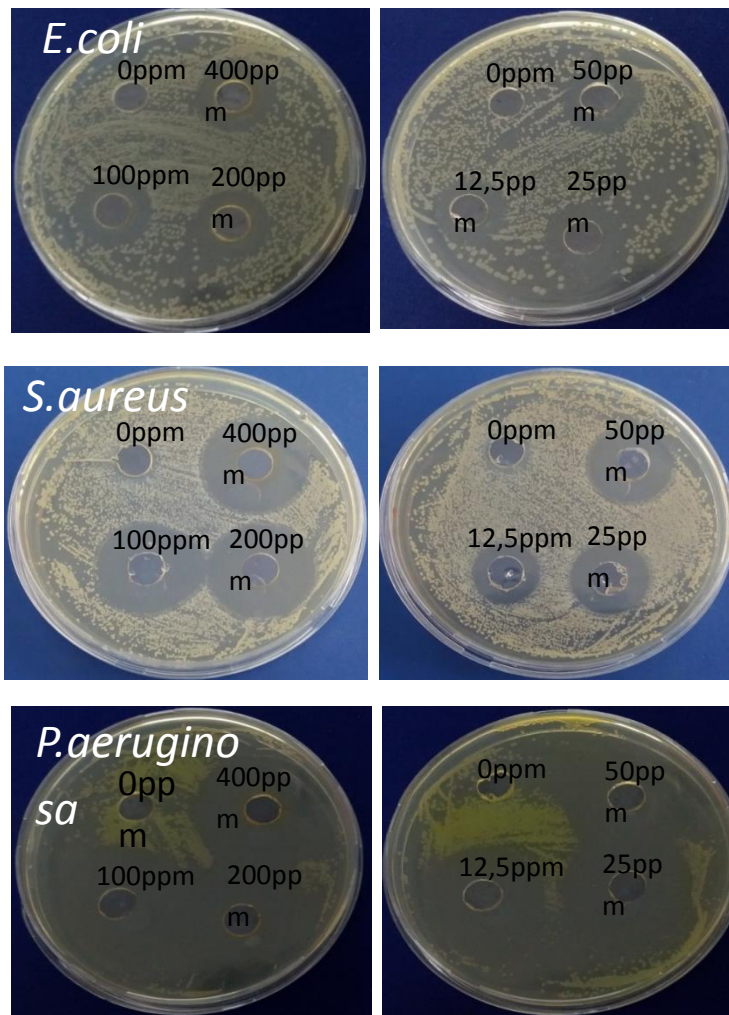
Khả năng ức chế vi khuẩn được thể hiện bằng bán kính đường kháng khuẩn (cm) nơi không xuất hiện khuẩn lạc tính từ miệng giếng tới chỗ xuất hiện khuẩn lạc trên đĩa thạch.

Một điều thú vị là, *P.aeruginosa* không bị tiêu diệt nhanh và triệt để như *E.coli*, nhưng lại bị nano bạc ức chế rất mạnh. Tương tự, *S.aureus* cũng bị nano bạc ức chế mạnh. Trong khi đó, *E.coli* bị nano bạc ức chế yếu hơn so với hai loại vi khuẩn nói trên (Hình 4).



Hình 4. Bán kính vòng ức chế vi khuẩn của dung dịch nano bạc khác nhau đối với *E.coli*, *S.aureus* và *P.aeruginosa*

Bán kính đường kháng khuẩn của nano bạc ở nồng độ 400ppm có thể đạt tới hơn 2cm đối với *P.aeruginosa*. Trên đĩa thạch, hầu như vi khuẩn không thể phát triển xung quanh giếng khi bị nano bạc khuếch tán và tiêu diệt (Hình 5).



Hình 5. Khả năng ức chế vi khuẩn *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa* của nano bạc ở các nồng độ khác nhau.

Ở nồng độ thấp 12.5ppm nano bạc vẫn ức chế hiệu quả đối với loại vi khuẩn này khi bán kính đường kháng khuẩn đo được >1cm. Khả năng ức chế *S.aureus* của nano bạc ở nồng độ 50ppm cho đường kháng khuẩn >0.5cm. Trong khi ở nồng độ dung dịch nano bạc 400ppm, bán kính kháng khuẩn đối với *E.coli* đo được <0.5cm (Hình 4, 5).

3.3.3. Thử nghiệm nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ giết chết tối thiểu (MBC)

Bảng 2. Thử nghiệm nồng độ ức chế tối thiểu của nano bạc ở các nồng độ khác nhau

Nồng độ AgNPs (ppm)	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78	0,39	0,195
<i>E.coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>S.aureus</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>P.aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

(-): không thấy xuất hiện độ đục cho thấy không có sự tăng trưởng vi khuẩn

(+): có độ đục cho thấy có sự tăng trưởng của vi khuẩn

Thử nghiệm xác định được nồng độ MIC và MBC ở 3 chủng vi khuẩn cho kết quả khác nhau. Sau 6 giờ khảo sát, nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của nano bạc với *E. coli*, *S. aureus* và *P.aeruginosa* được xác định lần lượt là 3,125ppm, 12,5ppm và 6,25ppm; còn nồng độ giết chết tối thiểu (MBC) là 6,25ppm, 25ppm và 12,5ppm tương ứng. Kết quả thử nghiệm MIC sau 24 giờ của dung dịch nano bạc lên 2 chủng *E. coli* và *S.*

aureus của bệnh viện Busan Paik là 100 ppm [22]. So sánh cho thấy nano bạc tạo ra trong nghiên cứu này có khả năng ức chế cả 3 loại vi khuẩn rất tốt ở hàm lượng thấp. Tamboli và cs (2013) [23] công bố giá trị MIC của nano bạc kích thước 6-16nm lần lượt với *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa* là 6,25ppm, 25ppm, 12,5ppm, cao hơn kết quả của nghiên cứu này. Kết quả thu được của nghiên cứu này (Bảng 2) tương đương với nghiên cứu của Jerzy và cộng sự (2015) [24] thử nghiệm tổng hợp nano bạc trên PVA và PVA/ silica. Sau 24 giờ, MIC của nano bạc được tổng hợp PVA là 3,1 ppm đối với vi khuẩn *E. coli* và 6,25ppm đối với *P. aeruginosa* và *S. aureus* và MBC là 6,25 ppm cho 3 chủng. Đối với nano bạc tổng hợp có PVA/ silica thì MIC là 6,25ppm và MBC là 12,5 ppm đối với cả 3 loại vi khuẩn trên. Như vậy, nano bạc chế tạo bằng phương pháp polyol cho kích thước <20nm và có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn rất hiệu quả.

4. KẾT LUẬN

Hạt nano bạc được tạo ra bằng phương pháp polyol có sử dụng EG là chất khử nhẹ, không có độc tính mang ưu điểm thân thiện khi ứng dụng vào các mục đích liên quan đến lĩnh vực y sinh. Kích thước hạt nano thu được <20nm có khả năng diệt khuẩn với hiệu suất cao và hàm lượng tối thiểu ức chế sự phát triển của vi khuẩn thấp đối với *E.coli*, *S.aureus* và *P.aeruginosa* chứng tỏ khả năng diệt khuẩn rất hiệu quả. Kết quả của nghiên cứu này là tiền đề cho việc nghiên cứu sử dụng hạt nano bạc chế tạo bằng phương pháp polyol ứng dụng trong việc kết hợp với các vật liệu khác có tính ứng dụng trong thực tiễn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Kim D., Jeong S., Moon J.. *Synthesis of silver nanoparticles using the polyol process and the influence of precursor injection*. Nanotechnology, vol. 17, pp. 4019-4024, 2006.
- [2] Jannathul F. M. and P. Lalitha. *Biosynthesis of silver nanoparticles and its applications*. Journal of Nanotechnology, vol. 2015, ID 829526, 2015.
- [3] Muhammad A. R., Zakia K., Anum R., Anjum N. S., Saira R. and Shahzad N. *Size- and shape-dependent antibacterial studies of silver nanoparticles synthesized by wet chemical routes*. Nanomaterials, vol. 6, no. 4, pp.74; doi: [10.3390/nano6040074](https://doi.org/10.3390/nano6040074), 2016.
- [4] Chernousova S., Epple M.. *Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal*. Angew Chem Int Ed Engl, vol. 52, no. 6, pp.1636-53; doi: [10.1002/anie.201205923](https://doi.org/10.1002/anie.201205923), 2013.
- [5] XiFeng Z., Zhi-Guo L., Wei S., Sangiliyandi G. *Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches*. International Journal of Molecular Sciences, vol. 17, no. 9, pp. 1534, 2016.
- [6] El-Nour K. M. M., A. Eftaiha, A. Al-Reda, A. A. Ammar. *Synthesis and applications of silver nanoparticles*, Arabian J. Chem. vol.3, pp.135-140, 2010.
- [7] Anna Z., S. Ewa, Z. Adriana, G. Maria, H. Jan. *Preparation of silver nanoparticles with controlled particle size*, Procedia Chem. vol.1, pp.1560-1566, 2009.
- [8] Irvani S, H. Korbekandi, S. V. Mirmohammadi, B. Zolfaghari. *Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods*, Research in Pharmaceutical Sciences, vol.9, pp.385-406, 2014.
- [9] Husen A, Siddiqi KS. *Phytosynthesis of nanoparticles: concept, controversy and application*. Nano Res, Lett., vol. 9, pp. 229, 2014.
- [10] Siddiqi KS, Husen A.. *Fabrication of metal nanoparticles from fungi and metal salts: scope and application*. Nano Res Lett., vol. 11, pp. 98, 2016.
- [11] Siddiqi KS, Husen A.. *Recent advances in plant-mediated engineered gold nanoparticles and their application in biological system*. J Trace Elements Med Biol., vol. 40, pp. 10-23, 2017.

- [12] Bradford, M.M.. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem, vol. 72, pp. 248-254, 1976.
- [13] Siddiqi KS, Husen A, Rao RAK (2018). A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. J Nanobiotechnology, 16(1):4.
- [14] Wei L, Lu J, Xu H, Patel A, Chen ZS, Chen G. *Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications*. Drug Discov Today, vol. 20, pp. 595-601, 2015.
- [15] Lara HH, Garza-Trevino EN, Ixtapan-Turrent L, Singh DK.. *Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds*. J. Nanobiotechnol., vol. 9, pp.30, 2011.
- [16] Lokina S, Stephen A, Kaviyaran V, Arulvasu C, Narayanan V. *Cytotoxicity and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles*. Euro J Med Chem., vol. 76, pp. 256-263, 2014.
- [17] Priyanka S., Yeon J. K., Hina S., Chao W., Kyu H. H., Mohamed E. F. and Deok C. Y. *Biosynthesis, characterization, and antimicrobial applications of silver nanoparticles*, International Journal of Nanomedicine, vol 10, no. 1, 2015.
- [18] Maribel G. G., Jean D., Stephan G. *Synthesis of silvernanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity*. InternationalJournal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering, vol 2, no. 7, 2008.
- [19] Shekhar A., Soumyo M., Suparna M. *Immobilized silver nanoparticlesenhance contact killing and show highest efficacy: elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver*. Nanoscale, vol. 5, pp. 7328-7340; doi: 10.1039/C3NR00024A, 2013.
- [20] Ghosh Bipasha and D. Ramamoorthy. *Effects of silver nanoparticles on Escherichia coli and it's implications*. Int. J. Chem. Sci.: vol. 8, no. 5, pp. S31-S40, 2010.
- [21] Li WR, Xie XB, Shi QS, Duan SS, Ouyang YS, Chen YB. *Antibacterial effect of silver nanoparticles on Staphylococcus aureus*. Biometals, vol. 24, no. 1, pp. 135-141, 2011.
- [22] Kim S. H., Lee H.S., Ryul D. S., Choi S. J., and Lee D. S. *Antibacterial Activity of Silver-nanoparticles Against Staphylococcus aureus and Escherichia coli*. Korean J. Microbiol. Biotechnol. vol. 39, no. 1, pp. 77–85, 2011.
- [23] Tamboli DP, Lee DS. *Mechanistic antimicrobial approach of extracellularly synthesized silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria*. J Hazard Mater vol. 260, pp. 878-884, 2013.
- [24] Jerzy P., Aleksandra S., Beata M.. *Antibacterial effect of silver nanoparticles synthesized onpolyvinyl alcohol*. Chem. Environ. Biotechnol, vol. 18, pp. 7-10, 2015.

Ngày nhận bài: 12/07/2018

Ngày chấp nhận đăng: 10/12/2019