

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤM GÂY BỆNH TRÊN CÂY ĐẬU TƯƠNG CỦA VẬT LIỆU NANO Ag/BENTONITE

Nguyễn Hoài Châu¹, Nguyễn Thị Thúy¹, Đào Trọng Hiền¹ ✉, Hoàng Thị Mai¹, Nguyễn Văn Quang¹, Phạm Hoàng Long¹, Nguyễn Thị Bích Ngọc², Trần Thị Phương Thêu¹

¹Viện Công nghệ môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Bảo vệ thực vật, Từ Liêm, Hà Nội

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: tronghienvh@gmail.com

Ngày nhận bài: 22.8.2016

Ngày nhận đăng: 20.5.2017

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, vật liệu nano bạc/Bentonite (Ag/CTS/Bentonite) được tổng hợp thành công bằng phương pháp khử Ag⁺ trong dung dịch nitrat bạc (AgNO₃) bằng borohydrid natri (NaBH₄). Chitosan (CTS) được sử dụng làm chất phân tán, chất ổn định và kết dính các hạt nano bạc lên vật liệu bentonite. Hình dạng và kích thước của các hạt nano bạc được đo trên kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM), kết quả thu được cho thấy các hạt nano bạc có dạng hình cầu và phân bố kích thước hạt trong khoảng rộng 5-90 nm. Trong khi đó, thành phần bạc trên bentonite được xác định bằng phương pháp phổ huỳnh quang tia X (XRF). Khả năng ức chế nấm gây bệnh trên cây đậu tương của vật liệu nano Ag/CTS/Bentonite được xác định trên hai đối tượng nấm là *Fusarium oxysporum* (*F. oxysporum*) và *Rhizoctonia solani* (*R. solani*) do Viện Bảo vệ Thực vật phân lập từ cây đậu tương nhiễm bệnh lở cổ rễ, bệnh thối rễ ở tỉnh Bắc Ninh. Kết quả nghiên cứu cho thấy vật liệu nano Ag/CTS/Bentonite có khả năng ức chế hai loài nấm này trên cây đậu tương. Hiệu quả ức chế nấm *F. oxysporum* của vật liệu nano Ag/CTS/Bentonite khi nồng độ bạc là 400 ppm đạt 66,70%, cũng nồng độ bạc này vật liệu nano Ag/CTS/Bentonite có khả năng ức chế nấm *R. solani* cao nhất đạt 92,82% sau 2 ngày nuôi cấy. Với hoạt tính kháng nấm cao, vật liệu nano Ag/CTS/Bentonite có thể được sử dụng trong thành phần vạt bọ hạt giống nhằm kiểm soát nấm gây bệnh trên cây trồng.

Từ khóa: Đậu tương, *Fusarium oxysporum*, hoạt tính kháng nấm, nano Ag/Bentonite, *Rhizoctonia solani*

MỞ ĐẦU

Trong trồng trọt, việc canh tác liên tục sẽ dẫn đến có nhiều loại nấm gây bệnh hại cây trồng tồn lưu trong đất, ảnh hưởng đến năng suất và gây thiệt hại lớn trong sản xuất nông nghiệp. Trong các loại nấm gây bệnh, đáng chú ý là những chủng nấm *F. oxysporum* và *R. solani* gây thiệt hại nghiêm trọng đến năng suất của nhiều loại cây ngũ cốc (lúa, ngô, khoai tây), các loại rau (cà chua, bắp cải, rau diếp), các loại cây ăn quả và cây công nghiệp ngắn ngày, dài ngày (lạc, đậu, bông, cao su). *F. oxysporum* và *R. solani* gây ra các triệu chứng thối rễ, lở cổ rễ, thối thân, bệnh đóm lá trên cây đậu tương (Baysal *et al.*, 2008; Nelson *et al.*, 1989; Petersen. Buddemeyer, 2004). Đặc biệt, *R. solani* và *F. oxysporum* tồn tại được trong đất, trong các mô của cây đã chết trong thời gian dài (Nelson, Summerll, 1989; Petersen, Buddemeyer, 2004).

Hiện nay, có nhiều biện pháp hiệu quả để ngăn ngừa các mầm bệnh trên cây trồng như vệ sinh đồng ruộng, các biện pháp sinh học và hóa học. Trong những năm gần đây, các nhà khoa học trên thế giới đã sử dụng một số vật liệu khử trùng tiên tiến có khả năng ức chế nấm gây bệnh trên cây trồng mang lại hiệu quả cao, nổi bật hơn cả là các vật liệu khử trùng có kích thước nano. Trong trồng trọt, một số sản phẩm nano đang dần thay thế các hóa chất bảo vệ thực vật truyền thống do nó có một số ưu điểm nổi bật như tính thân thiện với môi trường, phương pháp tổng hợp đơn giản và giá thành rẻ (Siddiqui *et al.*, 2015). Trong số các hạt nano kim loại có hoạt tính kháng khuẩn, nano bạc đã giành được sự quan tâm rất lớn từ các nhà khoa học trên thế giới ứng dụng trong lĩnh vực y tế, nông nghiệp, khử trùng nước, không khí v.v... (Moteshafí *et al.*, 2012; Oves *et al.*, 2013; Prakasha *et al.*, 2013). Một số nghiên cứu đã

cho thấy nano bạc tấn công các vi sinh vật bằng cách thay đổi cấu trúc màng tế bào và chức năng của vi sinh vật (Pal *et al.*, 2007). Có một điều quan trọng là các hạt nano bạc ức chế vi sinh vật ở nhiều hoạt động khác nhau, khác với chất kháng sinh chỉ có thể ức chế vi sinh vật đặc hiệu (Jo *et al.*, 2009). Những thử nghiệm *in vitro* được thực hiện cũng đã chỉ ra hiệu quả ức chế của hạt nano bạc đối với nhiều loại nấm gây bệnh trên thực vật (Gopinath, Velusamy, 2013; Kim *et al.*, 2009). Trong một nghiên cứu khác, các hạt nano bạc có khả năng chống lại với nhiều nấm bệnh trên thực vật như *Bipolaris sorokiniana* và *Magnapotha grisea* (Jo *et al.*, 2009). Nồng độ khác nhau của các hạt nano bạc đã được thử nghiệm để biết được tác dụng ức chế đối với tác nhân gây bệnh nấm trên quả như *Alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* và *Curvularia lunata* (Krishnaraj *et al.*, 2012). Nano bạc đã thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và nấm cao ở các nồng độ nhỏ, tương đương với các ion bạc và các chất kháng khuẩn thông thường (Taylor *et al.*, 2005; Rogers *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009a,b).

Để ứng dụng hiệu quả nano bạc trong thực tế, người ta tìm cách gắn nano bạc lên vật liệu mang nhằm giảm giá thành, hạn chế các tác nhân bên ngoài làm bất hoạt nano bạc và kéo dài hoạt tính kháng nấm của nano bạc. Montmorillonite (MMT - thành phần chính của bentonite) có các đặc trưng như khả năng trao đổi ion, khả năng trương nở, tính kết dính diện tích bề mặt lớn nên được ứng dụng rộng rãi trong đời sống. Theo một số nghiên cứu đã được công bố, ion bạc có thể xen vào giữa các lớp của MMT, vật liệu tạo thành có khả năng ức chế một số chủng nấm gây bệnh. Để gắn nano bạc lên MMT, các nhà nghiên cứu đã sử dụng polyme như là chất kết dính hoặc chức năng hóa bề mặt MMT nhằm tạo ra vật liệu composite mới (Shameli *et al.*, 2011; Santosa *et al.*, 2011).

Trong số các polyme tự nhiên, CTS đã được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi như là một polyme cation sinh học vì polyme này có tính tương thích sinh học cao, dễ phân hủy, không độc hại, dễ hòa tan trong môi trường acid acetic nhẹ, có khả năng tạo màng,... CTS có thể xen vào lớp giữa của MMT qua quá trình trao đổi cation và liên kết hydro tạo thành vật liệu cấu trúc bionanocomposit. Vật liệu bionanocomposit kim loại/CTS/Bentonite với những đặc tính đặc biệt sẽ mang lại nhiều ứng dụng đầy hứa hẹn (Shameli *et al.*, 2011).

Để chế tạo vật liệu nano Ag/CTS/Bentonite, trước tiên các ion bạc được đưa lên vật mang bentonite, các ion bạc có thể phân tán vào khoảng không gian giữa hai lớp của bentonite và trên bề mặt của vật liệu này dưới sự hỗ trợ của máy khuấy tốc độ cao. Tiếp theo, các hạt nano bạc trên bentonite được tạo ra bằng cách khử các ion bạc sử dụng dung dịch natri borohydrit theo tỷ lệ mol $BH_4^-:Ag^+ = 1:4$, sự có mặt của CTS có vai trò làm chất phân tán và kết dính vật liệu bionanocomposit (Shameli *et al.*, 2011; Santosa *et al.*, 2011; Ngo Quoc Buu *et al.*, 2011...).

Trong nghiên cứu này, vật liệu nano Ag/CTS/Bentonite đã được tổng hợp thành công bằng cách sử dụng $AgNO_3$, CTS và $NaBH_4$ làm tiền chất bạc, chất ổn định và chất khử tương ứng, bentonite được sử dụng làm vật liệu mang. Ngoài ra, hoạt tính kháng nấm của vật liệu nano Ag/CTS/Bentonite được chứng minh qua tác dụng ức chế một số chủng nấm gây bệnh trên thực vật như: *F. oxysporum* và *R. solani*. Các kết quả thu được từ công trình này là cơ sở khoa học để đề xuất các biện pháp kiểm soát dịch bệnh trên cây trồng trong tương lai.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Mẫu bệnh: nấm gây bệnh héo vàng (*F. oxysporum*) và lở cổ rễ đậu tương (*R. solani*) do Viện Bảo vệ thực vật phân lập từ cây đậu tương nhiễm bệnh lở cổ rễ, bệnh thối rễ ở tỉnh Bắc Ninh.

Hóa chất: $AgNO_3$ (99,5%, Merck), $NaBH_4$ (>99%, Cica), axit citric (99,5%, Merck) và chitosan (độ deacetylated: 75% - 85%, Sigma - Aldrich), bentonite (Hàm lượng MMT > 70%, do Viện Công nghệ môi trường cung cấp).

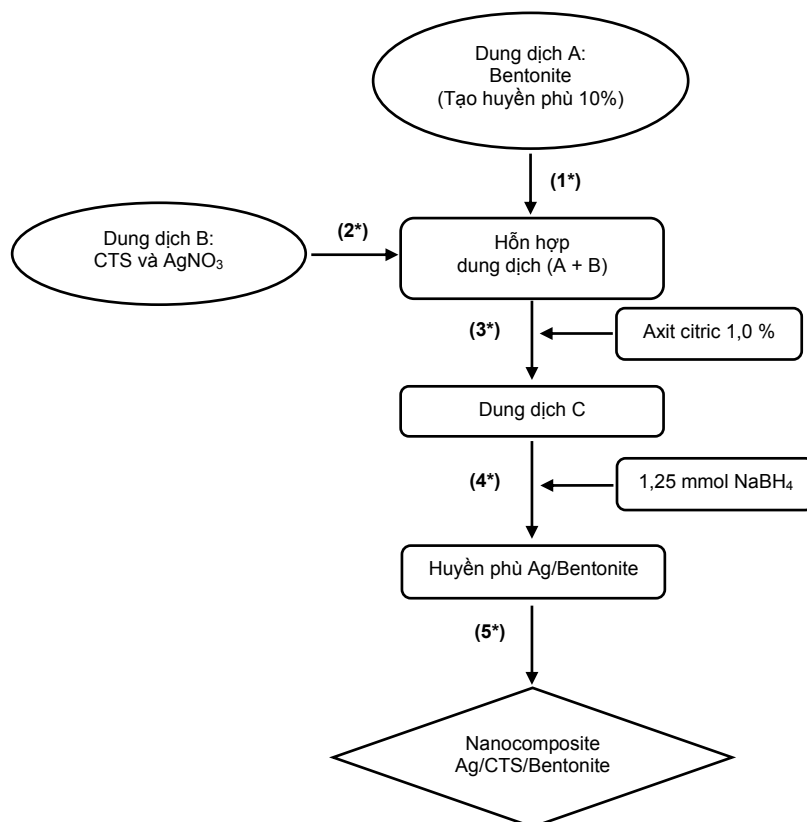
Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp chế tạo vật liệu nano Ag/CTS/Bentonite

Trước tiên, 25 g bentonite được tạo huyền phù 10% trong nước khử ion để trương nở trong 24 giờ sau đó đem siêu âm trong 30 phút thu được dung dịch A. Dung dịch B được chuẩn bị bằng cách hút 50 ml dung dịch CTS (10g/lít) cho vào cốc thủy tinh dung tích 1 lít có chứa 420 ml nước cất, thêm 4,63 mmol $AgNO_3$ vào dung dịch CTS ở trên. Tiếp theo, dung dịch A và dung dịch B được trộn đều với nhau bằng máy khuấy cơ học IKA RW 20 digital (1.500 vòng/phút) trong 30 phút. Sau đó, hỗn hợp được điều

chỉnh pH bằng dung dịch axit citric 1% sao cho pH của hỗn hợp đạt 4,5, tiếp tục khuấy thêm 30 phút thu được dung dịch C. Dung dịch C được để trong bóng tối qua đêm, sau đó được khuấy đều bằng máy khuấy cơ học với tốc độ 2.000 vòng/phút. Các ion bạc được khử bằng cách nhỏ từ từ 1,25 mmol dung dịch NaBH₄ vào dung dịch C, tiếp tục khuấy đều hỗn hợp

trong 15 phút. Tiếp theo, lọc hỗn hợp huyền phù để thu vật liệu nanocomposite Ag/CTS/Bentonite. Cuối cùng, sản phẩm được sấy khô ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ thu được bột nanocomposite Ag/CTS/Bentonite. Sơ đồ quy trình chế tạo vật liệu nano Ag/CTS/Bentonite được thể hiện trên hình 1 (Lee *et al.*, 2013; Oves *et al.*, 2013).



Hình 1. Sơ đồ quy trình chế tạo vật liệu nano Ag/CTS/Bentonite.

Nghiên cứu đặc trưng của vật liệu nano

Phổ huỳnh quang tia X: việc xác định thành phần của bạc trên bentonite được thực hiện trên máy phổ kế huỳnh quang tia X - VietSpace, kiểu XRF5006-HQ02, điện áp 40 kV, dòng 20 mA.

Kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM): kích thước của hạt nano bạc được xác định trên máy đo TEM (Model-JEOL 1010, Nhật Bản), hệ số phóng đại $M = \times 50 - \times 600.000$, độ phân giải $\delta = 3 \text{ \AA}$, điện áp gia tốc $U = 40-100 \text{ kV}$.

Phân lập các loại nấm

Các mẫu bệnh *F. oxysporum* và *R. solani* được thu thập từ cây đậu tương nhiễm bệnh lở cổ rễ, bệnh thối rễ ở tỉnh Bắc Ninh. Phương pháp xử lý mẫu gồm: a) chọn những mô bệnh mới sau đó cắt mẫu thành miếng nhỏ có kích thước 1-2 mm; b) khử trùng dụng cụ bằng cồn 70°; c) rửa sạch bằng nước cất đã khử trùng 3 lần; d) thấm khô bề mặt bằng giấy thấm và đặt mẫu trong đĩa petri chứa môi trường potato dextrose agar (PDA). Khi đường kính tản 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 bạc

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/CTS/Bentonite được đưa vào môi trường PDA với nồng độ bạc khảo sát từ 20 – 400 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, 2, 3, 5, 7 ngày và tính hiệu quả ức chế (%) sau 7 ngày. Hiệu quả ức chế nấm của vật liệu nano Ag/CTS/Bentonite được tính theo công thức Abbott:

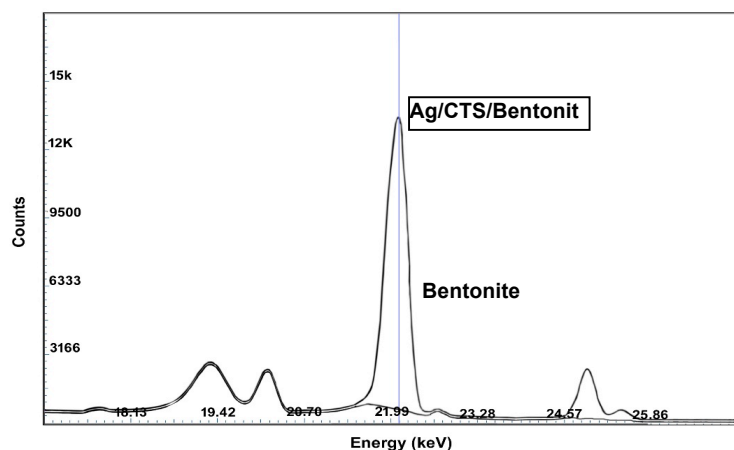
$$HQ\% = \left(1 - \frac{D_{TN}}{D_{DC}}\right) * 100$$

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

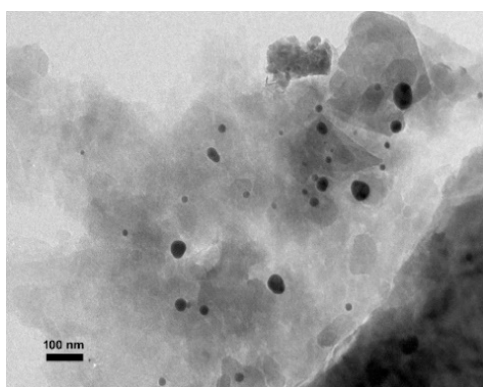
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc trưng của nano bạc

Trên hình 2, đỉnh hấp thụ năng lượng đặc trưng của bạc xuất hiện tại vị trí có năng lượng 21,99 và 25,00 keV, đây được coi là các đỉnh đặc trưng của Ag_{α} và Ag_{β} trên bentonite. Ngoài ra, phổ XRF còn thể hiện đặc trưng của mẫu nền bentonite với sự xuất hiện của các đỉnh MMT. Kết quả đo phổ XRF chứng minh sự hiện diện của bạc trên vật liệu mang bentonite (Shameli *et al.*, 2011; Santosa *et al.*, 2011).



Hình 2. Phổ huỳnh quang tia X của vật liệu nano Ag/CTS/Bentonite.



Hình 3. Ảnh TEM của vật liệu nano Ag/CTS/Bentonite.

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 3) cho thấy các hạt nano bạc tạo thành có phân bố kích thước nằm trong khoảng 5 - 90 nm, kết quả thu được có thể được giải thích do cấu trúc của MMT ảnh hưởng đến kích thước hạt bạc tạo thành, các hạt bạc nằm giữa cấu trúc lớp của MMT có kích thước nhỏ hơn so với các hạt bạc nằm trên bề mặt MMT (Shameli *et al.*, 2011).

Hiệu quả ức chế nấm của vật liệu nano Ag/CTS/Bentonite

Hiệu quả ức chế nấm *R. solani* của vật liệu Ag/CTS/Bentonite

Hạch nấm *R. solani* 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 nhanh 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 bạc đến khả năng phát triển hạch nấm *R. solani* đã được khảo sát, kết quả thí nghiệm được thể hiện trong bảng 1 và hình 4.

Bảng 1. Hiệu quả ức chế nấm *R. solani* của vật liệu Ag/CTS/Bentonite.

TT	Công thức	Đường kính tàn nấm (cm)		Số lượng hạch nấm/Đĩa	Hiệu quả ức chế (%)
		Sau 1 ngày	Sau 2 ngày		
1	CT 1	1,80	6,30 ^g	65,67	28,16 ^h
2	CT 2	1,50	5,07 ^f	55,67	42,19 ^g
3	CT 3	0,97	4,23 ^e	43,33	51,77 ^f
4	CT 4	0,83	2,77 ^d	15,67	68,42 ^e
5	CT 5	0,53	2,53 ^d	0,00	71,15 ^d
6	CT 6	0,77	1,27 ^c	0,00	85,52 ^c
7	CT 7	0,73	0,93 ^b	0,00	89,40 ^b
8	CT 8	0,60	0,63 ^a	0,00	92,82 ^a
9	ĐC	3,53	8,77 ^h	382,33	-
	CV%	5,90	3,70	-	2,6

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

CT1 - Nồng độ bạc 20 ppm

CT6 - Nồng độ bạc 200 ppm

CT2 - Nồng độ bạc 40 ppm

CT7 - Nồng độ bạc 300 ppm

CT3 - Nồng độ bạc 60 ppm

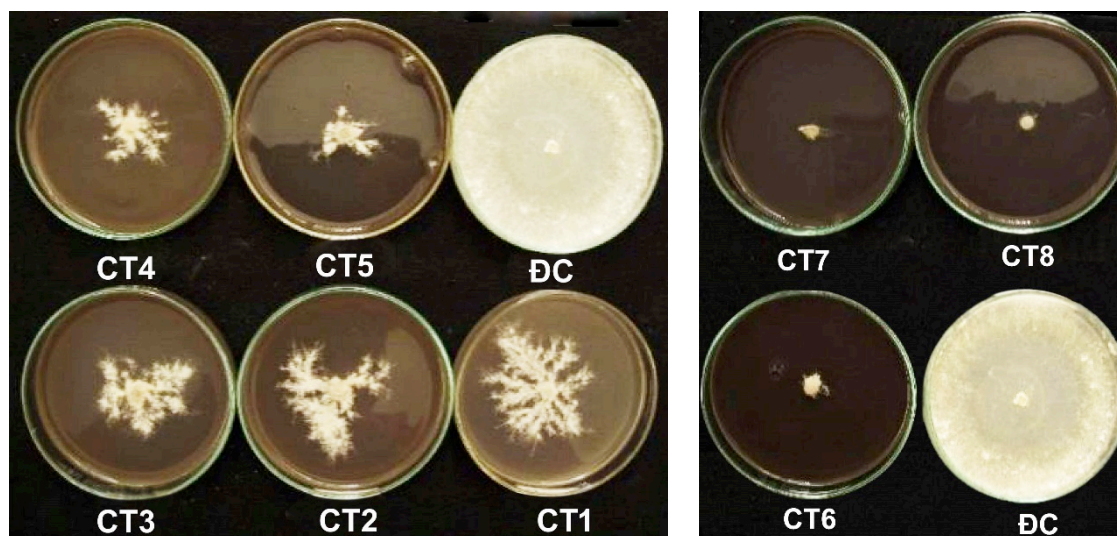
CT8 - Nồng độ bạc 400 ppm

CT4 - Nồng độ bạc 80 ppm

ĐC - Mẫu không có vật liệu Ag/CTS/Bentonite

CT5 - Nồng độ bạc 100 ppm

CV: Hệ số biến thiên



Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ bạc đến sinh trưởng, phát triển của nấm *R. solani*.

Kết quả khảo sát trong điều kiện phòng thí nghiệm cho thấy, sau hai ngày nuôi cấy đường kính tán nấm nhỏ nhất (0,63 cm) ở nồng độ nano bạc 400 ppm và hiệu quả ức chế cao nhất đạt 92,82%. Nồng độ bạc trong khoảng 200 – 300 ppm có hiệu quả ức chế nấm từ 85,52 – 89,40%, nồng độ bạc 60 – 80 ppm có hiệu quả ức chế trung bình 42,19 – 51,77%, nồng độ bạc 20 ppm có hiệu quả ức chế thấp nhất 28,16% so với đối chứng. Số lượng hạch nấm trung bình cao nhất ở công thức đối chứng (382,33 hạch nấm/đĩa). Ở nồng độ bạc 100 – 400 ppm có khả năng ức chế cao, không hình thành hạch nấm. Các công thức còn lại số lượng trung bình hạch nấm thấp, nồng độ bạc 80 ppm có trung bình 15,67 hạch nấm/đĩa, nồng độ bạc 60 ppm có 43,33 hạch nấm/đĩa, nồng độ bạc 40 ppm có 55,67 hạch nấm/đĩa và nồng độ bạc 20 ppm có 65,67 hạch nấm/đĩa.

Hiệu quả ức chế nấm *F. oxysporum* của vật liệu nano Ag/CTS/Bentonite

Khả năng ức chế nấm được đánh giá thông qua

khả năng sinh trưởng của nấm trên môi trường. Hiệu quả ức chế nấm *F. oxysporum* của Ag/CTS/Bentonite được đánh giá bằng thí nghiệm thể hiện ảnh hưởng của nồng độ bạc đến sinh trưởng và phát triển của nấm *F. oxysporum*. Thí nghiệm gồm 9 công thức, nhắc lại 3 lần, theo dõi đường kính tán nấm sau 3, 5, 7 ngày nuôi cấy, tính toán hiệu quả ức chế bằng công thức Abbott, kết quả được thể hiện trên bảng 2 và hình 5.

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 *F. oxysporum*. Bạc với nồng độ 20 – 100 ppm có khả năng ức chế nấm chưa cao, kích thước tán nấm sau 7 ngày nuôi cấy lớn, đạt 7,07 – 8,33 cm, nồng độ bạc 200 – 300 ppm đường kính tán nấm 5,37 và 5,03cm. Với nồng độ bạc 400 ppm có đường kính tán nấm nhỏ nhất 2,93 cm. Hiệu quả ức chế nấm ở nồng độ bạc 20 – 100 ppm chỉ đạt từ 5,34 – 19,66%. Bạc với nồng độ từ 200 – 300 ppm có hiệu quả ức chế trung bình 42,84%, nồng độ 400 ppm cho hiệu quả ức chế nấm cao nhất, đạt 66,70%.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ bạc đến sinh trưởng và phát triển của nấm *F. oxysporum*.

TT	Công thức	Đường kính tán nấm (cm)			Hiệu quả ức chế (%)
		3 ngày	5 ngày	7 ngày	
1	CT 1	4,17	5,60	8,33 ^b	5,34 ^h
2	CT 2	3,93	5,57	8,00 ^c	9,09 ^g
3	CT 3	3,73	5,40	7,57 ^d	13,98 ^e
4	CT 4	3,33	5,20	7,50 ^d	14,77 ^e
5	CT 5	3,23	4,83	7,07 ^e	19,66 ^d
6	CT 6	3,03	4,13	5,37 ^f	38,98 ^c
7	CT 7	2,67	3,90	5,03 ^g	42,84 ^b
8	CT 8	1,83	2,20	2,93 ^h	66,70 ^a
9	ĐC	4,27	5,83	8,80 ^a	-
	CV%	2,6	2,2	2,2	6,7

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

CT1 - Nồng độ bạc 20 ppm

CT6 - Nồng độ bạc 200 ppm

CT2 - Nồng độ bạc 40 ppm

CT7 - Nồng độ bạc 300 ppm

CT3 - Nồng độ bạc 60 ppm

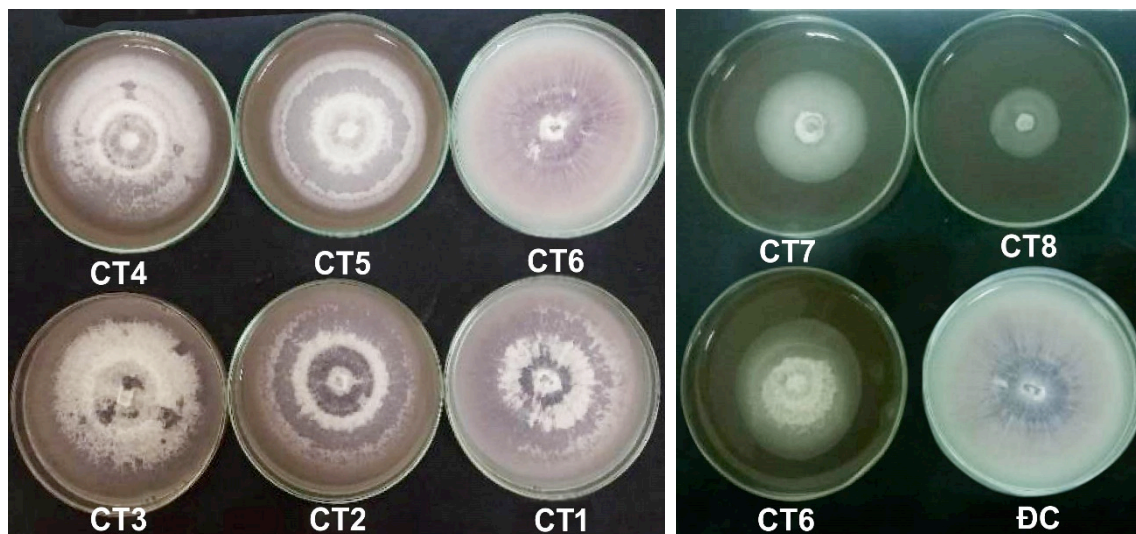
CT8 - Nồng độ bạc 400 ppm

CT4 - Nồng độ bạc 80 ppm

ĐC - Mẫu không có vật liệu Ag/CTS/Bentonite

CT5 - Nồng độ bạc 100 ppm

CV: Hệ số biến thiên



Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ bạc đến sinh trưởng, phát triển nấm *F. oxysporum*.

KẾT LUẬN

Tổng hợp vật liệu nano Ag/CTS/Bentonite bằng phương pháp khử sử dụng NaBH_4 làm chất khử trong môi trường CTS là biện pháp đơn giản và đạt hiệu quả cao. Các hạt nano bạc có dạng hình cầu và phân bố kích thước hạt trong khoảng rộng 5-90 nm. Vật liệu nano Ag/CTS/Bentonite được tổng hợp trong nghiên cứu này có hoạt tính kháng nấm gây bệnh trên thực vật là *F. oxysporum* và *R. solani*. Nano bạc với nồng độ 400 ppm có hiệu quả ức chế nấm *F. oxysporum* cao nhất đạt 66,70%, hiệu quả ức chế nấm *R. solani* cao nhất đạt 92,82% sau 2 ngày nuôi cấy. Nồng độ nano bạc trong khoảng 100 – 400 ppm có khả năng ức chế nấm *R. solani* đến mức không hình thành hạch nấm.

Vật liệu Ag/CTS/Bentonite 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.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được hoàn thành trong khuôn khổ đề tài: “Nghiên cứu chế tạo vật liệu nanocomposite chứa nano bạc nhằm loại trừ tác hại của một số loại nấm tồn lưu trong đất và gây bệnh cho cây trồng để thay thế cho thuốc bảo vệ thực vật gây ô nhiễm môi trường”, mã số: VAST07.01/14-15. Tập thể tác giả chân thành cảm ơn Viện Hàn lâm

Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tài trợ kinh phí thực hiện.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baysal F, Benitez MS, Kleinhenz M, Miller SA, McSpadden Gardener BB (2008) Field management effects on damping-off and early season vigor of crops in a transitional organic cropping system. *Phytopathology* 98: 562–570.
- Gopinath V, Velusamy P (2013) Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus* sp. GP-23 and evaluation of their antifungal activity towards *Fusarium oxysporum*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 106: 170–174.
- Jo YK, Kim BH, Jung G (2009) Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant disease* 93: 1037–1043.
- Kim KJ, Sung WS, Suh BK, Moon SK, Choi JS, Kim JG, Lee DG (2008) Antifungal Effect of Silver Nanoparticles on Dermatophytes. *J Microbiol Biotechnol* 18: 1482–1484.
- Kim KJ, Sung WS, Suh BK, Moon SK, Choi JS, Kim JG, Lee DG (2009a) Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *BioMetals* 22: 235–242.
- Kim SW, Kim KS, Lamsal K, Kim YJ, Kim SB, Jung M, Sim SJ, Kim HS, Chang SJ, Kim JK, Lee YS (2009b) An in vitro study of the antifungal effect of silver nanoparticles on oak wilt pathogen *Raffaeleasp.* *J Microbiol Biotechnol* 19: 760–764.

- Krishnaraj C, Ramachandran R, Mohan K, Kalaichelvan PT (2012) Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 93: 95–99.
- Lee KJ, Park SH, Govarthanan M, Hwang PH, Seo YS (2013) Synthesis of silver nanoparticles using cow milk and their antifungal activity against phytopathogens. *Materials Letters* 105: 128–131.
- Moteshafi H, Mousavi SM, Shojaosadati SA (2012) The possible mechanisms involved in nanoparticles biosynthesis. *J Ind Eng Chem* 18: 2046–2050.
- Navrotsky A (2010) Technology and applications Nanomaterials in the environment, agriculture, and technology (NEAT). *Journal of Nanoparticle Research* 2: 321–323.
- Nelson LW, Summerl BA (1989) Variability and stability of morphological characters in *Fusarium oxysporum*. *Mycologia* 81: 811–818.
- Ngo Quoc Buu, Nguyen Hoai Chau, Nguyen Gia Tien (2011) Studies on manufacturing of topical wound dressings based on nanosilver produced by aqueous molecular solution method. *Journal of Experimental Nanoscience* 6: 409–421.
- Oves M, Khan MS, Zaidi A, Ahmed AS, Ahmed F (2013) Antibacterial and cytotoxic efficacy of extracellular silver nanoparticles biofabricated from chromium reducing novel OS4 strain of *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLOS ONE* 8: e59140.
- Pal S, Tak YK, Song JM (2007) Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 1712–1720.
- Petersen J, Buddemeyer J (2004) Intergrated control of crown and root rot *Rhizoctonia solani* – Influence of cropping technique. *Proceedings of 67th IIRB Congress* 257–261.
- Prakasha P, Gnanaprakasama P, Emmanuel R, Arokiyaraj S, Saravananc M (2013) Green synthesis of silver nanoparticles from leaf extract of *Mimusops elengi*, Linn. for enhanced antibacterial activity against multi drug resistant clinical isolates. *Colloids Surf B Biointerfaces* 108: 255–259.
- Rogers JV, Parkinson CV, Choi YW, Speshock JL, Hussain SM (2008) A Preliminary Assessment of Silver Nanoparticle Inhibition of Monkeypox Virus Plaque Formation. *Nanoscale Research Letters* 3: 129–133.
- Santosa MF, Oliveira CM, Tachinski CT, Fernandes MP, Pich CT, Angioletto E, Riella HG, Fiori MA (2011) Bactericidal properties of bentonite treated with Ag⁺ and acid. *Int J Mineral Process* 100: 51–53.
- Shameli K, Ahmad MB, Zargar M, Yunus WM, Rustaiyan A, Ibrahim NA, Shabanzadeh P, Moghaddam MG (2011) Synthesis and characterization of silver/montmorillonite/chitosan bionanocomposites by chemical reduction method and their antibacterial activity. *Int J Nanomed* 6: 271–284.
- Shameli K, Ahmad MB, Zargar M, Yunus WM, Rustaiyan A, Ibrahim NA (2011) Synthesis of silver nanoparticles in montmorillonite and their antibacterial behavior. *Intl J Nanomed* 6: 581–590.
- Siddiqui MH, Al-Wahaibi MH, Mohammad F (2015) Nanotechnology and Plant Sciences. *Springer International Publishing*.
- Taylor PL, Ussher AL, Burrell RE (2005) Impact of heat on nanocrystalline silver dressings. Part I: Chemical and biological properties. *Biomaterials* 26: 7221–7229.

STUDY ON ANTIFUNGAL ACTIVITY OF SILVER/BENTONITE NANOMATERIALS ON SOYBEAN PHYTOPATHOGENIC FUNGI

Nguyen Hoai Chau¹, Nguyen Thi Thuy¹, Dao Trong Hien¹, Hoang Thi Mai¹, Nguyen Van Quang¹, Pham Hoang Long¹, Nguyen Thi Bich Ngoc², Tran Thi Phuong Theu¹

¹Institute of Environmental Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Road, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

²Plant Protection Research Institute, Dong Ngac, Tu Liem, Hanoi, Vietnam

SUMMARY

In the present study, silver nanoparticles were synthesized by chemical reduction method route into the lamellar space of bentonite (Ag/CTS/Bentonite). Silver nitrate (AgNO₃) was taken as a metal precursor, sodium borohydride (NaBH₄) as a reducing agent, reduction of Ag⁺ ions and the subsequent formation of Ag nanoparticles, chitosan as a natural polymeric stabilizer and was stucked silver nanoparticles to the surface of bentonite particles, respectively. Manipulating the size and shape of Ag/CTS/Bentonite nanomaterial was characterized using transmission electron microscopy (TEM), spherical silver nanoparticles, as depicted by

TEM, were found to have a wide particle size distribution from 5 nm to 90 nm. Meanwhile, the X-Ray fluorescence (XRF) spectrum indicated the presence of silver on bentonite particles. Antifungal activity of the synthesized Ag/CTS/Bentonite nanomaterial was investigated against crop pathogenic fungi (*Fusarium oxysporium* (*F. oxysporium*) and *Rhizoctonia solani* (*R. solani*)) isolated from infected soybean plant in Bac Ninh province by the Plant Protection Research Institute. The assessment of fungicidal activity of the Ag/CTS/Bentonite nanomaterial showed that this product exhibited strong antifungal activity towards soybean pathogenic fungi. At highest nanosilver concentration of the Ag/CTS/Bentonite nanocomposite (400 ppm) sclerotial germination of *F. oxysporum* was almost inhibited, after 7 days the inhibition effect on sclerotial germination attained 66.70%. For the case of *R. solani*, after 2 days at 400 ppm silver nanoparticles concentration the inhibition effect on sclerotial germination attained 92.82%. The obtained results suggested that the synthesized Ag/CTS/Bentonite nanomaterial acts as an effective antifungal agent. Thus, it could be used in developing novel antifungal agents for potential applications in agriculture.

Keywords: *antifungal activity, Fusarium oxysporum, Rhizoctonia solani, silver/bentonite nanomaterials, soybean*