

Nghiên cứu sản xuất và thử hoạt tính kháng nấm *Phytophthora* spp. gây thối quả và *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư của chế phẩm sinh học nhựa dầu nghệ kết hợp với nano bạc và chitosan

Cao Đức Danh^{1,2*}, Lê Thế Tâm^{3*}, Thái Văn Bình³, Trần Thị Ngân³, Lê Đăng Quang⁴, Hồ Đình Quang³, Nguyễn Cao Cường², Nguyễn Thị Hà², Lê Thị Thu Hiệp³, Trần Phương Chi³, Dương Thị Ngân²

¹Sở Khoa học và Công nghệ Hà Tĩnh, 142 Trần Phú, phường Trần Phú, TP Hà Tĩnh, tỉnh Hà Tĩnh, Việt Nam

²Trung tâm Ứng dụng Tiến bộ Khoa học và Công nghệ Hà Tĩnh, 81 Ngõ Quyền, xã Thạch Hạ, TP Hà Tĩnh, tỉnh Hà Tĩnh, Việt Nam

³Trường Đại học Vinh, 182 Lê Duẩn, phường Trường Thi, TP Vinh, tỉnh Nghệ An, Việt Nam

⁴Viện Kỹ thuật Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 13/10/2022; ngày chuyển phản biện 17/10/2022; ngày nhận phản biện 4/11/2022; ngày chấp nhận đăng 9/11/2022

Tóm tắt:

Trong bài báo này, các tác giả đã chế tạo các mẫu chế phẩm sinh học (BN) từ nhựa dầu nghệ kết hợp với nano bạc và chitosan, đồng thời khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sản xuất BN. Kết quả nghiên cứu quá trình sản xuất BN gồm thành phần, phụ gia, tỷ lệ phối trộn, các thông số công nghệ đã được tính toán và thử nghiệm để có được chế phẩm nano có độ bền và phân tán cao nhất. Xác định được bộ thông số tối ưu cho sản xuất ở quy mô pilot 5 l/mẻ là tỷ lệ hoạt chất/phụ gia là 3/1, nhiệt độ tối ưu cho quá trình phối trộn là 40-45°C, tốc độ khuấy 500 vòng/phút (rpm), thời gian 60 phút. Nghiên cứu đã chế tạo thành công 18 mẫu BN (BN1-BN18) có màu sắc từ vàng nhạt đến vàng đậm. Thử hoạt tính kháng nấm đối với *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư và bệnh thối quả do nấm *Phytophthora* spp. cho thấy, các BN1-BN18 đều có hoạt tính kháng nấm tốt và hoạt tính này đều tăng dần khi hàm lượng nhựa dầu nghệ tăng.

Từ khóa: chitosan, *Colletotrichum* spp., nano bạc, nhựa dầu nghệ, *Phytophthora* spp..

Chỉ số phân loại: 2.4

1. Đặt vấn đề

Thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) đóng vai trò quan trọng trong việc ngăn chặn, khống chế sự phát sinh, phát triển của các đối tượng gây hại, góp phần tăng năng suất và chất lượng nông sản. Tuy nhiên, lượng thuốc BVTV hóa học dư thừa trong quá trình sản xuất nông nghiệp là nguyên nhân gây ra nhiều tác hại nghiêm trọng cho môi trường đất, đặc biệt là môi trường nước do sự rửa trôi. Dư lượng của thuốc BVTV còn gây độc cho người và gia súc, ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe người tiêu dùng. Điều này không chỉ làm suy giảm tính đa dạng sinh học, gây tổn hại đến quần thể thiên địch mà còn làm phát sinh tính kháng thuốc của sinh vật hại, tăng chi phí phòng trừ, gây ảnh hưởng lớn đến con người và môi trường [1].

Ở nước ta cũng như trên thế giới, thuốc trừ bệnh thuộc nhóm nano đang được sử dụng rộng rãi trong sản xuất nông nghiệp, với phổ tác dụng rộng, có thể phòng trừ bệnh cho nhiều loại cây trồng khác nhau. Các nguyên tố kẽm, đồng, bạc là những nguyên tố có tính kháng nấm, kháng khuẩn và diệt virus cao [2]. Các hạt nano kim loại có kích thước vài

nm thì hiệu quả kháng khuẩn, kháng nấm, tiêu diệt virus tăng lên hàng nghìn lần so với nguyên tố ở dạng ion. Ngoài ra, độc tính của chúng có tính chọn lọc cao với vi khuẩn, vi nấm, virus. Đặc biệt, nano bạc thể hiện độc tính rất mạnh đối với vi khuẩn, virus, tảo và nấm nên được ứng dụng rộng rãi đặc trị bệnh cháy lá lúa, khô cổ gie lúa, lép hạt lúa; vàng lá, rụng lá, nấm hồng, loét sọc mặt cạo trên cây cao su; rỉ sắt, khô cành, khô quả, nấm rữa trên cà phê; chết nhanh, chết chậm trên cây tiêu; nấm trái, thối đầu cành, đốm nâu và nấm cành trên cây thanh long [2]. V.K. Sharma và cs (2009) [3] cho biết, tế bào vi khuẩn bị vô hiệu hóa được cho là do kết quả của quá trình tương tác tĩnh điện giữa bề mặt mang điện tích âm (-) của tế bào vi khuẩn và cation Ag^+ được hấp phụ trên bề mặt tế bào, các ion này sau đó xâm nhập vào bên trong tế bào vi khuẩn và vô hiệu hóa chúng. Nano bạc kết hợp với chitosan làm chất ổn định cho thấy hiệu quả kháng bệnh đốm nâu (*Alternaria passiflorae*) ở cây chanh dây, bệnh vàng lá (*Fusarium* spp., *Phytophthora* spp.) ở cây tiêu; kháng khuẩn khá tốt đối với cả vi khuẩn gram âm và gram dương [1]. Nano bạc có tác dụng phòng chống sự xâm nhiễm của nấm và vi khuẩn gây bệnh xâm nhập qua các tế bào lá và

*Tác giả liên hệ: Email: saola43@gmail.com, tamlt@vinhuni.edu.vn

Research on production and testing of antifungal activity *Phytophthora* spp. causing fruit rot and *Colletotrichum* spp. causing anthracnose of silver nanoparticles, chitosan and turmeric resin bioproducts

Duc Danh Cao^{1,2*}, The Tam Le^{3*}, Van Binh Thai³, Thi Ngan Tran³, Dang Quang Le⁴, Dinh Quang Ho³, Cao Cuong Nguyen², Thi Ha Nguyen², Thi Thu Hiep Le³, Phuong Chi Tran³, Thi Ngan Duong²

¹Ha Tinh Department of Science and Technology,

142 Tran Phu Street, Tran Phu Ward, Ha Tinh City, Ha Tinh Province, Vietnam

²Center for Advanced Application of Science and Technology Ha Tinh,

81 Ngo Quyen Street, Thach Ha Commune, Ha Tinh City, Ha Tinh Province, Vietnam

³Vinh University, 182 Le Duan Street, Truong Thi Ward,

Vinh City, Nghe An Province, Vietnam

⁴Institute of Tropical Technology, Vietnam Academy of Science and Technology,

18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

Received 13 October 2022; revised 4 November 2022; accepted 9 November 2022

Abstract:

In this paper, the research team made samples of bio-products (BN) of turmeric resin combined with silver nanoparticles and chitosan and investigated the factors affecting the production of BN preparations. Specifically, the results of research on the production of BN preparations including ingredients, additives, mixing ratios, and technological parameters have been calculated and tested to obtain nano-preparations with the highest durability and dispersion. The experimental results obtained the optimal set of parameters for production at a pilot scale of 5 litres/batch are the ratio of active ingredients/additives = 3/1, the optimal temperature for the mixing process is 40–45°C, the stirring speed is 500 rpm, and the time is 60 minutes. From here, we have successfully fabricated 18 samples of BN1-BN18 preparations with colours ranging from light yellow to dark yellow. Antifungal activity was tested against *Colletotrichum* spp. causing anthracnose disease and fruit rot disease caused by *Phytophthora* spp., the results showed that BN1-BN18 products exhibited good antifungal activity, and antifungal activity increased gradually when the content of turmeric oil resin increased.

Keywords: chitosan, *Colletotrichum* spp., *Phytophthora* spp., silver nanoparticles, turmeric oil resin.

Classification number: 2.4

Ễ. Phòng và trị rất tốt các nhóm bệnh do nấm, vi khuẩn gây ra như: bệnh lở cổ rễ, vàng lá thối rễ, các bệnh đốm lá, loét cam quýt, bưởi, thối nhũn. Hiệu quả kháng nấm bệnh cây trồng của nano bạc đã được thử nghiệm tại Hàn Quốc trên 18 loại nấm bệnh. Kết quả thử nghiệm cho thấy, AgNPs có hiệu quả mạnh với các chủng nấm mốc như *Alternaria alternata*, *A. brassicicola*, *A. solani*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Pythium aphanidermatum*, *P. spinosum* và hiệu quả tối ưu đạt được là 100 ppm khi thử nghiệm trên đĩa thạch PDA [4].

Các chế phẩm nano bạc-chitosan chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ có hiệu lực ức chế nấm *Phytophthora capsici* lên đến 100% tại nồng độ 40 ppm với kích thước hạt 5 nm [5]. Vật liệu nano Ag/CTS/bentonite ở nồng độ bạc 400 ppm có hiệu quả ức chế nấm *Rhizoctonia solani* đạt 92,82% và *F. oxysporum* đạt 66,70% [6]. Nano bạc dạng keo kích thước trung bình 52 nm ở nồng độ 180 ppm đã ức chế trên 90% sự phát triển của nấm *Phomopsis* ssp. trên hạt đậu tương [6, 7].

Chitosan là polysaccharide có đậm, không độc hại, có khối lượng phân tử lớn. Chitosan có màu trắng hay vàng nhạt, không mùi vị. Chitosan ngoài tác dụng kích thích hoạt động của hệ thống kháng bệnh trong cây, còn có tác dụng như một chất kích thích sinh trưởng của cây và trực tiếp tiêu diệt vi sinh vật gây bệnh do hủy hoại màng tế bào vi sinh vật. Với các tác dụng nêu trên, Chitosan phòng trừ được các bệnh cây do các nhóm vi sinh vật như nấm, vi khuẩn, tuyến trùng và cả virus. Có thể coi Chitosan như một loại vắc-xin thực vật. Khi đề cập đến Chitosan thì người ta chỉ nghĩ đến hoạt chất dùng trong bảo quản nông sản, nhưng trên thực tế Chitosan có rất nhiều ứng dụng trong nông nghiệp [8]. Chitosan đóng vai trò như là thành phần kích thích hoạt tính sinh học, làm tăng năng suất, sản lượng cây trồng. Kết quả cho thấy, năng suất cây lúa tăng lên, lượng phân bón cần bón giảm đi đáng kể [8].

Nhựa dầu nghệ là một hỗn hợp lỏng sánh có màu cánh gián đến vàng nhạt, có chứa phần nhỏ tinh dầu nghệ và hỗn hợp nhiều chất khác nhau. Hỗn hợp này có mùi thơm và hăng cay đặc trưng của nghệ. Nhựa dầu nghệ tan tốt trong ethanol, hàm lượng ethanol càng giảm thì khả năng hòa tan của tinh dầu càng giảm. Nhiều nghiên cứu về nghệ đã cho thấy, nghệ có hoạt tính kháng viêm, củ nghệ có tính khử trùng [9]. Nghệ ngày càng được quan tâm hơn, đặc

biệt là khi phát hiện ra đặc tính chống oxy hóa của các hợp chất phenol tự nhiên có trong nghệ. Tinh dầu nghệ chứa nhiều hợp chất sesquiterpen ketones và alcohols khác nhau như α -turmerone, ar-turmerone, 1,8-cineole, curlone, α -zingiberene, beren, borneol, sabinen, phelandren [10, 11]. Những năm gần đây, P.T. Hieu và cs (2021) [9] cũng đã triển khai thử nghiệm chế phẩm từ củ nghệ trừ bệnh nấm gây ra trên cây vừng và cà chua do nấm *Colletotrichum gloeosporioides* và *Phytophthora infestans* gây ra. Chế phẩm có chứa các hoạt chất là hỗn hợp các Turmerone (α -turmerone, β -turmerone và γ -turmerone) và curcuminoids từ bã thải của quá trình sản xuất curcumin, hiệu lực tác dụng trên 65% đối với bệnh trên cây vừng trên diện rộng, ngoài ra còn có tác dụng đối với rầy nâu tuổi 2-3 và sâu tơ. Bên cạnh đó curcumin, demethoxycurcumin và bisdemethoxycurcumin có khả năng kháng bệnh thán thư trong khoảng 0,4-100 $\mu\text{g/ml}$. Curcumin có hiệu quả kháng nấm *P.infestans*, *Puccinis recondite* và *R.solani* lần lượt là 100, 100 và 63% với nồng độ tập trung trong khoảng 500 $\mu\text{g/ml}$.

Trong khi đó, ở Việt Nam, trong xu thế hướng tới nền nông nghiệp hữu cơ, nông nghiệp bền vững, các chế phẩm BVTV sinh học nhựa dầu nghệ kết hợp với nano bạc và chitosan để phòng trừ một số bệnh trên cây trồng hầu như chưa có và chưa được đề cập tới. Trong nghiên cứu này, các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sản xuất các BN được thực hiện để tìm ra điều kiện tối ưu nhằm mục đích đạt hiệu quả sản xuất tối ưu nhất. Đồng thời tiến hành thử hoạt tính kháng nấm *Phytophthora* spp. gây thối quả trên cam và *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên cam, bưởi để đánh giá hoạt lực của các BN.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

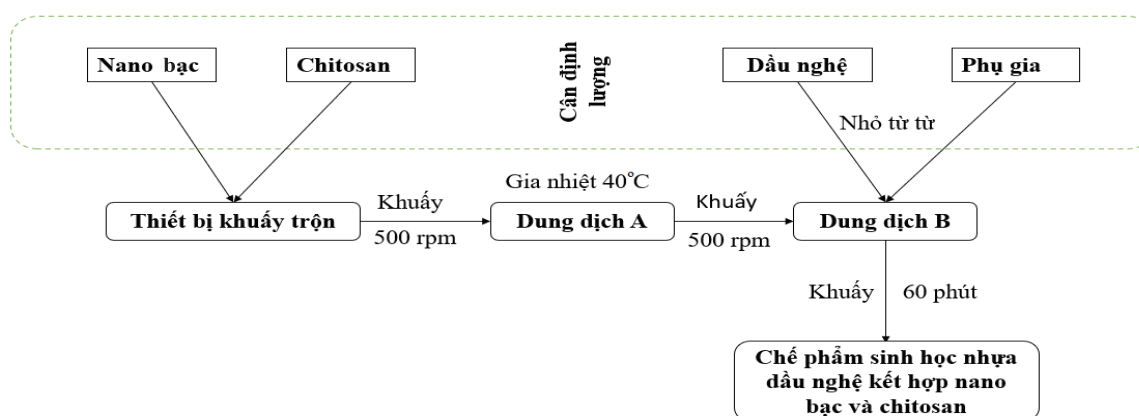
Nguyên liệu để gia công BN nhựa dầu nghệ kết hợp nano bạc và chitosan dạng huyền phù đậm đặc bao gồm hoạt chất chiếm 75% (nano bạc 45%, chitosan 5%, dầu nghệ 25%), chất phụ gia 25% (tween 60, acetone, propanol, ethanol, PEG 4000 công nghiệp, EG (etylen glycol), nước), đảm bảo tỷ lệ hoạt chất/phụ gia là 3/1. Trong đó, tween 60 chiếm khoảng 12,5% và acetone 9,5% tổng khối lượng chế phẩm, 3% là nước và một số phụ gia khác. Các mẫu được ký hiệu từ BN1 đến BN18, thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Công thức các BN1-BN18.

Thứ tự	Nano bạc (%)	Chitosan (%)	Nhựa dầu nghệ (%)	Thành phần phụ gia (%)	Công thức chế phẩm
1	69	5	1	25	BN1
2	68	5	2	25	BN2
3	67	5	3	25	BN3
4	66	5	4	25	BN4
5	65	5	5	25	BN5
6	64	5	6	25	BN6
7	63	5	7	25	BN7
8	62	5	8	25	BN8
9	61	5	9	25	BN9
10	60	5	10	25	BN10
11	59	5	11	25	BN11
12	58	5	12	25	BN12
13	57	5	13	25	BN13
14	56	5	14	25	BN14
15	55	5	15	25	BN15
16	54	5	16	25	BN16
17	53	5	17	25	BN17
18	52	5	18	25	BN18

2.2. Nghiên cứu sản xuất chế phẩm

Quy trình công nghệ sản xuất BN nhựa dầu nghệ kết hợp nano bạc và chitosan quy mô pilot (5 l/mê) được tiến hành như sau: dung dịch nano bạc, chitosan, nhựa dầu nghệ (đồng hóa trong dung dịch ethanol). Các thành phần phụ gia bao gồm tween 60, acetone, propanol, ethanol, PEG 4000 công nghiệp, EG, nước (thành phần như ở bảng 1). Hỗn hợp được phối trộn ở nhiệt độ 40-45°C, tốc độ khuấy 500 rpm, thời gian khuấy 60 phút trong thiết bị. Tất cả các thành phần sử dụng sản xuất chế phẩm được cân định lượng, đem vào các thiết bị khuấy trộn chuyên dụng để tạo dung dịch đồng nhất, tiếp theo là các quá trình gia nhiệt, điều chỉnh tốc độ khuấy, thời gian khuấy được thiết lập thích hợp theo các thông số đã tối ưu bằng quá trình thực nghiệm và bằng mô hình tương quan. Trong quy trình sản xuất, dung dịch nano bạc được thêm định lượng dung dịch chitosan, khuấy ở tốc độ 500 rpm trong 15 phút. Hỗn hợp thu được (dung dịch A)



Hình 1. Sơ đồ quy trình công nghệ chế tạo BN nhựa dầu nghệ kết hợp nano bạc và chitosan.

tiếp tục khuấy và gia nhiệt lên 40-45°C và thêm từ từ dung dịch nhựa dầu nghệ vào, rồi chất phụ gia (dung dịch B). Dung dịch B được khuấy liên tục trong 60 phút để thu được BN nhựa dầu nghệ kết hợp nano bạc và chitosan (hình 1).

2.3. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

Hoạt tính kháng nấm: Phương pháp kiểm tra khả năng ức chế mycelia được sử dụng trong nghiên cứu với các chủng nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư và *Phytophthora* spp. gây bệnh thối quả. Nấm *Colletotrichum* spp. và *Phytophthora* spp. sử dụng trong nghiên cứu này được phân lập từ quả cam, bưởi bị bệnh thán thư trồng ở huyện Hương Khê, tỉnh Hà Tĩnh. Hoạt tính kháng nấm được thử trên các đĩa thạch petri với môi trường PDA tại pH 6,8-7,0.

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 PDA đã trộn với mẫu thử. Mẫu thử BN hòa tan bằng tween 80 với nồng độ 0,05% và dimethyl sulfoxide (DMSO) 2% ở các nồng độ khác nhau (1000 và 500 ppm), sau đó trộn vào môi trường PDA nóng chảy ở 50°C đã khử trùng và để nguội. Mỗi nồng độ khác nhau được thử lặp lại 3 lần. Các đĩa được ủ ở 37°C trong

vòng 24-36 giờ. Theo dõi sự phát triển của nấm và xác định tính hiệu lực của từng loại dựa vào việc đo đường kính tán nấm sau các thời gian khác nhau tùy theo từng loại nấm. Hiệu quả ức chế được tính như sau [9]:

$$\text{Hiệu quả ức chế (\%)} = \frac{\text{ĐK}_{\text{đối chứng}} - \text{ĐK}_{\text{mẫu}}}{(\text{ĐK}_{\text{đối chứng}} - 4)} \times 100\%$$

trong đó $\text{ĐK}_{\text{đối chứng}}$ là đường kính của tán nấm trong đĩa đối chứng; $\text{ĐK}_{\text{mẫu}}$ là đường kính của tán nấm mẫu.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tạo chế phẩm sinh học

Áp dụng phương pháp phối trộn có gia nhiệt phù hợp, đã chế tạo thành công 18 mẫu BN (ký hiệu từ BN1 đến BN18) có màu sắc từ vàng nhạt đến đậm dần, khả năng tan trong nước giảm dần (hình 2).

3.2. Màu sắc, trạng thái chế phẩm

Các BN nhựa dầu nghệ kết hợp với nano bạc và chitosan thu được dạng huyền phù đậm đặc có màu vàng nhạt đến vàng đậm (chuyển sang màu đỏ của nhựa dầu nghệ) khi hàm lượng dầu nghệ tăng dần từ công thức BN1 đến BN18 (hình 2). Đặc biệt, các nhóm công thức từ BN1 đến BN6, màu



Hình 2. Các mẫu BN nhựa dầu nghệ kết hợp nano bạc và chitosan.

không thay đổi nhiều, trong khi nhóm BN7 đến BN12 màu thay đổi rõ rệt nhất và nhóm BN13 đến BN18 có màu đậm đặc, tương đương nhau.

3.3. Khả năng hòa tan và độ bền của BN

Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi tăng hàm lượng hoạt chất lên, giảm hàm lượng chất phụ gia và nước (tween 60, acetone và nước) sẽ làm giảm độ hoà tan của BN nhựa dầu nghệ kết hợp nano bạc và chitosan. Đặc biệt, chế phẩm có acetone giúp hòa tan hoạt chất tinh dầu nghệ, đóng vai trò rất quan trọng đối với hoạt chất dạng dầu nghệ. Tuy nhiên, acetone giá thành cao, dễ cháy nổ và khi hàm lượng trên 10% có khả năng gây tổn hại bao bì sử dụng, không thích hợp để đóng chai hoặc gói khi gia nhiệt. Do vậy, hàm lượng acetone thích hợp được lựa chọn nhỏ hơn 10% trong công thức chế phẩm là 6%, trong khi đó tween 60 chiếm 10%, còn lại là nước và các chất phụ gia khác là thích hợp. Trong các công thức, BN10 có độ bền và phân tán đều tốt nhất.

3.4. Tốc độ khuấy trong chế tạo BN nhựa dầu nghệ kết hợp nano bạc và chitosan

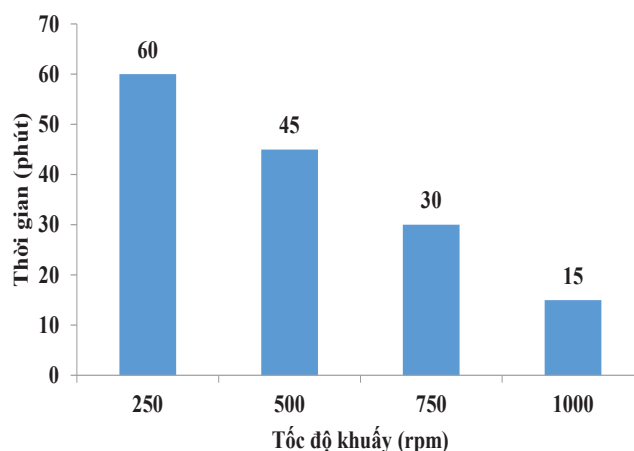
Để nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ khuấy lên thời gian hình thành, độ đồng nhất, độ tan và độ bền của BN nhựa dầu nghệ kết hợp nano bạc và chitosan, kết quả tổng hợp chế phẩm được thực hiện theo công thức BN10 với các tốc độ biến đổi 250, 500, 1000 và 2000 rpm, tương ứng với RP1, RP2, RP3 và RP4 (bảng 2).

Bảng 2. Tốc độ pha trộn chế phẩm dạng huyền phù đậm đặc.

Thí nghiệm	RP1	RP2	RP3	RP4
Nano bạc, chitosan, nhựa dầu nghệ	75%	75%	75%	75%
Chất phụ gia và nước	25%	25%	25%	25%
Tổng thành phần	100%	100%	100%	100%
Tốc độ khuấy (rpm)	250	500	750	1000
Giá trị thế zeta (mV)	25	37	30	27

Các BN nhựa dầu nghệ kết hợp nano bạc và chitosan đều được khuấy trong 60 phút, quan sát sự thay đổi độ trong, đồng thời thử độ tan trong nước theo tỷ lệ chế phẩm/nước tương ứng là 1/100 và 2/100 ml, độ bền của chế phẩm sau khi hòa tan 1 giờ. Kết quả cho thấy, khi khuấy với tốc độ tăng dần, thời gian hình thành chế phẩm đồng nhất và độ trong giảm dần khi tốc độ khuấy tăng. Cụ thể, khi khuấy với tốc độ 250 rpm, thời gian thu được chế phẩm là 60 phút, chế

phẩm còn vẩn đục, tan kém. Khi khuấy với tốc độ 500 rpm, thời gian đạt được độ trong của chế phẩm là 45 phút, chế phẩm đồng nhất, tan tốt, bền, không lắng sau khi hòa tan 1 giờ. Khi tốc độ khuấy tăng lên 750 rpm, thời gian hình thành chế phẩm nhanh, trong vòng 30 phút đã đạt được chế phẩm trong, đồng nhất nhưng khi hòa tan chế phẩm bị lắng, chứa cặn. Đặc biệt, khi tốc độ khuấy đạt 1000 rpm, chế phẩm đạt độ trong khi khuấy được 15 phút, nhưng khi đem hòa tan vào nước, tan kém và phân tách lớp ngay, lắng cặn (hình 3). Nguyên nhân dự đoán là khi khuấy với tốc độ cao, các hạt tinh dầu bị đánh tan và pha trộn vào các chất phụ gia, chất hoạt động bề mặt, nhưng độ hoàn thiện của chế phẩm chưa đạt, chế phẩm bị phân hủy nhanh, điều này sẽ làm giảm hiệu quả của chế phẩm khi sử dụng trong thực tế. Do vậy, chúng tôi lựa chọn tốc độ khuấy tối ưu cho quy trình sản xuất chế phẩm là 500 rpm để thu được BN nhựa dầu nghệ kết hợp nano bạc và chitosan đạt yêu cầu, có độ tan tốt.



Hình 3. Ảnh hưởng của tốc độ khuấy đến thời gian hình thành BN nhựa dầu nghệ kết hợp nano bạc và chitosan.

3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tạo BN nhựa dầu nghệ kết hợp nano bạc và chitosan

Khi nhiệt độ tăng, thông thường khả năng hòa tan của các chế phẩm tốt hơn, tuy nhiên do sử dụng các dung môi hữu cơ làm chất phụ gia, kèm theo các hoạt chất nhựa dầu nghệ, khi nhiệt độ quá cao, các hoạt chất sẽ bay hơi cùng với dung môi. Để biết được ảnh hưởng của nhiệt độ, chúng tôi tiến hành các thí nghiệm tổng hợp chế phẩm theo công thức BN10 ở các nhiệt độ 25, 30, 45 và 60°C, tương ứng với các mẫu NĐ1, NĐ2, NĐ3 và NĐ4 (bảng 3).

Bảng 3. Nhiệt độ pha trộn BN nhựa dầu nghệ kết hợp nano bạc và chitosan dạng huyền phù đậm đặc.

Thí nghiệm	NĐ1	NĐ2	NĐ3	NĐ4
Nano bạc, chitosan, nhựa dầu nghệ	75%	75%	75%	75%
Chất phụ gia và nước	25%	25%	25%	25%
Tổng thành phần	100%	100%	100%	100%
Tốc độ khuấy (rpm)	500	500	500	500
Thời gian khuấy (phút)	45	45	45	45
Nhiệt độ khuấy (°C)	25	30	45	60
Giá trị thế zeta (mV)	27	29	38	32

Kết quả cho thấy, khi nhiệt độ của BN nhựa dầu nghệ kết hợp nano bạc và chitosan ở 25°C (nhiệt độ phòng), tốc độ hòa tan của chế phẩm chậm, khi kết thúc thời gian khuấy 45 phút, chế phẩm vẫn còn vẩn đục. Khi tăng nhiệt độ của hệ phản ứng lên 30°C, chế phẩm bắt đầu đồng nhất khi mới khuấy trộn được 25 phút, tuy nhiên khi hòa tan vào nước chế phẩm còn cặn lắng. Ở nhiệt độ 45°C, khi khuấy trong 45 phút thu được chế phẩm đồng nhất, trong và tan tốt trong nước, không bị vẩn đục khi hòa tan vào nước sau 1 giờ. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nhiệt độ lên 60°C, hỗn hợp chế phẩm đã bắt đầu tan khi khuấy được 15 phút nhưng hỗn hợp có hiện tượng bốc hơi nhanh và hao hụt lượng lớn khi kết thúc 45 phút khuấy. Nguyên nhân được xác định là acetone đạt nhiệt độ sôi và bay hơi ở khoảng 56-57°C, vì vậy khi sản xuất chế phẩm cần khống chế nhiệt độ hỗn hợp dưới 57°C. Từ đó, chọn nhiệt độ của quá trình tạo chế phẩm ở 40-45°C là phù hợp cho quy trình sản xuất ở quy mô phòng thí nghiệm.

3.6. Ảnh hưởng của thời gian đến khả năng tạo BN nhựa dầu nghệ kết hợp nano bạc và chitosan

Để nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian khuấy lên quá trình tổng hợp chế phẩm, các yếu tố được cố định như tỷ lệ hoạt chất/chất phụ gia, tốc độ khuấy, thay đổi thời gian khuấy sản phẩm 15, 30, 45, 60 phút, tương ứng với các mẫu TG1, TG2, TG3 và TG4. Các thí nghiệm chế tạo BN nhựa dầu nghệ kết hợp nano bạc và chitosan được bố trí theo bảng 4. Kiểm tra độ đồng nhất của dung dịch, độ tan và độ bền của dung dịch sau khi hòa tan nhận thấy, khi dung dịch khuấy trong 15 phút, các chất hòa tan chưa hoàn toàn, vẫn còn vẩn đục, hòa tan kém. Khi đạt đến 30 phút, thu được dung dịch trong và đồng nhất, không phân lớp, nhưng khi

hòa tan lại có ít cặn. Khi tăng thời gian khuấy lên 45 phút, dung dịch BN nhựa dầu nghệ kết hợp nano bạc và chitosan đồng nhất hoàn toàn, bền và tan tốt trong nước. Khi tăng thời gian lên 60 phút, chế phẩm không có thay đổi nhiều và khi kéo dài thêm thời gian, không có sự khác biệt. Do đó, thời gian khuấy 45 phút được chọn làm thời gian tối ưu cho sản xuất, giúp giảm rất nhiều thời gian và chi phí cho việc chế tạo các sản phẩm quy mô lớn (bảng 4).

Bảng 4. Thời gian khuấy trộn BN nhựa dầu nghệ kết hợp nano bạc và chitosan.

Thí nghiệm	TG1	TG2	TG3	TG4
Nano bạc chitosan, nhựa dầu nghệ	75%	75%	75%	75%
Chất phụ gia và nước	25%	25%	25%	25%
Tổng thành phần	100%	100%	100%	100%
Tốc độ khuấy (rpm)	500	500	500	500
Nhiệt độ phản ứng (°C)	45	45	45	45
Thời gian khuấy (phút)	15	30	45	60
Giá trị thế zeta (mV)	20	29	38	33

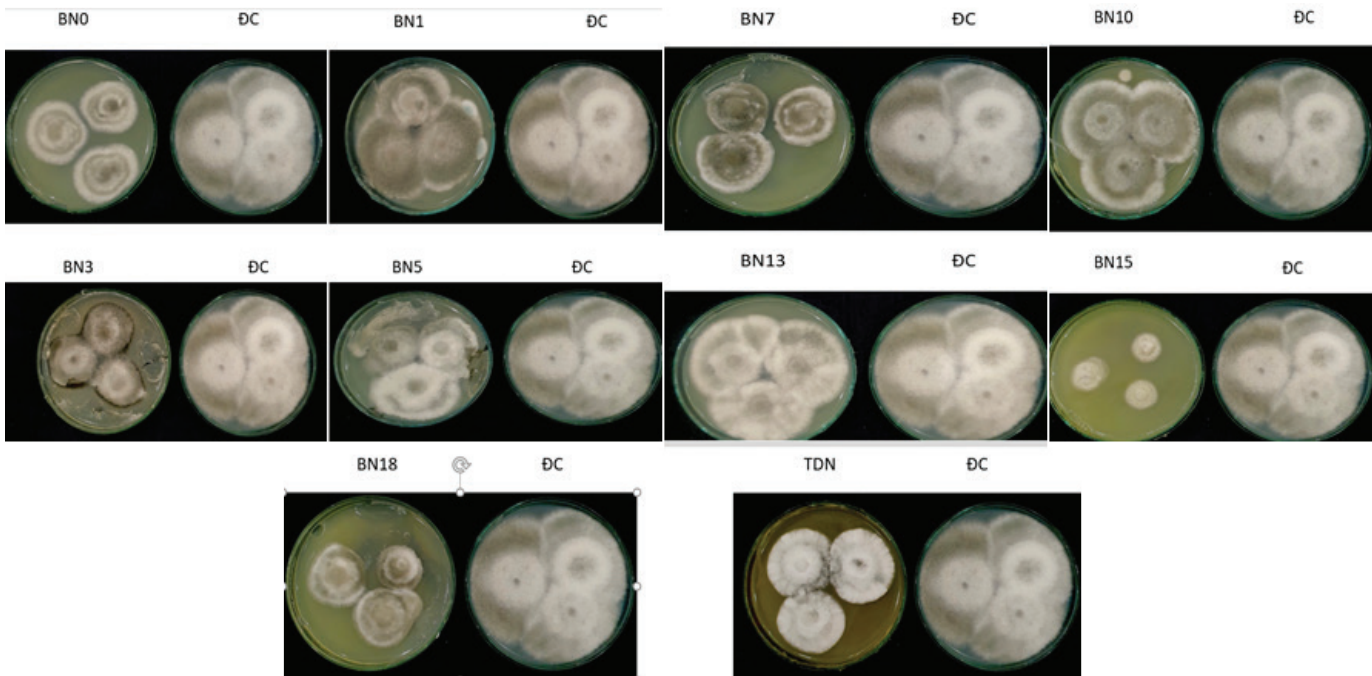
Độ bền của chế phẩm được kiểm tra lại bằng phép đo thế zeta. Thế zeta thể hiện mức độ đẩy giữa các hạt tích điện cùng dấu gần nhau trong hệ phân tán. Đối với các phân tử và các hạt đủ nhỏ, thế zeta cao (âm hoặc dương) sẽ cho độ ổn định cao, hệ phân tán sẽ chống lại sự keo tụ. Kết quả nghiên cứu cho thấy, độ bền thế zeta của mẫu NĐ3, NĐ4, TG3 và TG4 đều cho giá trị trên 30 mV, điều đó cho thấy chế phẩm có độ bền cao. Đặc biệt mẫu NĐ3, TG3 có giá trị thế zeta đạt 38 mV.

3.7. Hoạt tính kháng nấm *Colletotrichum spp.* gây bệnh thán thư và bệnh thối quả do nấm *Phytophthora spp.*

Tiến hành thử hoạt tính kháng nấm đối với chủng nấm *Colletotrichum spp.* gây bệnh thán thư và bệnh thối quả do nấm *Phytophthora spp.* cho kết quả các BN1-BN18 đều có hoạt tính kháng nấm tốt; hoạt tính kháng nấm đều tăng dần khi hàm lượng nhựa dầu nghệ tăng cho thấy, các hoạt chất chứa trong dầu nghệ có khả năng ức chế cao; đối với nano bạc và chitosan khả năng kháng khuẩn tốt hơn kháng nấm. Các BN4-BN18 có khả năng kháng *Phytophthora spp.* cao hơn nấm *Colletotrichum spp.* trong cùng điều kiện, điều này có lẽ là cấu tạo của các chủng nấm khác nhau (bảng 5 và hình 4).

Bảng 5. Kết quả thử hoạt tính đối với chủng nấm *Phytophthora* spp. và *Colletotrichum* spp..

Thứ tự	Tên mẫu	Nồng độ (mg/l)	<i>Phytophthora</i> spp.	<i>Colletotrichum</i> spp.	
			Hiệu lực ức chế sau 3 ngày thử (%)	Hiệu lực ức chế sau 3 ngày thử (%)	Hiệu lực ức chế sau 5 ngày thử (%)
1	BN1	10	13,78±0,34	15,55±0,54	18,31±0,53
2	BN2	10	21,57±0,58	24,41±0,85	29,11±0,84
3	BN3	10	22,40±0,61	30,51±1,06	33,59±0,97
4	BN4	10	36,54±1,09	29,46±1,03	34,78±1,00
5	BN5	10	47,32±1,41	31,44±1,1	36,95±1,07
6	BN6	10	52,63±1,57	30,61±1,07	36,79±1,06
7	BN7	10	52,06±1,56	31,60±1,10	44,57±1,29
8	BN8	10	54,89±1,64	36,18±1,26	45,71±1,32
9	BN9	10	55,06±1,65	39,89±1,39	47,82±1,38
10	BN10	10	56,04±1,68	40,52±1,41	49,81±1,44
11	BN11	10	58,62±1,75	42,36±1,48	51,37±1,48
12	BN12	10	58,71±1,45	42,98±1,50	52,60±1,52
13	BN13	10	60,72±1,32	43,87±1,53	53,27±1,54
14	BN14	10	60,62±1,81	44,26±1,54	56,45±1,63
15	BN15	10	61,35±1,84	46,72±1,63	60,81±1,76
16	BN16	10	62,34±1,79	39,16±1,37	46,65±1,35
17	BN17	10	62,52±1,81	38,24±1,33	44,86±1,31
18	BN18	10	65,98±1,87	37,52±1,31	43,68±1,26
19	Dầu nghệ (TDN)	10	90,11±2,3	45,74±1,61	43,95±1,27



Hình 4. Khả năng ức chế của một số mẫu chế phẩm trong 3 ngày thử nghiệm.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã chế tạo được 18 mẫu BN nhựa dầu nghệ kết hợp nano bạc và chitosan, ký hiệu từ BN1 đến BN18. Kết quả cho thấy, một số yếu tố công nghệ ảnh hưởng đến quá trình sản xuất BN nhựa dầu nghệ kết hợp nano bạc và chitosan; xác định được tỷ lệ hoạt chất/phụ gia là 3/1; điều kiện sản xuất chế phẩm phù hợp là tốc độ khuấy 500 rpm, thời gian 45 phút, nhiệt độ 45°C. Kết quả kháng nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên cam, bưởi và bệnh thối quả trên cam do nấm *Phytophthora* spp. của các mẫu tốt. Kết quả thử nghiệm là cơ sở để lựa chọn các mẫu chế phẩm có các đặc tính dễ tan trong nước, độ bền cao, hoạt tính tốt để tiến hành các nghiên cứu trên diện hẹp, diện rộng và mô hình thử nghiệm trước khi sản xuất lượng lớn dùng làm chế phẩm BVTV cho cây trồng.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài nghiên cứu khoa học cấp tỉnh Hà Tĩnh năm 2021-2023. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] L.T. Tam, N.H. Du, H.D. Quang, et al. (2022), “Synthesis of copper (II) citrate and evaluation of its *in vitro* antifungal and antibacterial activities, and the suitability of using this chemical as a plant protection agent”, *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **64(11)**, pp.38-43, DOI: 10.31276/VJST.64(11).38-43 (in Vietnamese).
- [2] N.D. Hang, N.T. Man, N.M. Hiep, et al. (2018), “Application of nanotechnology in agriculture”, *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **60(7)**, pp.43-45 (in Vietnamese).
- [3] V.K. Sharma, R.A. Yngard, Y. Lin (2009), “Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities”, *Advances in Colloid and Interface Science*, **145(1-2)**, pp.83-96, DOI: 10.1016/j.cis.2008.09.002.
- [4] J.E. Mendes, L. Abrunhosa, J.A. Teixeira, et al. (2014), “Antifungal activity of silver colloidal nanoparticles against phytopathogenic fungus (*Phomopsis* sp.) in soybean seeds”, *International Journal of Biological, Veterinary, Agriculture and Food Engineering*, **8(9)**, pp.928-933.
- [5] L.Q. Luan, N.H.P. Uyen, P.H. Giang (2014), “Study on the antifungal effect of silver nano particle-chitosan prepared by irradiation method on *Phytophthora capsici* causing the blight disease on pepper plant”, *Journal of Biology*, **36(1se)**, pp.152-157 (in Vietnamese).
- [6] N.H. Chau, D.T. Hien, H.T. Mai, et al. (2017), “Research on the ability of Ag/bentonite nanomaterials to inhibit pathogenic fungi on soybean plants”, *Journal of Biotechnology*, **15(2)**, pp.349-357 (in Vietnamese).
- [7] D.Q. Hoang, M.X. Nguyen, N.N. Ngan, et al. (2021), “The effect of the nanosilica/oligochitosan hybrid material on the growth of lettuce (*Lactuca sativa* L. var. longifolia)”, *Science and Technology Development Journal - Natural Sciences*, **5(3)**, pp.1531-1538, DOI: 10.32508/stdjns.v5i3.1047.
- [8] Ho Chi Minh City Department of Science and Technology (2017), *Trends in Herb Production and Application in Organic Agriculture. Wood Vinegar - A New Product of Vietnam*, Technology Trend Analysis Report, 25pp (in Vietnamese).
- [9] P.T. Hieu, L.D. Quang, T.D. Lam, et al. (2021), “Chemical composition and *in vitro* antifungal activity of turmeric oil from *Curcuma longa* L. rhizome against *Colletotrichum* spp.”, *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **63(6)**, pp.6-10, DOI: 10.31276/VJST.63(6).06-10 (in Vietnamese).
- [10] H.H. Cong, H.N. Nguyen, T.H. Tran, et al. (2020), “Antifungal activity of silver nanoparticles against phytopathogenic fungi *in vitro*”, *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **62(9)**, pp.42-47 (in Vietnamese).
- [11] L.T. Danh, T.T.N. Nu, D.M. Vien, et al. (2019), “Study of the complex of curcumin and hydroxypropyl-β-cyclodextrin with high bioavailability”, *CTU Journal of Science*, **55(3B)**, pp.1-7, DOI: 10.22144/ctu.jvn.2019.070 (in Vietnamese).