

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤM GÂY BỆNH TRÊN CÂY THANH LONG CỦA VẬT LIỆU HỖN HỢP NANO BẠC/ĐỒNG

Đến tòa soạn 6-11-2019

Nguyễn Hoài Châu, Ngô Quốc Bưu, Đoàn Quang Hà

Viện Công nghệ môi trường, Viện Hàn Lâm Khoa Học và Công Nghệ Việt Nam

SUMMARY

STUDY ON ANTIFUNGAL ACTIVITY OF SILVER COPPER NANOMATERIALS ON DRAGON PHYTOPATHOGENIC FUNGI

*In the present study, silver and copper nanoparticles were synthesized by chemical microwave polyol method, where AgNO₃ and CuC₂O₄ were taken as metal precursors, glycerol as a reducing agent. TEM image of the obtained product showed the average particle size of 50 to 60 nm. Antifungal activity of the synthesized Ag/Cu nanomaterial was studied against the crop pathogenic fungi *Colletotrichum sp* and *Neoscytalidium dimidiatum* isolated from infected dragon plant in Long An province by Institute of Biotechnology, VAST. Assessment of fungicidal activity of the Ag/Cu nanomaterial showed that this product exhibited strong antifungal activity towards dragon pathogenic fungi. At highest nanosilver concentration of the Ag/Cu nanoparticles (40/24 ppm) sclerotial germination of *Colletotrichum sp* was almost inhibited (after 7 days of inoculation the inhibition effect on sclerotial germination attained 100%). For the case of *Neoscytalidium dimidiatum*, after 3 days at 40/24 ppm Ag/Cu NPs concentration the inhibition effect on sclerotial germination attained 93.3%. Comparing antifungal activity of total nano Ag/Cu's concentration with specific activities of silver and copper NPs separately which have the same concentration showed that the antifungal activity of Ag/Cu nanoparticles was noticeably higher, confirming the synergic effect of these metals. The obtained results suggested that the synthesized Ag/Cu nanomaterial acts as an effective antifungal agent. Thus, it could be used in developing novel antifungal agents for potential applications in agriculture.*

Keywords: dragon, antifungal activity, *Colletotrichum sp*, *Neoscytalidium dimidiatum*.

1. GIỚI THIỆU

Các bệnh do nấm gây ra dẫn đến những thiệt hại nghiêm trọng cho thu nhập của người nông dân, có thể tác động lớn đến kinh tế và xã hội của một vùng hoặc cả quốc gia. Một số bệnh thường gặp ở trên cây ăn quả và cây công nghiệp lấy quả như bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum sp*, bệnh nấm hồng do *Corticium salmonicolor* gây ra, bệnh phấn trắng do nấm *Uncinula necator* hại nho và bệnh sương mai (mốc sương) do nấm *Phytophthora sp* gây ra. Những bào tử của các loại nấm này còn gây bệnh trên quả sau khi thu

hoạch và rất khó xử lý vì quả đã bị nhiễm bệnh trước khi thu hoạch. Thiệt hại do nấm bệnh gây ra có thể xảy ra bất cứ lúc nào trong quá trình sinh trưởng và phát triển của cây. Bên cạnh những thiệt hại trực tiếp đến kinh tế, nhiều bệnh nấm còn có nguy cơ ảnh hưởng đến sức khỏe của người sử dụng. Hiện nay để phòng trừ một số loại nấm gây hại cho cây trồng người ta đã sử dụng nhiều loại thuốc hóa học. Tuy nhiên việc sử dụng chúng với liều lượng cao trong thời gian dài đã làm tổn hại quần thể vi sinh vật có ích trong đất, đồng thời tạo điều kiện cho các loài nấm gây bệnh trở nên kháng

thuốc. Dư lượng thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) trong sản xuất nông nghiệp và đất làm ô nhiễm môi trường, thấm vào nguồn nước ngầm, gây tác hại nghiêm trọng đối với sức khỏe con người và vật nuôi. Vì vậy việc nghiên cứu tìm ra những giải pháp công nghệ mới cho phép tạo ra các chế phẩm diệt nấm hiệu quả cao, có độc tính thấp và thân thiện với môi trường sẽ góp phần nâng cao sản lượng thu hoạch đối với các loại cây trồng và giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

Công nghệ nano có tiềm năng to lớn trong việc nâng cao sản lượng và chất lượng thực phẩm toàn cầu, giảm thiểu chất thải trong quá trình thâm canh bền vững các sản phẩm nông nghiệp. Để góp phần giảm nhẹ các tác dụng không mong muốn nêu trên công nghệ nano có khả năng đưa các hóa chất này vào trong các vỏ bọc nano, tạo ra một công cụ hữu hiệu để vận chuyển hướng đích phân bón cũng như thuốc BVTV nhà chậm có kiểm soát với độ chính xác cao. Công nghệ nano có thể tạo ra các chế phẩm hóa nông và các cơ chế vận chuyển mới, cho phép cải thiện năng suất sản xuất nông nghiệp, giảm thiểu khối lượng phân bón và thuốc BVTV sử dụng.

Tính chất kháng nấm của các hạt nano bạc đã được nghiên cứu trên hàng loạt các vi sinh vật gây bệnh [1-3]. Các nhà khoa học ngày càng quan tâm nghiên cứu khai thác các tính chất kháng nấm của AgNPs trong việc kiểm soát các bệnh do nấm gây ra cho cây trồng. Chẳng hạn, kết quả nghiên cứu sản xuất các chế phẩm thuốc trừ sâu chứa nano bạc được tổng hợp bằng phương pháp sinh học cho thấy trong tương lai không xa có thể sử dụng chúng như một vũ khí nano chống lại các vi sinh vật gây bệnh cho cây trồng [4].

Bên cạnh tính kháng khuẩn mạnh mẽ của nano bạc thì nguyên tố tiếp theo cần tính đến là các hạt nano đồng. Hoạt động giải phóng các ion đồng này được tăng cường hơn khi các hạt nano Cu ở kích thước nhỏ và diện tích bề mặt lớn cho phép nó tương tác gần với các màng vi khuẩn. Nó làm cho các proteins bề mặt tế bào không hoạt động, các protein này cần cho việc vận chuyển các vật chất đi qua màng tế bào.

Các ion đồng bên trong tế bào vi khuẩn cũng ảnh hưởng đến các quá trình sinh học. Nhiều kết quả nghiên cứu cho thấy ion Cu tác động lên proteins và các enzymes trong các vi khuẩn. Đồng nano tổng hợp từ phương pháp khử hóa học ion Cu^{2+} khi có mặt cetyl ammonium bromide và isopropyl alcohol có kích thước hạt 3-10 nm có tính kháng nấm chống lại các nấm gây bệnh trên cây trồng như *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternate*, *Curvularia lunata* [5-7].

Trên cơ sở khai thác các đặc tính kháng khuẩn, kháng nấm mạnh mẽ của nano bạc và nano đồng và hiệu ứng cộng năng giữa bạc và đồng, nhóm nghiên cứu đã tiến hành tổng hợp nano Ag/Cu bằng phương pháp polyol [8] và ứng dụng sản phẩm trong việc ức chế nấm gây bệnh trên cây thanh long.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Mẫu bệnh: nấm gây bệnh thán thư (*Colletotrichum sp*) và phấn trắng thanh long (*Neoscytalidium dimidiatum*) do Viện công nghệ sinh học phân lập từ cây thanh long nhiễm bệnh phấn trắng và thán thư ở tỉnh Long An.

Hóa chất: $AgNO_3$ (99,5%, Merck), $Cu_2C_2O_4$ (>99%, Merck), Glycerol (99,5%, Merck), nano Ag, nano Cu, do Viện Công nghệ môi trường cung cấp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp chế tạo vật liệu nano bạc đồng cùng lúc.

Chuẩn bị hỗn hợp các muối Ag và Cu (lượng cân $AgNO_3$ và $Cu_2C_2O_4$, loại p.a của hãng Merk) theo tỉ lệ mol 1/1 ($AgNO_3 = 1,574g$, $Cu_2C_2O_4 = 1,420 g$ tương ứng nồng độ yêu cầu $[Ag] = 1000 mg/L$ và $[Cu] = 600 mg/L$); Khuấy gia nhiệt dung môi glycerol ở $60^\circ C$ 30 phút; Đưa các lượng cân muối khoáng vào trong glycerol và khuấy cho đến khi tan hoàn toàn; Đưa mẫu hỗn hợp vào lò vi sóng để tiến hành phản ứng polyol trong thời gian 5-7 phút (công suất lò vi sóng 800 w, nhiệt độ $\sim 200^\circ C$) để tạo nano kim loại với trợ giúp của năng lượng vi sóng. Dung dịch huyền phù thu được cho để nguội dần trong lò vi sóng, thu được

hỗn hợp nano Ag/Cu với nồng độ Ag=1000 ppm và Cu=600 ppm.

Nghiên cứu đặc trưng của vật liệu

Phổ nhiễu xạ tia X cho phép xác định sự hiện diện của nguyên tố bạc và nguyên tố đồng trên phổ. Kích thước các hạt nano kim loại được khảo sát trên kính hiển vi truyền qua (TEM)

Phân lập các loại nấm

Các mẫu bệnh *Colletotrichum sp* và *Neoscytalidium dimidiatum* được thu thập từ cây thanh long nhiễm bệnh thán thư, bệnh đốm nâu ở tỉnh Long An. Phương pháp xử lý mẫu gồm: chọn những mô bệnh mới sau đó cắt mẫu thành miếng nhỏ có kích thước 1-2 mm; khử trùng dụng cụ bằng cồn 70°; rửa sạch bằng nước cất đã khử trùng 3 lần; thấm khô bề mặt bằng giấy thấm và đặt mẫu trong đĩa petri chứa môi trường potato dextrose agar (PDA). Khi đường kính tán nấm đạt 1- 2 cm, lấy phần bên trên của hệ sợi nấm, chuyển sang môi trường thạch nghiêng PDA mới và ủ ở 28°C trong 48 giờ. Sau đó, mẫu được bảo quản ở 4°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

Đánh giá hoạt tính kháng nấm của nano Ag/Cu.

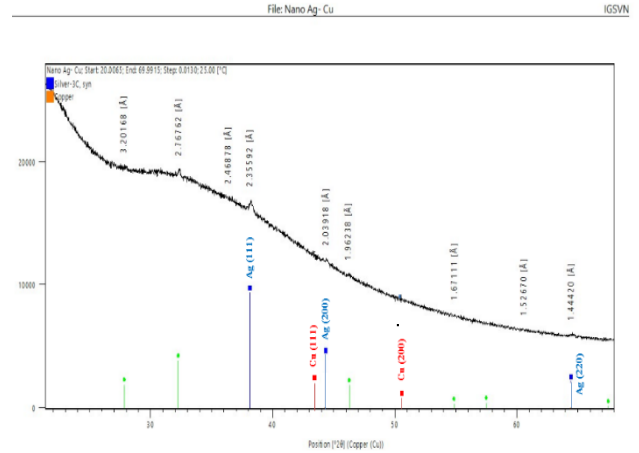
Trước tiên, môi trường PDA được hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút, sau đó để nguội đến nhiệt độ 50-60°C. Tiếp theo, vật liệu nano Ag/Cu được đưa vào môi trường PDA với nồng độ bạc khảo sát từ 10 – 40 ppm, lắc đều và đổ 30 ml vào mỗi đĩa petri. Nấm đã được làm thuần, cắt miếng thạch kích thước 0,5 cm có chứa nấm đặt vào chính giữa đĩa petri. Các đĩa petri được đặt trong tủ định ôn ở nhiệt độ 28°C. Chỉ tiêu theo dõi: đường kính tán nấm sau cấy 1, 3, 5, 7 ngày và tính hiệu quả ức chế (%) sau 7 ngày. Hiệu quả ức chế nấm của vật liệu nano Ag Cu được tính theo công thức Abbott:

$$HQUC \% = (1 - (D_{TN}/D_{ĐC})) * 100\%$$

Trong đó: D_{TN} : Đường kính tán nấm ở công thức thí nghiệm (cm) $D_{ĐC}$: Đường kính tán nấm ở mẫu đối chứng (cm).

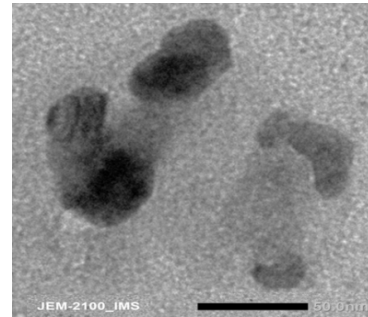
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc trưng nano bạc đồng



Hình 1. Phổ nhiễu xạ tia X của vật liệu

Phổ nhiễu xạ tia X (hình 1) cho thấy sự xuất hiện các peak đặc trưng của hạt nano bạc ở góc $2\theta = 38,2^\circ; 44,3^\circ$ và $64,4^\circ$. Cùng lúc các đỉnh nhiễu xạ đặc trưng của đồng tại $2\theta = 43,4^\circ$ và $50,5^\circ$ xuất hiện trên phổ XRD chứng tỏ việc chế tạo này đồng thời xuất hiện cả bạc và đồng.



Hình 2. Ảnh TEM nano Ag/Cu

Đối với vật liệu khử trùng, kích thước hạt có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng ức chế nấm của vật liệu, kích thước hạt càng nhỏ thì diện tích bề mặt càng lớn, khả năng tiếp xúc của vật liệu đối với các tế bào nấm càng cao và hiệu suất khử trùng càng lớn. Kết quả đo TEM (hình 2) cho thấy các hạt nano bạc và đồng tạo thành có phân bố kích thước nằm trong khoảng 50 - 60 nm.

3.2. Đánh giá hoạt tính kháng nấm của vật liệu

Hiệu quả ức chế nấm của vật liệu nano bạc đồng trên 2 nấm .

Hạch nấm *Colletotrichum sp* và *N.dimidiatum* có khả năng tồn tại lâu trên đồng ruộng là nguồn bệnh tồn lưu qua các vụ. Trên môi trường nhân tạo nấm có khả năng phát triển

nhau và dễ dàng hình thành hạch nấm. Việc hạn chế sự hình thành hạch nấm giúp giảm nguồn bệnh trên đồng ruộng là hết sức quan trọng trong việc phòng trừ nấm bệnh. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ vật liệu đến khả năng phát triển hạch nấm *Colletotrichum sp*

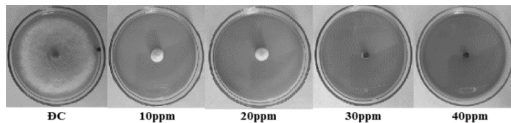
và nấm *N. dimidiatum*, thí nghiệm gồm 5 công thức, nhắc lại 3 lần, theo dõi đường kính tán nấm, tính toán hiệu quả ức chế bằng công thức Abbott, kết quả thí nghiệm được thể hiện trên bảng 1 và hình 3 và hình 4. Xử lý số liệu bằng phần mềm thống kê ANOVA.

Bảng 1. Khả năng ức chế nấm *Colletotrichum sp* sau 7 ngày và nấm *N. dimidiatum* sau 3 ngày của vật liệu trên môi trường PDA

<i>Colletotrichum sp</i>				<i>N. dimidiatum</i>		
Nồng độ tính theo Ag (ppm)	Đường kính nấm (D± 2 mm)			Hiệu lực ức chế nấm (%)	Đường kính nấm (D ± 2 mm)	Hiệu lực ức chế nấm (%)
	3 ngày	5 ngày	7 ngày		3 ngày	
ĐC	32,7	55,7	90 ^a	-	90,0 ^a	-
10	7,7	12,7	16,0 ^b	87,0 ^d	59,0 ^b	36,5 ^d
20	7,3	10,3	13,0 ^c	90,5 ^c	45,3 ^c	52,6 ^c
30	5,0	7,7	9,7 ^d	94,7 ^b	27,7 ^d	73,4 ^b
40	5,0	5,0	5,0 ^e	100 ^a	10,7 ^e	93,3 ^a
CV%			3,8	2,9	3,5	4,6

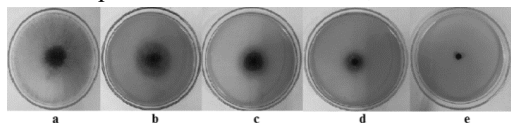
Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên mỗi cột số liệu chỉ ra sự khác biệt có giá trị thống kê ($p < 0,05$)

CV: Hệ số biến thiên



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ bạc đến sinh trưởng, phát triển nấm *Colletotrichum.sp*

Kết quả khảo sát trong điều kiện phòng thí nghiệm cho thấy, sau 7 ngày nuôi cấy đường kính tán nấm nhỏ nhất (0 cm) ở nồng độ nano bạc 40 ppm và hiệu quả ức chế cao nhất đạt 100%. Nồng độ bạc trong khoảng 10 – 30 ppm có hiệu quả ức chế nấm từ 87– 90,56%.



Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ bạc đến sinh trưởng, phát triển nấm *N.dim.* a, b, c, d, e lần lượt là ĐC, 10, 20, 30, 40 ppm.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, hàm lượng bạc ở các nồng độ khác nhau đều có khả năng ức chế

sinh trưởng và phát triển của nấm *N. dimidiatum*. Nano Ag/Cu với nồng độ 10 – 30 ppm có hoạt lực ức chế nấm chưa cao, kích thước tán nấm sau 3 ngày nuôi cấy lớn, đạt 2,77– 5,90 cm. Với nồng độ nano bạc 40 ppm đường kính tán nấm nhỏ nhất 1,27 cm. Hiệu quả ức chế nấm ở nồng độ bạc 10 – 20 ppm chỉ đạt từ 36,47 – 52,6%. Bạc với nồng độ 30 ppm có hiệu quả ức chế trung bình 73,41%, nồng độ 40 ppm cho hiệu quả ức chế nấm cao nhất, đạt 93,30%.

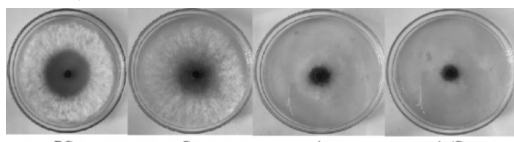
So sánh hiệu quả ức chế nấm *Neoscytalidium dimidiatum* của vật liệu nano bạc đồng với nano bạc, nano đồng.

Hiệu quả ức chế nấm *Neoscytalidium dimidiatum* của nano Ag và nano Cu so sánh với hỗn hợp nano Ag/Cu được đánh giá bằng thí nghiệm ở cùng nồng độ nano đến sinh trưởng và phát triển của nấm. Thí nghiệm gồm 4 công thức, nhắc lại 3 lần, theo dõi đường kính tán nấm sau 3 ngày nuôi cấy, tính toán hiệu quả ức chế bằng công thức Abbott, kết quả được thể hiện trên bảng 2 và hình 5. Xử lý số liệu bằng phần mềm thống kê ANOVA.

Bảng 2. Khả năng ức chế nấm (*N.dimidiatum*) trên môi trường PDA sau 3 ngày.

Nồng độ nano thí nghiệm	Đường kính nấm (D ± 2 mm) 72h	Hiệu lực ức chế nấm (%)
Cu-50ppm	82,0 ^b	9,4 ^c
Ag-50ppm	30,7 ^c	69,8 ^b
Ag/Cu-48ppm	28,0 ^d	72,9 ^a
ĐC	90,0 ^a	-
CV%	4,5	4,0

Ghi chú: Các chữ cái trên cột khác nhau chỉ ra sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)
CV: Hệ số biến thiên



Hình 5. Hình ảnh so sánh các nano riêng rẽ với vật liệu Ag/Cu trên nấm *N.dimidiatum*.

Kết quả thí nghiệm trên đã chứng minh việc sử dụng kết hợp bạc và đồng đem lại hiệu quả cao hơn so với khi sử dụng nano riêng rẽ ở cùng một nồng độ trên nấm *N.dimidiatum*. Cụ thể hỗn hợp Ag/Cu(30/18=48ppm) đạt hiệu quả 72,9% có hiệu quả cao hơn nano bạc 50ppm chỉ đạt 69,8%.

4. KẾT LUẬN

Tổng hợp vật liệu nano Ag/Cu bằng phương pháp polyol trong môi trường glycerol là biện pháp đơn giản và đạt hiệu quả cao. Các hạt nano Ag/Cu có dạng hình cầu và phân bố kích thước hạt khoảng 50-60 nm. Vật liệu này được tổng hợp trong nghiên cứu này có hoạt tính kháng nấm gây bệnh trên thực vật là *Colletotrichum sp* và *Neoscytalidium dimidiatum*. Nano Ag/Cu với nồng độ tính theo bạc 40 ppm có hiệu quả ức chế nấm *Colletotrichum* cao nhất đạt 100 % sau 7 ngày nuôi cấy, hiệu quả ức chế nấm *Neoscytalidium dimidiatum* cao nhất đạt 93,3% sau 3 ngày nuôi cấy.

Vật liệu nano Ag/Cu cần tiếp tục khảo nghiệm trên một số chủng nấm phân lập từ trên một số loại cây khác để có thể chứng minh phổ ức chế nấm trên thực vật nhằm sử dụng như một chất

kháng nấm mới để kiểm soát các loại nấm gây bệnh trên cây trồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A. et al. 2005. "The bactericidal effect of silver nanoparticles". *IOP Nanotechnology* 16, N 10, 2346-2354
- Oves M., Khan M. S., Zaid A. et al. 2013. "Antibacterial and Cytotoxic Efficacy of Extracellular Silver Nanoparticles Biofabricated from Chromium Reducing Novel OS4 Strain of *Stenotrophomonas maltophilia*". *PLoS ONE* 2013;8:e59140
- Tian J, Wong K.K., Ho C.M. et al. 2007. "Topical Delivery of Silver Nanoparticles Promotes Wound Healing". *ChemMedChem*. 2:129-136
- Mishra S., Singh H.B. 2015. "Biosynthesized silver nanoparticles as a nanoweapon against phytopathogens: exploring their scope and potential in agriculture". *Appl Microbiol Biotechnol*. 99:1097-1107
- M. Kidwai, N. K. Mishra, V. Bansal, A. Kumar, and S. Mozumdar, 2007. "Cu-nanoparticle catalyzed O-arylation of phenols with aryl halides via Ullmann coupling," *Tetrahedron Letters*, vol. 48, no. 50, pp. 8883-8887, 2007
- Kanhed P, Birla S, Gaikwad S, Gade A, Seabra AB, Rubilar O, Duran N, Rai M. 2014. "In vitro antifungal efficacy of copper nanoparticles against selected crop pathogenic fungi". *Materials Letters*. 2014, 115: 13-17
- Mayur Valodkar, Shefaly Modi, Angshuman Pal, Sonal Thakore, 2011. "Synthesis and antibacterial activity of Cu, Ag and Cu-Ag alloy nanoparticles: A green approach". *Materials Research Bulletin* 46(3):384-389
- O. V. Dement'eva and V. M. Rudoy, 2012. "Copper Nanoparticles Synthesized by the Polyol Method and Their Oxidation in Polar Dispersion Media. The Influence of Chloride and Acetate Ions". *ISSN 1061933X, Colloid Journal*, Vol. 74, No. 6, pp. 668-674