



## Hoạt tính kháng nấm của chế phẩm nano phức hợp Ag-Cu@CS chế tạo bằng phương pháp bọc *in-situ*

### In-vitro antifungal activities of silver-copper complex/chitosan (Ag-Cu@CS) nanoparticles synthesized by *in-situ* encapsulation

Lê Thế Tâm<sup>1\*</sup>, Nguyễn Hoa Du<sup>2</sup>, Lê Đăng Quang<sup>3</sup>, Hồ Đình Quang<sup>1</sup>, Phan Thị Hồng Tuyết<sup>2</sup>, Chu Thị Thùy Dung<sup>2</sup>, Trần Thị Ngân<sup>2</sup>, Lê Thị Thu Hiệp<sup>4</sup>, Trần Quang Đệ<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ Hóa Sinh-Môi trường, Trường Đại học Vinh

<sup>2</sup>Khoa Hóa học, Trường Sư phạm, Trường Đại học Vinh

<sup>3</sup>Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam, Bắc Từ Liêm, Hà Nội

<sup>4</sup>Trung tâm Thực hành-Thí nghiệm, Trường Đại học Vinh

<sup>5</sup>Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

\*Email: tamlt@vinhuni.edu.vn

#### ARTICLE INFO

Received: 15/4/2021

Accepted: 15/7/2021

Published: 15/10/2021

#### Keywords:

silver-copper complex/chitosan; *in-situ* encapsulation; plant protection.

#### ABSTRACT

In this study, silver-copper complex/chitosan (Ag-Cu@CS) nanoparticles were successfully synthesized by *in-situ* encapsulation reduction method. The results show that as-synthesized nanoparticles were quasi spherical in shape with the average diameter of 7.97 nm, well-dispersed particles in water and stable. The test phytopathogenic fungi *Sclerotium rolfsii*, *Magnaporthe oryzae* K, *Botrytis cinerea*, and *Colletotrichum gloeosporidises* were isolated from diseased fruits of Vinh orange trees, which was cultivated in Nghe An province. The obtained Ag-Cu@CS product have strong inhibition against four fungi *in-vitro*. The inhibitory effect of silver-copper complex/chitosan (Ag-Cu@CS) nanoparticles at concentrations of 25 ppm was reached over 50% on *Sclerotium rolfsii*, *Magnaporthe oryzae*, and *Botrytis cinerea* at a concentration of 50 ppm, the inhibitory effect of the nanoparticles on *Colletotrichum gloeosporidises* reached over 50% after 4 days of culture. These results suggested that silver-copper complex/chitosan (Ag-Cu@CS) nanoparticles can be used as a promising fungicide for plant protection.

#### Giới thiệu chung

Thuốc bảo vệ thực vật được coi là một vũ khí lợi hại của con người trong việc phòng chống dịch hại, bảo vệ cây trồng. Tuy nhiên, lượng thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) tồn dư và phát tán trong quá trình canh tác lại gây ra nhiều tác hại nghiêm trọng khác như ô nhiễm môi

trường đất, không khí, đặc biệt là môi trường nước do sự rửa trôi, gây độc cho người và gia súc, ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe người tiêu dùng. Đồng thời, nó làm suy giảm tính đa dạng sinh học, gây tổn hại đến quần thể thiên địch cũng như làm phát sinh tính kháng thuốc của sâu bệnh, tăng chi phí phòng trừ, gây ảnh hưởng lớn đến con người và môi trường. Cho nên, tìm

kiểm loại thuốc BVTV hiệu quả và an toàn hơn cho người và môi trường sinh thái là vấn đề hết sức cấp thiết nhằm xây dựng nền nông nghiệp xanh, sạch và bền vững. Điều này, thúc đẩy các nhà khoa học hướng đến công nghệ nano và những ứng dụng của nó trong nông nghiệp.

Trong những năm qua, việc nghiên cứu và ứng dụng công nghệ nano trong lĩnh vực BVTV đã có nhiều kết quả quan trọng trong sản xuất các chế phẩm phòng trừ bệnh do nấm, vi khuẩn gây nên [1]. Một số bệnh phổ biến trên cây ăn quả, cây lương thực như bệnh vàng lá, thối rễ, ghẻ, thán thư, rỉ sắt, loét quả, đốm nâu, khô lá... được điều trị hiệu quả bằng các chế phẩm nano đồng, kẽm, bạc, titan oxit, chitosan [1-3].

Đối với các bệnh trên thực vật, các hạt nano bạc có phổ hoạt động rộng và mạnh với nhiều loại nấm như *Bipolaris sorokiniana* (bệnh thối rễ), *Colletotrichum gloeosporioides* (bệnh thán thư), *Magnapotha grisea* (bệnh đạo ôn), *Pythium ultimum* (bệnh thối đen), *Botrytis cinerea* (bệnh mốc xám), *Scalerothia sclerotiorum* (bệnh mốc trắng), *Sphaerotheca pannosa* (bệnh phấn trắng), *Rhizoctonia solani* (bệnh khô vằn), *Colletotrichum theae* Petch (bệnh thối búp chèo), *Phytophthora sp* (bệnh vàng lá thối rễ) [4-6]. Kết quả thử nghiệm nano bạc với nồng độ thấp cho thấy nhiều loại nấm gây bệnh hại trên cây trồng làm giảm năng suất của các sản phẩm nông nghiệp đã được vô hiệu hóa.

Tương tự, khả năng chống khuẩn, chống nấm mốc hiệu quả của hạt nano đồng trong nông nghiệp đã được nghiên cứu trên một số loài cây trồng ở các thời kỳ sinh trưởng khác nhau, đem lại hiệu quả khác biệt, vượt trội hơn so với các loại thuốc BVTV truyền thống có nguồn gốc hóa học. Nano đồng có khả năng diệt hầu hết các loại nấm bệnh gây hại cây trồng, nó được xem như một loại thuốc bảo vệ thực vật đặc trị nấm an toàn, hiệu quả và không gây tồn dư các chất độc hại trên nông sản [2]. Tác giả P. Kanhed và cộng sự trong nghiên cứu của mình đã cho thấy nano đồng có khả năng kháng các loại nấm gây bệnh trên các cây trồng như nấm *Phoma destructiva*, nấm *Curvularia lunata*, nấm *Alternaria alternata* và nấm *Fusarium oxysporum* [7].

Các hạt nano đồng có kích thước 3-10 nm có hoạt tính kháng nấm gây bệnh trên cây trồng như nấm *Fusarium oxysporum* (gây bệnh vàng lá thối rễ, bệnh héo vàng, héo rũ, bệnh thối thân gốc); nấm *Alternaria alternata* (gây bệnh đốm lá, đốm vòng). Trong khi đó, tác giả S. M. Ouda và cộng sự cũng đã phát hiện ra rằng nano đồng và nano đồng kết hợp với nano bạc có khả năng kìm hãm và diệt hai loại nấm *Uernaria alternata* và

*Botrytis cinere* gây bệnh trên nhiều loại cây trồng khác nhau [8].

Tại Việt Nam, hoạt chất gốc đồng đã đăng ký trong danh mục thuốc BVTV được phép sử dụng để phòng trừ nhiều loại bệnh hại trên cây khoai tây, bắp cải, hồ tiêu, cây có múi... Tuy nhiên, các thuốc BVTV hoạt chất gốc đồng hiện nay hầu hết là hợp chất đồng vô cơ, thuộc nhóm độc II, chậm phân huỷ trong môi trường, gây độc hệ sinh thái. Trong tương lai gần Châu Âu sẽ cấm các thuốc vô cơ gốc đồng. Các thuốc gốc hữu cơ của đồng sẽ là sản phẩm được thay thế và được phép sử dụng trong nông nghiệp công nghệ cao. Hiện nay, ngoài sản phẩm gốc đồng vô cơ thì một số sản phẩm thuốc BVTV dạng nano đã được sử dụng như nano bạc đồng hợp kim. Mặc dù hoạt lực tăng lên đáng kể, nhưng nhà sản xuất vẫn đưa ra lời khuyên khi sử dụng cho mục đích phòng và đặc trị bệnh cho cây trồng nên kết hợp 2 loại nano bạc đồng dạng hợp kim nồng độ tổng số lên đến 500-1000 ppm và nano đồng oxyclorea đến 10.000 ppm. Điều này cho thấy các sản phẩm nano bạc, nano đồng vô cơ hiện nay vẫn chưa đạt được hoạt lực cao như mong muốn.

Mặt khác, các hạt nano dưới dạng dung dịch thường kém ổn định và dễ bị kết tụ, làm hạn chế đáng kể tiềm năng sử dụng các chế phẩm nano hiện nay. Mặc dù, các hạt nano đã được bao bọc bằng các chất hoạt động bề mặt hoặc bằng các polyme nhưng do quá trình tổng hợp hạt nano thường bằng phương pháp *ex-situ* làm các hạt dễ bị kết thành đám kích thước lớn, độ đơn phân tán thấp.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi dùng phương pháp bọc *in-situ* để chế tạo hạt nano hợp kim bạc-đồng (Ag-Cu@CS) bằng cách sử dụng chitosan vừa làm chất bọc các hạt nano trong quá trình tạo hạt, vừa làm chất ổn định, đồng thời cũng là chất khử. Đặc biệt, việc sử dụng chitosan làm chất khử đã làm giảm đáng kể lượng chất khử  $\text{NaBH}_4$ , giúp giảm chi phí và thân thiện môi trường hơn. Đồng thời, chúng tôi cũng đã thử nghiệm hoạt tính của chế phẩm thu được đối với các loại nấm gây bệnh cây trồng phổ biến, cho thấy hoạt lực cao, có triển vọng trong việc sử dụng làm các chế phẩm phòng trừ nấm.

## Thực nghiệm và phương pháp nghiên cứu

### Hóa chất

Các hóa chất được dùng trong quá trình tổng hợp nano phức hợp Ag-Cu đều thuộc loại tinh khiết phân tích của hãng BDH Chemicals và Merck, bao gồm: Silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ), Copper(II) sulfate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), Acetic

<https://doi.org/10.51316/jca.2021.085>

Acid (CH<sub>3</sub>COOH), Sodium borohydride (NaBH<sub>4</sub>), Polyvinylpyrrolidone (PVP), chitosan (CS). Nước cất đề ion được sử dụng trong quá trình nghiên cứu.

### Tổng hợp nano phức hợp Ag-Cu bọc chitosan

Cân 0,7 gam chitosan (93%) pha trong 50 ml dung dịch Acetic acid 2%, khuấy đều ở tốc độ 500 vòng/phút trong thời gian 5 giờ ở nhiệt độ 50 °C thu được dung dịch chitosan. Hòa tan 0,1 gam AgNO<sub>3</sub> và 0,1 gam CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O trong 50 ml nước cất, thêm 20 ml dung dịch PVP 5% và khuấy liên tục ở nhiệt độ phòng đến đồng nhất, thu được dung dịch A rồi nạp vào thiết bị phản ứng. Nhỏ từ từ dung dịch chitosan vào dung dịch A trong bình phản ứng và khuấy liên tục để được hỗn dịch B. Đun nóng B trong 5 giờ ở nhiệt độ 70 °C, được dung dịch C. Cuối cùng, 0,05 g NaBH<sub>4</sub> pha trong 30 ml nước được nhỏ từ từ vào dung dịch C thu được dung dịch màu nâu và tiếp tục khuấy trong vòng 3 giờ, ở nhiệt độ từ 50-60 °C, thu được nano Ag và Cu phân tán trong nền chitosan để tạo thành nano phức hợp Ag-Cu/chitosan (Ag-Cu@CS).

### Các phương pháp phân tích đặc trưng cấu trúc và thành phần

Phân tích đặc trưng cấu trúc bằng phép đo phổ hồng ngoại FT-IR trên thiết bị Nicolet iS10 (Thermo Scientific - Mỹ). Hình thái và kích thước hạt các mẫu Ag-Cu@CS NPs thu được khảo sát trên kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) JEM 2100. Phân bố kích thước và đường kính trung bình của hạt được tính toán bằng phần mềm công cụ hình ảnh Java (ImageJ), dựa trên dữ liệu trung bình của 100-150 hạt từ kết quả ảnh TEM. Phổ UV-Vis của các mẫu được ghi trên máy quang phổ Libra S80 (Biochrom-Anh), và thành phần nguyên tố trong sản phẩm được xác định bằng phương pháp hiển vi điện tử quét (SEM) với đầu dò tán xạ năng lượng tia X (EDX, Oxford Instruments-Anh) trên thiết bị JSM-6510LV (JEOL-Nhật Bản). Phân bố kích thước thủy động của hạt và thế zeta để đánh giá độ bền hệ keo của các mẫu nghiên cứu được xác định bằng phương pháp tán xạ laser động (Dynamic Light Scattering-DLS) trên thiết bị Zetasize-Nano ZS (hãng Malvern-Anh)

### Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học (hoạt tính kháng nấm)

Phương pháp poisoned food technique được sử dụng để thử nghiệm hoạt tính kháng các chủng nấm: *Colletotrichum gloeosporidises* (C-G); *Sclerotium rolfsii* (SRBV); *Magnaporthe oryzae* K (MGK) và *Botrytis cinerea*

(BCK). Trong đó, *C. gloeosporidises* là tác nhân gây bệnh thán thư trên cây cam; *S. rolfsii* gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng và *Magnaporthe oryzae* K gây bệnh đạo ôn trên lúa và nấm *Botrytis cinerea* là loại nấm mốc gây bệnh bệnh mốc xám trên nhiều thực vật.

Nấm được phân lập và làm thuần, dùng dụng cụ đục lỗ có đường kính 4 mm tiến hành đục vành ngoài đường kính tán nấm sau đó đặt lên môi trường Potato Dextrose Agar (PDA) của đĩa petri đã trộn với mẫu thử và nuôi trong tủ định ôn ở nhiệt độ 25 °C. Mẫu thử là nano phức hợp Ag-Cu@CS ở các nồng độ tổng Ag, Cu trong khoảng từ 12,5 ppm đến 50 ppm. Mỗi nồng độ khác nhau sẽ được thử nghiệm nhắc lại 3 lần trên môi trường PDA. Theo dõi sự phát triển của chủng nấm 1-7 ngày (tùy theo từng loại nấm) và đo đường kính tán nấm. Hiệu quả kháng nấm được tính theo công thức:

$$HL(\%) = 100 \times \frac{D_c - D_t}{D_c - 4}$$

Trong đó, HL(%) là hiệu lực ức chế, D<sub>c</sub> là đường kính tán nấm trên đĩa petri đối chứng (mm); 4 là đường kính khoanh agar-nấm; D<sub>t</sub> là đường kính tán nấm trên đĩa petri trộn mẫu thí nghiệm (mm).

Các nghiên cứu hoạt tính của hợp chất nano phức hợp Ag-Cu@CS được thực hiện tại Trung tâm Nghiên cứu Triển khai các Hoạt chất Sinh học (R&D Center of Bioactive Compounds), Viện Hóa học công nghiệp Việt Nam.

### Kết quả và thảo luận

#### Đặc trưng cấu trúc, hình thái, thành phần và độ bền của vật liệu

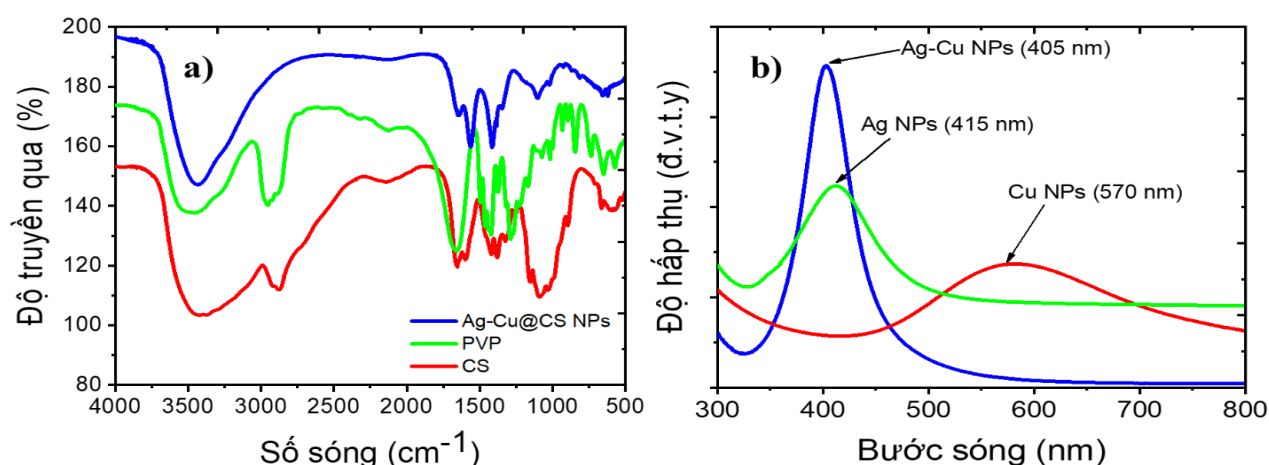
Hình 1a chỉ ra phổ hồng ngoại của mẫu nano phức hợp Ag-Cu@CS tổng hợp trong nghiên cứu này khi so sánh với phổ hồng ngoại của các polymer PVP và CS. Phổ hồng ngoại của CS có dải hấp thụ trung bình ở 1599 cm<sup>-1</sup> của dao động biến dạng nhóm NH<sub>2</sub>, bên cạnh dải hấp thụ khá rộng ở 1654 cm<sup>-1</sup> là dao động hóa trị của nhóm C=O, cho thấy sự có mặt của một số nhóm acetyl chưa bị deacetyl hóa hoàn toàn ở chitosan.

Dải mạnh và rộng ở tần số cao 3424 cm<sup>-1</sup> là dao động hóa trị của các nhóm OH, chồng lấn với dải ở khoảng 3400 cm<sup>-1</sup> của dao động hóa trị NH<sub>2</sub>. Dải hấp thụ mạnh ở 1091 cm<sup>-1</sup> thuộc dao động hóa trị C-OH phần gốc đường của CS. Đối với PVP, dải hấp thụ mạnh và rộng ở 1658 cm<sup>-1</sup> là dao động hóa trị của nhóm C=O trong polymer polyvinylpyrrolidone; dải hấp thụ mạnh ở 2955 cm<sup>-1</sup> là do dao động hóa trị C-H phần gốc hydrocarbon.

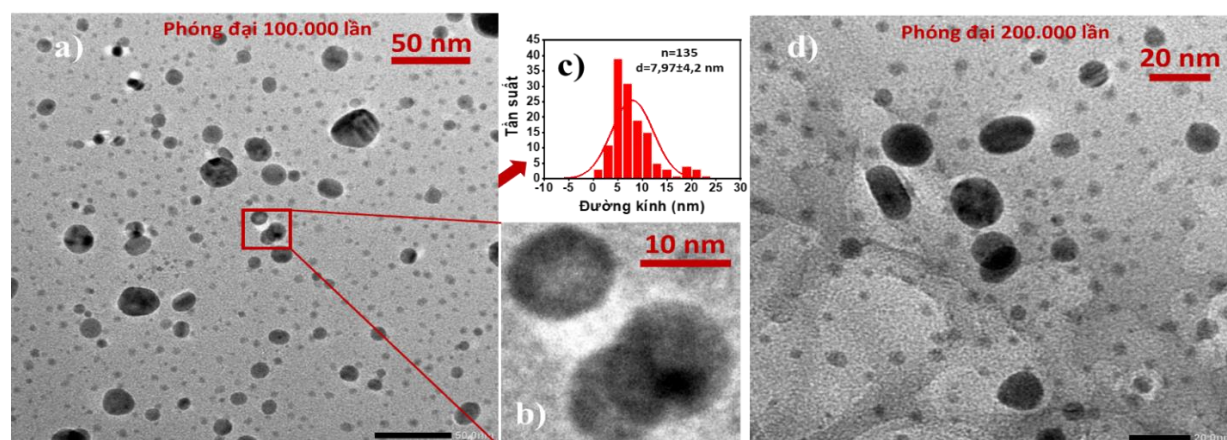
Đối với vật liệu nano phức hợp Ag-Cu@CS, dải hấp thụ mạnh và rộng ở  $3433\text{ cm}^{-1}$  là dao động hóa trị của các nhóm OH của CS, có dịch chuyển so với  $3424\text{ cm}^{-1}$  trong CS. Dải hấp thụ mạnh  $1091\text{ cm}^{-1}$  ứng với nhóm C-OH trong CS dịch chuyển thành dải trung bình ở  $1101\text{ cm}^{-1}$  trong phổ của vật liệu. Những điều này chứng tỏ các nhóm OH của CS có tương tác nhất định với bề mặt các hạt vật liệu. Dải trung bình ở  $1643\text{ cm}^{-1}$  có thể là dao động hóa trị của C=O ở các nhóm acetyl còn lại trong CS, bên cạnh đó dao động biến dạng nhóm  $\text{NH}_2$  dịch chuyển từ  $1599\text{ cm}^{-1}$  đến  $1562\text{ cm}^{-1}$  có cường độ mạnh hơn, chứng tỏ nhóm  $\text{NH}_2$  của CS cũng có thể đã tham gia tương tác yếu với hạt vật liệu [9]. Dải hấp thụ khá mạnh ở  $1423$  (ở PVP) và  $1420\text{ cm}^{-1}$  (ở CS) ứng với dao động biến dạng kiểu lưỡi kéo (scissor) của nhóm  $\text{CH}_2$ , xuất hiện ở  $1415\text{ cm}^{-1}$  trong vật liệu Ag-Cu@CS. Những số liệu phổ IR nêu trên chứng tỏ sản phẩm nano phức hợp Ag-Cu đã được tạo thành và bọc bởi chitosan bằng phương pháp *in-situ*.

Để xác nhận sự hình thành cấu trúc phức hợp Ag-Cu@CS chúng tôi tiến hành đo phổ UV-Vis của vật liệu chế tạo được (hình 1b), so sánh với phổ hấp thụ UV-Vis của hạt Ag và hạt Cu hình cầu được tổng hợp trong điều kiện tương tự. Phổ hấp thụ của hạt Ag cho dải cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) với cường độ mạnh, từ 320 đến 500 nm với cực đại ở khoảng 405 nm [10], còn hạt nano Cu cho dải SPR rộng từ 450 đến 850 nm với đỉnh có cường độ yếu hơn ở bước sóng 570 nm.

Trong khi đó, đối với vật liệu nano phức hợp Ag-Cu@CS, đỉnh hấp thụ plasmon cực đại (SPR) đã bị dịch chuyển sang bước sóng 415 nm, chứng tỏ có sự hình thành cấu trúc phức hợp giữa các hạt nano Ag và Cu. Sự tăng cường tính chất cộng hưởng plasmon bề mặt của các hạt phức hợp được giải thích dựa vào sự thay đổi tính chất điện tử bề mặt của các thành phần trong hệ vật liệu phức hợp [1].



Hình 1: Phổ FTIR (a) và phổ UV-Vis của dung dịch nano phức hợp Ag-Cu@CS thu được (b)



Hình 2: Ảnh hiển vi điện tử truyền qua TEM với độ phóng đại 100.000 lần (a); 200.000 lần (d) và giản đồ phân bố kích thước hạt (c) của dung dịch nano phức hợp Ag-Cu@CS

Hình 2 trình bày hình ảnh TEM về hình thái vi cấu trúc, ở các độ phóng đại 100.000 lần, 200.000 lần tương ứng và giản đồ phân bố kích thước hạt nano Ag-Cu@CS đã tổng hợp được theo phương pháp bọc *in-situ*. Kết quả cho thấy, các hạt nano phức hợp Ag-Cu@CS thu được có kích thước được chia làm hai loại, loại thứ 1 là các hạt có kích thước bé từ 3 nm đến 6 nm, chiếm số lượng lớn; loại nhóm hạt thứ hai có kích thước lớn hơn, chiếm số lượng ít với kích thước từ 10 nm đến 20 nm. Tuy nhiên tất cả các hạt nano thu được đều dạng hình cầu, đơn phân tán, không có hiện tượng các hạt kết đám với nhau và kích thước trung bình cho tất cả các hạt  $7,97 \pm 4,2$  nm (hình 2c).

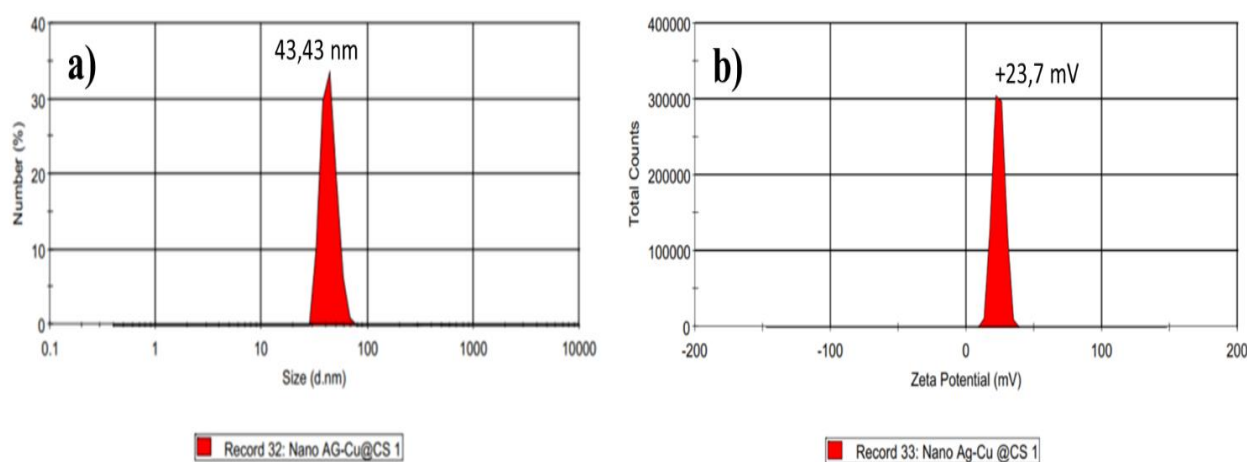
Trong nghiên cứu này, chitosan đóng vai trò vừa làm chất bọc các hạt nano trong quá trình tạo hạt, vừa là chất khử. Đồng thời, để làm tăng độ phân tán và ổn định, chúng tôi bổ sung thêm PVP giúp tạo thành các hạt nano phức hợp đơn phân tán và có kích thước bé. Các hạt bạc hấp thụ mạnh lên bề mặt của PVP, chuỗi polyvinyl pyrrolidon tạo ra hiệu ứng không gian, ngăn cản sự kết hợp giữa các hạt. Cơ chế ổn định hạt bạc của PVP có thể được giải thích gồm các giai đoạn sau: (i) Đầu tiên, PVP chuyển một cặp electron từ nguyên tử oxi và nitơ trên mạch sang các orbital s và p của các ion bạc tạo nên liên kết phối trí; (ii) PVP thúc đẩy sự hình thành nhân của kim loại bạc do phức ion  $Ag^+ - PVP$  dễ bị khử hơn so với ion  $Ag^+$  tự do trong dung dịch vì ion  $Ag^+$  nhận điện tử từ PVP; (iii) Chuỗi PVP ngăn cản sự tích tụ của các hạt bạc do hiệu ứng không gian [11].

Để đánh giá độ bền phân tán, sự phân bố kích thước của hệ hạt nano trong dung dịch, mẫu được khảo sát bằng phương pháp phổ tán xạ ánh sáng động. Kết quả phân tích DLS cho thấy có 1 đỉnh duy nhất (tương

ứng với kích thước cỡ hạt 43,43 nm, hình 3a), hoàn toàn không có sự kết khối, tạo ra các tập hợp hạt ở vùng kích thước trong khoảng 30 nm đến 60 nm. Điều này khẳng định các tiểu phân nano phân tán đồng đều, kích thước bé và đơn phân tán. Kích thước xác định từ ảnh TEM nhỏ hơn so với kết quả thu được từ kết quả phân tích DLS là hoàn toàn phù hợp, vì kết quả phân tích DLS (phương pháp tán xạ ánh sáng động) là kích thước động, thu được từ một tập hợp hạt rất lớn, trong khi ảnh TEM chỉ quan sát một vùng nhỏ, số lượng hạt được quan sát bé, kích thước thu được là kích thước tĩnh. Mặt khác kích thước hạt của các mẫu bọc đo trong môi trường chất lỏng (đo DLS) có kích thước lớn hơn khi chụp ảnh TEM, có thể được giải thích do khi đo hạt trong môi trường chất lỏng, các polime ưa nước sẽ tương tác với nước và làm các hạt có kích thước lớn hơn.

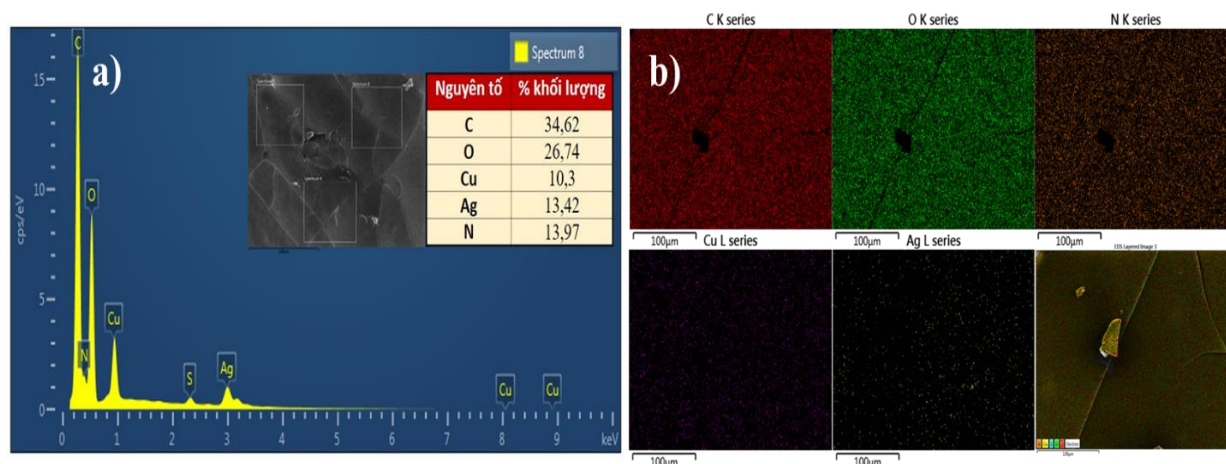
Trong hệ sản phẩm dạng lỏng, thế zeta thường được sử dụng để đánh giá độ ổn định hệ keo. Thế zeta thể hiện mức độ đẩy giữa các hạt tích điện cùng dấu gần nhau trong hệ phân tán. Giản đồ thế zeta của nano phức hợp Ag-Cu@CS được chỉ ra trên hình 3b. Kết quả cho thấy, dung dịch nano phức hợp thu được có độ bền tương đối tốt với giá trị thế zeta +23,7 mV.

Các nghiên cứu phân tích sự phân bố của các nguyên tố trên bề mặt và thành phần % khối lượng của chúng trong vật liệu nano phức hợp Ag-Cu@CS tổng hợp được thực hiện bằng cách sử dụng kính hiển vi điện tử quét (SEM) với đầu dò tán xạ năng lượng tia X (EDX) dựa trên SEM các vi ảnh trong hình 4. Kết quả phân tích phổ EDX cho thấy bạc và đồng chiếm 13,42 % và 10,3 % tương ứng khối lượng vật liệu. Kết quả này phù hợp với lượng bạc và đồng trong các tiền chất muối ban đầu.



Hình 3: Sự phân bố kích thước (a) và (b) thế zeta của dung dịch nano phức hợp Ag-Cu@CS chế tạo bằng phương pháp bọc *in-situ*





Hình 4: Phổ tán sắc năng lượng tia X (EDX) (a) và sự phân bố của các nguyên tử trong vật liệu tại các vùng lựa chọn (b)

**Kết quả hoạt tính kháng nấm**

Kết quả thử hoạt tính kháng nấm được thể hiện trong bảng 1.

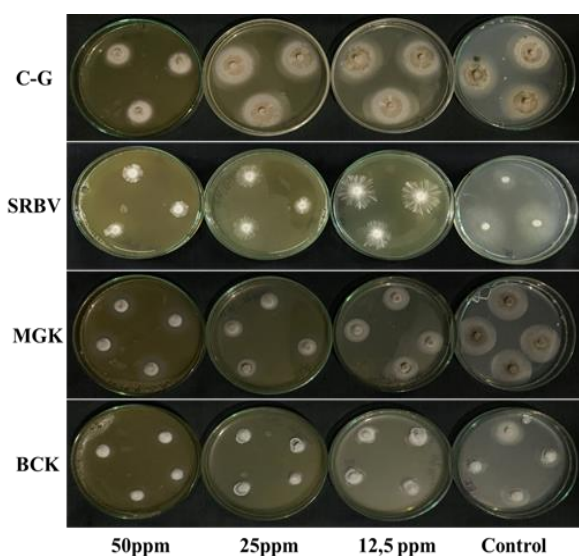
Bảng 1: Hoạt tính kháng nấm của nano phức hợp Ag-Cu@CS tại thời điểm sau 4 ngày nuôi cấy

Nấm	NĐ (ppm)	TB (mm)	HL (%)
C-G	50	9,23	57,22
	25	15,43	16,54
	12,5	16,50	0
	Control	16,23	0
SRBV	50	13,27	69,43
	25	18,47	52,26
	12,5	26,57	25,52
	Control	34,30	0,00
MGK	50	10,70	75,39
	25	12,90	67,31
	12,5	18,75	45,82
	Control	31,23	0
BCK	50	11,10	59,89
	25	12,80	50,28
	12,5	16,80	27,68
	Control	21,70	0

*Ghi chú:* *Colletotrichum gloeosporidises* (C-G); *Sclerotium rolfsii* (SRBV); *Magnaporthe oryzae* K (MGK) và *Botrytis cinerea* (BCK); NĐ: Nồng độ; TB: đường kính trung bình của tản mycelia của nấm (mm); HL (%): Hiệu lực ức chế

Thử nghiệm sơ bộ ban đầu bằng phương pháp *in-vitro* cho thấy chế phẩm của nano phức hợp Ag-Cu@CS có phổ ứng chế rộng với cả 4 loại nấm thử nghiệm. Tại nồng độ thử nghiệm cao nhất 50 ppm chế phẩm ức chế từ 57,22 tới 75,39% với cả 4 chủng nấm (Bảng 1 và Hình 5). Đồng thời, nồng độ thử nghiệm từ 12,5-50 ppm đối với cả 3 nấm *Sclerotium rolfsii*, *Magnaporthe oryzae* và *Botrytis cinerea* chế phẩm đều thể hiện mối tương quan giữa nồng độ và hiệu quả ức chế.

Nấm *Magnaporthe oryzae* gây bệnh đạo ôn trên lúa được thấy là chủng nấm nhạy cảm nhất với chế phẩm. Tại nồng độ 12,5 ppm chế phẩm ức chế tới 45,82% sự phát triển của thể sợi nấm. Tại 50 ppm chế phẩm ức chế tới 75,39% sự phát triển của sợi nấm, cho thấy khả năng ức chế mạnh của chế phẩm có thể ứng dụng vào thực tế và thử nghiệm trên đối tượng cây trồng. Chủng nấm *C. gloeosporidises* gây bệnh thán thư trên nhiều loại cây trồng và cây ăn quả có giá trị cao như xoài, cây có múi, thanh long, làm giảm giá trị dinh dưỡng cũng như cảm quan của trái cây sau thu hoạch. Chế phẩm của nano phức hợp Ag-Cu@CS được thấy có hiệu quả ức chế 57,22% đối với nấm *C. gloeosporidises*. Đây là chủng nấm gây bệnh cây trồng và thường phải sử dụng các loại thuốc BTV hóa học tổng hợp để phòng trừ do tính nhờn thuốc của nấm thường xuất hiện khi phun quá liều trong thời gian dài và lặp lại nhiều lần. Do vậy khả năng ứng dụng của nano phức hợp Ag-Cu@CS để phòng trừ bệnh thán thư do nấm *C. gloeosporidises* gây ra trên cây trồng là rất có triển vọng ứng dụng vì chưa thấy hiện tượng nấm nhờn thuốc. Trong các nghiên cứu tiếp theo, có thể tăng nồng độ của chế phẩm và thử nghiệm trên đối tượng cây trồng có bệnh để kiểm tra hiệu lực thực nghiệm trên đồng ruộng.



Hình 5: Khả năng ức chế của nano phức hợp Ag-Cu@CS đối với nấm *Colletotrichum gloeosporidises* (C-G); *Sclerotium rolfsii* (SRBV); *Magnaporthe oryzae* K (MGK) và *Botrytis cinerea* (BCK) sau 4 ngày nuôi cấy. Cột 50 ppm, 25 ppm và 12,5 ppm: các đĩa petri trong cùng cột được thử nghiệm ở nồng độ 50 ppm, 25 ppm và 12,5 ppm, tương ứng. Control: các đĩa petri trong cùng cột được thử nghiệm không chứa hoạt chất

## Kết luận

Bằng phương pháp bọc *in-situ* sử dụng chitosan làm chất ổn định, đồng thời là chất khử chúng tôi thu được các mẫu nano phức hợp Ag-Cu@CS có kích thước nhỏ, hạt phân tán tốt trong nước và ổn định. Thử nghiệm sơ bộ ban đầu bằng phương pháp *in-vitro* cho thấy chế phẩm của nano phức hợp Ag-Cu@CS có phổ ứng chế rộng với cả 4 loại nấm thử nghiệm. Tại nồng độ thử nghiệm cao nhất 50 ppm chế phẩm ức chế từ 57,22 tới 75,39% với cả 4 chủng nấm. Những kết quả này cho thấy rằng các hạt nano phức hợp Ag-Cu@CS có thể được sử dụng như một loại thuốc diệt nấm có triển vọng ứng dụng làm các chế phẩm bảo vệ thực vật, phòng trừ nấm và bệnh hại cây trồng

## Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Sở Khoa học và Công nghệ Nghệ An trong đề tài mã số 01/2020/HĐ-NCKHNA.

## Tài liệu tham khảo

1. S. F. Sabira, A. M. Kasabe, P. C. Mane, R. D. Chaudhari, P. V. Adhyapak, Nanotechnology 31(48) (2020) 485705.  
<https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab9da5>.
2. V. Saharan, G. Sharma, M. Yadav, M. K. Choudhary, S.S. Sharma, A. Pal, R. Raliya, P. Biswas, Int. J. Biol. Macromol 75 (2015) 346-353.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2015.01.027>
3. S. C. De La Rosa-García, P. Martínez-Torres, S. Gómez-Cornelio, M. A. Corral-Aguado, P. Quintana, Nikte M. Gómez-Ortiz, J. Nanomaterials 2018 (2018) 3498527.  
<https://doi.org/10.1155/2018/3498527>
4. E. Ibrahim, J. Luo, T. Ahmed, W. Wu, C. Yan, B. Li, J. Fungi 6 (4) (2020) 1-13.  
<https://doi.org/10.3390/jof6040294>
5. Y. K. Jo, B. H. Kim, G. Jung, Plant Disease 93(10) (2009) 1037-1043.  
<https://doi.org/10.1094/PDIS-93-10-1037>
6. K. A. Abd-Elsalam, Fungal Genomics Biol 2(2) (2012) 1-2.  
<https://doi.org/10.4172/2165-8056.1000e107>
7. P. Kanhed, S. Birla, S. Gaikwad, A. Gade, A. B. Seabra, O. Rubilar, N. Duran, M. Rai, Materials Letters 115 (2014) 13-17.  
<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.10.011>
8. S. M. Ouda, Research Journal of Microbiology 9(1) (2014) 34-42.  
<https://doi.org/10.3923/jm.2014.34.42>
9. D. Wei, W. Qian, Colloids Surfaces B: Biointerfaces 62(1) (2008) 136-142.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.09.030>
10. D. K. Bhui, H. Bar, P. Sarkar, G. P. Sahoo, S. P. De, A. Misra, Journal of Molecular Liquids 145(1) (2009) 33-37.  
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2008.11.014>
11. H. Wang, X. Qiao, J. Chen, X. Wang, S. Ding, Materials Chemistry and Physics 94 (2-3) (2005) 449-453.  
<https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2005.05.005>