

Hiệu quả hiệp đồng kháng nấm gây hại vật liệu gỗ của hoạt chất preventol, α -bromo-cinnamaldehyde và đồng sunfat

Nguyễn Vũ Hùng¹, Trần Khánh Linh^{2,3}, Nguyễn Thị Thanh Lợi^{3,4}, Lê Trọng Tài⁵, Ngô Cao Cường^{2*}

¹Công ty TNHH MTV Cơ điện và Vật liệu n^o 31, phường Bãi Bông, TP Phố Yên, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam

²Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga, Bộ Quốc phòng, 63 Nguyễn Văn Huyền, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

³Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

⁴Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

⁵Cục Phát triển Công nghệ và Đổi mới Sáng tạo, Bộ Khoa học và Công nghệ, 113 Trần Duy Hưng, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 8/12/2023; ngày chuyển phản biện 12/12/2023; ngày nhận phản biện 29/12/2023; ngày chấp nhận đăng 4/1/2024

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm đánh giá khả năng kháng các chủng nấm gây hại gỗ mạnh (*in vitro*) của 3 đơn hoạt chất preventol, α -bromo-cinnamaldehyde (α -BCA) và đồng sunfat, đồng thời đánh giá hiệu quả hiệp đồng của công thức chế phẩm AM-QS chứa hỗn hợp 3 đơn chất này. Ở dạng đơn chất, preventol (1 mg/l) ức chế 90% đường kính nấm và ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của các chủng nấm ở nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là 5 mg/l. Đối với α -BCA, đường kính khuẩn lạc nấm giảm 93,5% ở nồng độ 10 mg/l và giá trị MIC được xác định là 20 mg/l. Với đồng sunfat, đường kính khuẩn lạc nấm giảm 94,9% ở 10 mg/l và MIC là 20 mg/l. Ở dạng kết hợp, chế phẩm AM-QS ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của các chủng nấm ở nồng độ 2%, tương đương 0,1 mg/l (preventol), 0,4 mg/l (α -BCA) và 0,4 mg/l (đồng sunfat). Như vậy, hiệu quả hiệp đồng kháng nấm của chế phẩm AM-QS với nồng độ mỗi chất sử dụng giảm 50 lần so với khi thử nghiệm với từng đơn chất. Việc ứng dụng kết hợp các đơn chất kháng nấm có thể giúp tăng cường hiệu quả bảo vệ vật dụng bằng gỗ hay những vật liệu có nguồn gốc từ gỗ.

Từ khóa: α -bromo-cinnamaldehyde, đồng sunfat, hiệu quả hiệp đồng, kháng nấm, preventol.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Trong thực tế, nấm mốc dễ xâm nhiễm trên gỗ hay các vật liệu có nguồn gốc cellulose (giấy, sách báo...) [1] gây mục nát, hư hỏng, giảm tuổi thọ và mất giá trị thẩm mỹ của công trình và các hiện vật trưng bày. Nhiều nấm mốc được tìm thấy thuộc các chi như *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Penicillium* và *Trichoderma* [2]. Một số enzyme sinh ra trong quá trình trao đổi chất như amylase, cellulase, protease, laccase giúp nấm mốc sinh trưởng trên vật liệu gỗ, trong đó cellulase là một trong những enzyme chính phân hủy cellulose tạo nguồn carbon cho nấm [3].

Các giải pháp nhằm bảo quản các vật dụng bằng gỗ dựa trên phương pháp vật lý và hóa học đã được ứng dụng. Tuy nhiên, các hoạt chất hóa học và các chế phẩm của chúng được sử dụng phổ biến hơn vì vừa có hiệu quả cao, vừa dễ thực hiện. Các nhóm hóa chất được sử dụng như: phenol, aldehyde, isothiazolinones và alcohol. Preventol là một hợp chất hữu cơ, dạng rắn, màu trắng là dẫn xuất của phenol có chức năng diệt nấm và bào tử của nấm thuộc chi *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Curvularia*... Cơ chế hoạt động kháng nấm của preventol bằng cách thâm nhập qua màng tế bào chất của nấm nhờ liên kết với thành phần ergosterol của màng tế bào, tạo thành lỗ nhỏ trên màng nhằm dẫn các chất trong nội bào ra ngoài, tích tụ nội bào ở nồng độ cao của hóa chất sử dụng và gây phá hủy màng

[4]. Hoạt chất α -BCA là một trong những dẫn xuất halogen của cinnamaldehyde, thành phần chính trong tinh dầu quế có hoạt tính kháng nấm mốc phổ rộng, ít gây độc cho người sử dụng. Chất α -BCA được báo cáo không chỉ ức chế các loại nấm mốc như *Candida albicans*, *Aspergillus niger* và *Penicillium chrysogenum*, mà còn ức chế được nhiều loại vi khuẩn như *Bacillus subtilis*, *Sarcia lutea*, *Staphylococcus aureus* [5, 6]. Cơ chế hoạt động kháng nấm của α -BCA nhờ vào khả năng thâm nhập qua màng tế bào và bề mặt bào tử, phản ứng với cả amino acid của phân tử protein và nhóm purine và pyrimidine của phân tử ADN, ARN [7, 8]. Hợp chất đồng sunfat hút ẩm, được sử dụng như thuốc kháng nấm hoặc diệt các loại sâu bệnh, diệt cỏ. Hoạt động ức chế sự hình thành nấm mốc của đồng sunfat thông qua tác động ức chế quá trình hô hấp của tế bào hay quá trình đường phân [9]. Mặc dù đồng sunfat ít được sử dụng dạng đơn chất để bảo quản gỗ do dễ bị rửa trôi, có thể làm mất màu gỗ, song rất có hiệu quả trong các ứng dụng khi được kết hợp với các hợp chất đối kháng khác có tính cố định (ít bị rửa trôi) [10].

Hiện nay, thuốc hoặc các phân tử thể hiện tính hiệp đồng khi kết hợp với nhau, nghĩa là làm tăng cường một hoặc nhiều tác dụng của những loại thuốc đó hay tạo ra một hiệu ứng mới mà chỉ riêng nó không tạo ra được [5]. Chiến lược phát triển thuốc kết hợp được ứng dụng rộng rãi để điều trị bệnh với mục tiêu đạt được hiệu quả điều trị hiệp đồng,

*Tác giả liên hệ: Email: cuongnc@vrtc.org.vn, ngocaocuong2011@gmail.com

Synergistic antifungal effect of preventol, α -bromo-cinnamaldehyde, and copper sulfate compounds against wood harmful fungi

Vu Hung Nguyen¹, Khanh Linh Tran^{2,3},
Thi Thanh Loi Nguyen^{3,4}, Trong Tai Le⁵, Cao Cuong Ngo^{2*}

¹31 Electro Mechanism and Explosive One Member Company Limited,
Bai Bong Ward, Pho Yen City, Thai Nguyen Province, Vietnam

²Joint Vietnamese - Russia Tropical Science and Technology Research Center,
63 Nguyen Van Huyen Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

³Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology,
18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

⁴Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology,
18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

⁵State Agency for Technology and Innovation, Vietnam Ministry of Science and Technology,
113 Tran Duy Hung Street, Trung Hoa Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

Received 8 December 2023; revised 29 December 2023; accepted 4 January 2024

Abstract:

The objective of the study is to evaluate the antifungal ability against wood harmful fungi (*in vitro*), of three active compounds: preventol, α -bromo-cinnamaldehyde (α -BCA), copper sulfate, and to evaluate the synergistic effect of a formulation AM-QS containing a mixture of these 3 compounds. As a single substance, preventol (1 mg/l) inhibited 90% of the fungal diameter and reached complete inhibition of the growth of fungal strains at the minimum inhibitory concentration (MIC) of 5 mg/l. For α -BCA, the fungal colony diameter decreased by 93.5% at a concentration of 10 mg/l, and the MIC value was determined to be 20 mg/l. With copper sulfate, colony diameter was reduced by 94.9% at 10 mg/l and the MIC was 20 mg/l. In combination form, the AM-QS completely inhibited the growth of fungal strains at concentrations of 2% equivalent to 0.1 mg/l (preventol), 0.4 mg/l (α -BCA), and 0.4 mg/l (copper sulfate). Thus, the synergistic antifungal effect of AM-QS preparation with the concentration of each substance used is reduced by 50 times compared to when tested with every single substance. Applying a combination of single antifungal substances could help to increase the effectiveness of protecting wooden objects or materials derived from wood.

Keywords: α -bromo-cinnamaldehyde, antifungal, copper sulfate, preventol, synergistic effect.

Classification number: 4.6

giảm liều lượng và độc tính, giảm thiểu hoặc trì hoãn việc gây kháng thuốc [11]. Hiệu quả kháng nấm của hỗn hợp chất kháng nấm đã chỉ ra: tác dụng chống nấm mốc của các hóa chất được tăng cường và có hiệu quả cao hơn khi sử dụng riêng lẻ bởi không có hóa chất nào có thể phòng chống được tất cả các loại nấm mốc, giảm được nồng độ của các chất sử dụng so với đơn chất riêng lẻ. Điều này sẽ hạn chế dư lượng của hóa chất tồn tại trong môi trường đồng thời nâng cao hiệu quả sử dụng trong phòng chống nhiều loại nấm khác nhau [12].

Đối với gốc aldehyde, nghiên cứu về sự kết hợp giữa cinnamaldehyde và các chất kháng vi sinh vật khác đã chỉ ra khả năng chống lại cả các chủng nấm kháng và không kháng thuốc, chẳng hạn như sự kết hợp giữa cinnamaldehyde và fluconazole hoặc AmB (Amphotericin B) [13]. Các công thức hỗn hợp chất có thể chứa các thành phần chất có nguồn gốc tự nhiên và các hợp chất tổng hợp. L. Cai và cs (2020) [14] đã chỉ ra công thức hỗn hợp của chitosan và cinnamaldehyde ở các tỷ lệ mol khác nhau đã ức chế sự sinh trưởng nấm *A. niger* khác nhau từ 16,7% (ở tỷ lệ 0,5:1) đến 95,8% (ở tỷ lệ 3:1).

Việc đánh giá hiệu quả hiệp đồng kháng các loài nấm mốc gây hại chính của các chất kháng nấm khác nhau sẽ là cơ sở khoa học cho việc tạo ra những công thức hỗn hợp chất phòng trừ nấm hiệu quả và hạn chế những ảnh hưởng do dư thừa hóa chất được sử dụng. Trong nghiên cứu này, thử nghiệm khả năng ức chế các chủng nấm sợi gây hại gỗ với từng đơn hoạt chất preventol, α -BCA và đồng sunfat và đánh giá hiệu quả hiệp đồng kháng nấm của chế phẩm AM-QS được kết hợp từ 3 hoạt chất trên với tỷ lệ thành phần được dựa vào giá trị ức chế tối thiểu của mỗi đơn chất ban đầu.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên, vật liệu

Preventol, α -BCA và đồng sunfat dạng tinh thể (Sigma-Aldrich, Thermo scientific độ tinh khiết trên 98%). Chế phẩm AM-QS được tạo thành dưới dạng dung dịch chứa thành phần 3 đơn chất (preventol, α -BCA và đồng sunfat), sao cho mỗi đơn chất đạt ngưỡng ức chế tối thiểu. Các chủng nấm chiếm ưu thế về số lượng phân lập trong các mẫu thu thập từ 3 miền Bắc - Trung - Nam (thuộc K602 - Thái Nguyên, K856 - Quảng Trị và K752 - Đồng Nai) được định danh và đăng ký mã số trên GenBank sử dụng trong các nghiên cứu. Môi trường Czapek-Dox dùng cho nuôi cấy và thử nghiệm ức chế nấm [15].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đặc điểm sinh học của các chủng nấm

Cây tùng chủng nấm đã thuần khiết trên đĩa thạch chứa môi trường Czapek-Dox, cắm lamên nghiêng, đặt đĩa thạch trong tủ nuôi ở nhiệt độ 28-30°C. Sau 72-120 giờ, lamên được lấy ra nhuộm màu và quan sát hình thái cuống sinh bào tử và bào tử dưới kính hiển vi quang học [16].

2.2.2. Xác định hoạt tính enzyme ngoại bào của các chủng nấm

Hoạt tính enzyme ngoại bào amylase, cellulase và laccase của các chủng nấm được xác định bằng phương pháp nuôi cấy nấm trên đĩa thạch Czapek-Dox chứa cơ chất tương ứng. Đặt miếng thạch nấm có đường kính 6 mm lên đĩa thạch Czapek-Dox được bổ sung cơ chất tương ứng 0,5% tinh bột, 1% CMC (Carboxymethyl cellulose), 0,05% Guaiacol. Đặt các đĩa nuôi cấy nấm vào tủ ấm 30°C trong 24 giờ. Các chủng nấm thể hiện hoạt tính enzyme sẽ xuất hiện vòng sáng xung quanh khuẩn lạc sau khi hiện màu bằng dung dịch Lugol 1% [17]. Đo đường kính vòng phân giải (mm) trên đĩa thạch.

2.2.3. Đánh giá khả năng kháng nấm của các hợp chất thử nghiệm

Chuẩn bị dung dịch gốc ban đầu preventol, α-BCA và đồng sunfat ở nồng độ 500 mg/l. Bổ sung từng dung dịch chất thử nghiệm vào môi trường Czapek-Dox sao cho nồng độ chất preventol trong thạch đạt 0,5, 1, 5, 10 và 25 mg/l; chất α-BCA trong thạch 1, 5, 10, 20 và 50 mg/l; đồng sunfat trong thạch 2, 4, 6, 8, 10 và 20 mg/l. Đặt miếng thạch nấm thử nghiệm đường kính 6 mm ở tâm đĩa môi trường đã bổ sung chất kháng nấm. Nuôi cấy ở điều kiện 28±2°C trong 5 ngày. Kết quả kháng nấm được đánh giá bằng cách đo đường kính (mm) khuẩn lạc nấm sợi phát triển trên đĩa thạch. Mẫu đối chứng được tiến hành tương tự, môi trường không bổ sung chất kháng nấm. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần [18, 19].

2.2.4. Đánh giá khả năng kháng nấm của hỗn hợp chất thử nghiệm AM-QS

Chế phẩm AM-QS chứa 3 đơn chất preventol, α-BCA và đồng sunfat ở nồng độ ức chế hoàn toàn sự phát triển của nấm sợi (từ kết quả thử nghiệm đơn chất). Tiến hành thử nghiệm AM-QS tương tự như với đơn chất, bổ sung AM-QS vào môi trường thạch với tỷ lệ 0,1, 0,5, 1, 2 và 5%. Đặt miếng thạch nấm thử nghiệm đường kính 6 mm ở tâm đĩa môi trường đã bổ sung chế phẩm kháng nấm. Nuôi cấy ở điều kiện 28±2°C trong 5 ngày. Kết quả kháng nấm được đánh giá bằng cách đo đường kính (mm) khuẩn lạc nấm sợi phát triển trên đĩa thạch. Mẫu đối chứng được tiến hành tương tự trong môi trường không bổ sung chất kháng nấm. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần [18, 19].

2.3. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần. Kết quả được tính toán bằng phần mềm Excel 2010 và trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± sai số chuẩn.

3. Kết quả và bàn luận

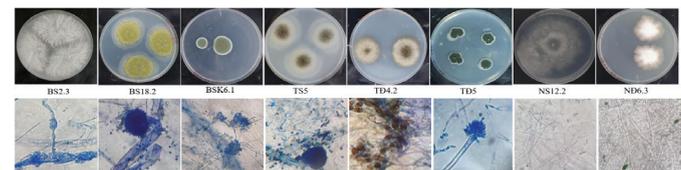
3.1. Đặc điểm các chủng nấm dùng trong thử nghiệm

Từ bộ sưu tập chủng nấm được phân lập trên bề mặt vật liệu gỗ từ 3 kho K603, K752 và kho K890 đã chọn được 8 chủng nấm gây hại điển hình có khả năng sinh các enzyme ngoại bào (amylase, cellulase và laccase) hoạt tính mạnh

nhất, có các đặc điểm sinh học được mô tả trong bảng 1 và hình 1. Các chủng nấm được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử, thuộc các chi *Aspergillus* (4 chủng: *A. flavus* BS18.2, *A. gracilis* BSK6.1, *A. niger* TS5, *A. sydowii* TD5), chi *Paraeuteypella* (1 chủng *P. citricola* BS2.3), chi *Curvularia* (1 chủng *C. eragrostidis* TD4.2), *Pestalotiopsis* (1 chủng *P. vismiae* NS12.2) và chi *Camarosporium* (1 chủng *C. brabeji* ND6.3).

Bảng 1. Đặc điểm sinh học của 8 chủng nấm được sử dụng trong nghiên cứu.

Chủng nấm và các đặc điểm sinh học	Hoạt tính enzyme (mm)		
	Amylase	Cellulase	Laccase
<i>Paraeuteypella citricola</i> BS2.3 (OR135779): Khuẩn lạc toả tròn, màu trắng, bề mặt bông xơ, tơ xốp. Không có giọt tiết, không sinh sắc tố. Bào tử trần, đa bào có vách ngăn, hình trứng/hình thoi.	16±1,34	22±1,67	26±1,72
<i>Aspergillus flavus</i> BS18.2 (OR135780): Khuẩn lạc toả tròn, màu vàng rêu, viền trắng và thưa, bề mặt dạng bột, xốp nhẹ. Không có giọt tiết, không sinh sắc tố. Cuống sinh bào tử trần, không màu, không phân nhánh, đỉnh phình to thành bông dạng cầu hoặc elip, bề mặt toả đều các thể bình 1, 2 tầng. Bào tử hình cầu hoặc trứng, dạng trần.	10±0,95	18±0,78	16±0,59
<i>Aspergillus gracilis</i> BSK6.1 (OR135781): Khuẩn lạc toả tròn, vùng xanh lục xám, bột mịn. Không có giọt tiết, không tạo sắc tố. Cuống sinh bào tử trần, phân nhánh, đỉnh có bông nhỏ, đỉnh chùm thể bình dạng ngắn đều hướng lên song song dạng chổi. Bào tử tròn, dạng trần.	29±0,92	24±1,0	32±1,04
<i>Aspergillus niger</i> TS5 (OR135784): Khuẩn lạc có hệ sợi trắng dày mịn, bề mặt xốp bông, lấm tấm bào tử màu đen than. Không có giọt tiết, không sinh sắc tố. Cuống sinh bào tử không phân vách, trần, nhẵn, đầu cuống có bông phình to, đỉnh nhiều thể bình 2 tầng. Bào tử hình cầu, trần, đỉnh tưng chùm.	7±0,87	20±0,98	16±1,30
<i>Curvularia eragrostidis</i> TD4.2 (OR135782): Khuẩn lạc phân vùng, từ màu đen xám đậm đến màu ghi trắng, bề mặt bông, xơ. Không có giọt tiết, không sinh sắc tố. Giả bào tử dạng trần, đơn, màu đỏ nâu. Bào tử áo dạng đơn, trần, 3 vách ngăn, ở đỉnh sợi, hình elip hoặc trứng.	11±1,23	16±1,45	19±1,10
<i>Aspergillus sydowii</i> TD5 (OR135783): Khuẩn lạc dạng toả tròn, màu lục rêu, viền trắng mịn, bề mặt dạng bột mịn hoặc xốp nhẹ. Không có giọt tiết, sinh sắc tố xanh. Cuống sinh bào tử không phân vách, trần, nhẵn, không màu, đầu cuống có bông phình to. Bào tử hình cầu, trần, đỉnh tưng chùm dây trên mỗi thể bình.	17±0,89	15±1,04	20±0,97
<i>Pestalotiopsis vismiae</i> NS12.2 (OR135786): Khuẩn lạc dạng toả tròn, màu trắng, bông mịn dạng len và hơi thưa mỏng ở tâm. Không có giọt tiết, không sinh sắc tố.	1±0,78	13±0,88	18±1,35
<i>Camarosporium brabeji</i> ND6.3 (OR135785): Khuẩn lạc trắng ở tâm, vàng nâu ở viền ngoài. Có các rãnh kéo từ tâm đến biên. Khuẩn lạc mọc toả các phía, không tròn đều. Mặt khuẩn lạc dạng bông mịn, xốp nhẹ, lồi ở tâm. Không có giọt tiết, không sinh sắc tố.	10±0,69	13±1,56	18±1,63



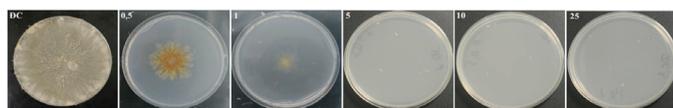
Hình 1. Hình thái khuẩn lạc (hình trên) và bào tử (hình dưới) của 8 chủng nấm phân lập thuần khiết từ vật liệu gỗ được sử dụng trong nghiên cứu.

3.2. Khả năng kháng nấm của preventol, α -BCA và đồng sunfat (in vitro)

Hoạt chất ức chế nấm preventol khi được thử nghiệm ở 5 nồng độ khác nhau từ 0,5, 1, 5, 10 đến 25 mg/l trên 8 chủng nấm gây hại vật liệu cellulose mạnh cho thấy sự ức chế sinh trưởng nấm. Sau 5 ngày sinh trưởng, các chủng nấm đều phát triển tốt ở mẫu đối chứng với đường kính khuẩn lạc khoảng 85-91 mm. Ở nồng độ thử nghiệm 0,5 mg/l, các chủng nấm đều có hiện tượng giảm rõ rệt đường kính khuẩn lạc dao động trong khoảng 21-25 mm. Khi tăng nồng độ lên 1 mg/l, nấm phát triển rất chậm, đường kính khuẩn lạc trung bình của các chủng nấm giảm trong khoảng 6,6-12,4 mm (giảm 90%). Từ 5 mg/l trở lên đã không ghi nhận sự hình thành khuẩn lạc của cả 8 chủng nấm thử nghiệm. Như vậy, tại nồng độ tối thiểu (MIC 5 mg/l), preventol đã ức chế hoàn toàn sự phát triển của cả 8 chủng nấm gây hại (bảng 2). Minh họa thử nghiệm của preventol trên chủng nấm gây hại *Camarosporium brabeji* ND6.3 ở hình 2.

Bảng 2. Khả năng kháng nấm của preventol ở nồng độ 0,5, 1, 5, 10 và 25 mg/l.

Các chủng nấm	Đường kính khuẩn lạc nấm ở các nồng độ (mm)					
	Đối chứng	0,5	1	5	10	25
<i>Paraeutypella citricola</i> BS2.2	91,7±0,46	21,4±0,51	8,4±0,53	0	0	0
<i>Aspergillus flavus</i> BS18.2	90,3±0,29	23,7±0,87	9,6±0,55	0	0	0
<i>Aspergillus gracilis</i> BSK6.1	89,5±0,50	22,9±0,45	6,6±0,81	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i> TS5	90,9±0,85	25,7±0,87	12,4±0,55	0	0	0
<i>Curvularia eragrostidis</i> TD4.2	87,6±0,53	21,1±1,05	6,6±1,07	0	0	0
<i>Aspergillus sydowii</i> TD5	85,5±0,50	22,3±0,70	8,4±0,69	0	0	0
<i>Pestalotiopsis vismiaie</i> NS12.2	88,1±0,90	24,1±1,01	8,5±0,47	0	0	0
<i>Camarosporium brabeji</i> ND6.3	85±0,82	23,9±1,03	9,6±0,40	0	0	0



Hình 2. Thử nghiệm khả năng kháng nấm của preventol ở chủng *Camarosporium brabeji* ND6.3 với các nồng độ 0,5, 1, 5, 10 và 25 mg/l.

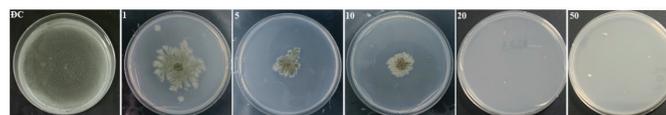
Nghiên cứu của J.W. Eckert và cs (1979) [20] đã chỉ ra độc tính mạnh của o-phenylphenol và các dẫn xuất của nó lên chủng nấm *Diplodia natalensis* và *Penicillium digitatum*. Sự thủy phân 2 dẫn xuất este, 2-biphenyl acetate và 2-biphenyl propionate, trong dịch nuôi cấy 2 chủng nấm trên dẫn đến sự tích lũy o-phenylphenol trong môi trường nuôi cấy và trên sợi nấm gây độc cho nấm. Công bố của H.N. Tumah (2005) [21] đã chỉ ra, 2-phenylphenol 1% có khả năng diệt một số chủng nấm sau 15 phút tiếp xúc với hoạt chất ở nồng độ 7 μ g/ml đối với chủng *C. albicans*, 15 μ g/ml với chủng *A. versicolor* và *A. corymbifera* và 30 μ g/ml với chủng *P. verrucosum* var. *cyclopium*.

Đối với chất kháng nấm α -BCA, trong dải nồng độ được thử nghiệm từ 1, 5, 10, 20 đến 50 mg/l, ở mẫu đối chứng cả 8 chủng nấm đều phát triển mạnh và đạt kích thước khuẩn lạc khoảng 83-93 mm sau 5 ngày thử nghiệm. Khi các nồng độ

chất ức chế tăng dần 1-10 mg/l, ghi nhận kích thước khuẩn lạc trung bình giảm dần tương ứng 31,8 mm xuống còn 5,7 mm (giảm 93,5%). Từ nồng độ 20 mg/l không thấy sự hình thành khuẩn lạc nấm trên đĩa thạch trong thời gian nuôi cấy (bảng 3). Như vậy tại MIC 20 mg/l, hoạt chất kháng nấm α -BCA đã ức chế hoàn toàn sự phát triển của cả 8 chủng nấm gây hại. Minh họa thử nghiệm của α -BCA trên chủng nấm gây hại *Aspergillus sydowii* TD5 được thể hiện ở hình 3.

Bảng 3. Khả năng kháng nấm của α -BCA ở các nồng độ 1, 5, 10, 20 và 50 mg/l.

Các chủng nấm	Đường kính khuẩn lạc nấm ở các nồng độ (mm)					
	Đối chứng	1	5	10	20	50
<i>Paraeutypella citricola</i> BS2.2	93,2±0,76	32,1±1,05	21,1±1,01	5±0,8	0	0
<i>Aspergillus flavus</i> BS18.2	92,1±0,90	29,7±1,22	24,3±1,04	5,2±1,04	0	0
<i>Aspergillus gracilis</i> BSK6.1	86,4±0,71	30,1±1,10	22,8±0,91	5,7±0,64	0	0
<i>Aspergillus niger</i> TS5	92,8±0,76	34,9±0,83	25,7±0,64	8,1±0,97	0	0
<i>Curvularia eragrostidis</i> TD4.2	87±1,50	31,8±0,80	17±1,00	5,8±0,72	0	0
<i>Aspergillus sydowii</i> TD5	86,3±0,79	33±0,90	22,4±1,42	5±0,75	0	0
<i>Pestalotiopsis vismiaie</i> NS12.2	84,4±1,12	32,1±0,90	19,4±0,49	5,7±0,64	0	0
<i>Camarosporium brabeji</i> ND6.3	82,9±0,81	30,8±1,04	18,2±1,15	4,7±0,51	0	0



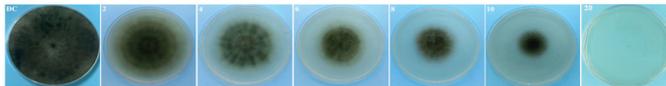
Hình 3. Thử nghiệm khả năng kháng nấm của α -BCA trên chủng *Aspergillus sydowii* TD5 ở nồng độ 1, 5, 10, 20 và 50 mg/l.

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra khả năng kháng nấm mạnh của cinnamaldehyde [22-24]. Z. Gan và cs (2020) [22] đã chỉ ra tiềm năng kháng nấm bệnh *P. digitatum* của cinnamaldehyde và 6 chất dẫn xuất của nó thông qua sự có mặt của vòng kháng nấm. Trong đó, dẫn xuất 4-methoxy cinnamaldehyde có hoạt tính kháng nấm cao nhất với đường kính 32,3±0,35 mm, tiếp theo là cinnamaldehyde (31,4±0,57 mm), 2,4-dimethoxy cinnamaldehyde (29,4±0,57 mm), 4-methyl cinnamaldehyde (21,4±0,7 mm), 4-chloro cinnamaldehyde (20,5±0,71 mm), 4-bromo cinnamaldehyde (17,5±0,71 mm), and 4-nitro cinnamaldehyde (16,8±0,29 mm).

Khả năng ức chế các chủng nấm của đồng sunfat được thực hiện với 6 nồng độ từ 2, 4, 6, 8, 10 và 20 mg/l. Ở mẫu đối chứng cả 8 chủng nấm đều phát triển mạnh và đạt kích thước khuẩn lạc khoảng 86-93 mm sau 5 ngày thử nghiệm. Khi nồng độ đồng sunfat tăng lên từ 2, 4, 6, 8 và 10 mg/l, chất ức chế đã tác động lên sự sinh trưởng của sợi nấm làm giảm đường kính trung bình khuẩn lạc nấm xuống còn 4,5 mm (10 mg/l) tương ứng 94,9%. Tại nồng độ được thử nghiệm cao nhất 20 mg/l đã ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của nấm (bảng 4). Như vậy tại dải nồng độ thử nghiệm, đồng sunfat đã ức chế hoàn toàn sinh trưởng của 8 chủng nấm mốc ở nồng độ 20 mg/l. Minh họa thử nghiệm của đồng sunfat trên chủng nấm gây hại *Curvularia eragrostidis* TD4.2 được thể hiện ở hình 4.

Bảng 4. Khả năng kháng nấm của đồng sunfat ở nồng độ 2, 4, 6, 8, 10 và 20 mg/l.

Các chủng nấm	Đường kính khuẩn lạc nấm ở các nồng độ (mm)						
	Đối chứng	2	4	6	8	10	20
<i>Paratytopella citricola</i> BS2.2	89,9±1,91	62,4±1,34	52,2±0,92	35,4±0,35	22,6±1,77	3,8±0,21	0
<i>Aspergillus flavus</i> BS18.2	92,2±1,85	61,7±2,21	57,4±0,51	24,1±1,01	21,5±0,5	3,5±0,5	0
<i>Aspergillus gracilis</i> BSK6.1	86,8±0,59	60,3±0,79	51,6±2,35	36,3±0,38	24,3±0,64	5,3±0,7	0
<i>Aspergillus niger</i> TSS	92,6±0,71	70,7±1,54	54,7±1,1	36,7±0,7	24,9±1,01	6,1±1,05	0
<i>Curvularia eragrostidis</i> TD4.2	86,2±1,04	62,6±1,42	51,5±1,55	32,5±0,5	18,6±0,55	4,4±0,55	0
<i>Aspergillus sydowii</i> TD5	88,8±1,08	60,1±0,81	47±1,05	35,4±0,55	23,5±0,5	4±0,56	0
<i>Pestalotiopsis vismiaie</i> NS12.2	88,6±2,23	62,2±0,21	53,4±0,71	33±0,55	22±1,00	4,4±0,31	0
<i>Camarosporium brabeji</i> ND6.3	85,9±0,42	64,1±0,46	52,1±0,81	32,5±1,32	24,5±0,70	4,1±0,42	0



Hình 4. Thử nghiệm khả năng kháng nấm của đồng sunfat ở chủng *Curvularia eragrostidis* TD4.2 với các nồng độ 2, 4, 6, 8, 10 và 20 mg/l.

Nghiên cứu của E.O. Oziengbe và cs (2012) [9] đã chỉ ra khả năng ức chế nấm bệnh thán thư trên cây xoài của đồng sunfat. Dưới điều kiện *in vitro*, chủng nấm bệnh *Colletotrichum gloeosporioides* bị ức chế sinh trưởng đáng kể đến 78,2% và sự nảy mầm của bào tử nấm 66,3% so với đối chứng, ở nồng độ 0,8 mg/l đồng sunfat. Với xu hướng sử dụng công nghệ nano, tác giả E.I. Laclette và cs (2022) [18] đã chỉ ra rằng, nano đồng (Cu-NP) có khả năng ức chế nấm sợi gây bệnh cho thực vật *Fusarium kuroshium*. Cu-NP ở các nồng độ khác nhau đã ức chế hơn 80% sự phát triển của *F. kuroshium* và thậm chí còn hiệu quả hơn so với thuốc diệt nấm thương mại.

3.3. Khả năng ức chế nấm gây hại gỗ của chế phẩm AM-QS (in vitro)

Căn cứ vào kết quả kháng nấm của từng đơn chất (giá trị MIC), chế phẩm AM-QS chứa 3 chất gồm preventol, α-BCA và đồng sunfat được thử nghiệm ở 5 nồng độ khác nhau từ 0,1, 0,5, 1, 2 và 5%, tương ứng với nồng độ (mg/l) của mỗi thành phần đơn chất được quy đổi ở bảng 5. Kết quả đối kháng nấm của hỗn hợp chất AM-QS chỉ ra, ở nồng độ 0,1% sự sinh trưởng của nấm bắt đầu bị ức chế, đường kính khuẩn lạc nấm chỉ đạt 18-24,7 mm. Khi tăng lên nồng độ 1%, đường kính khuẩn lạc nấm giảm xuống mức thấp nhất khoảng 2,1-4,4 mm (tương ứng 96,6%). Từ nồng độ 2% và cao hơn, nấm bị ức chế hoàn toàn, không hình thành khuẩn lạc trên đĩa thạch (bảng 6 và hình 5), trong khi các chủng nấm ở mẫu đối chứng phát triển bình thường với đường kính khuẩn lạc đạt 85,8-90,8 mm sau 5 ngày nuôi cấy. Minh họa thử nghiệm của chế phẩm AM-QS trên chủng nấm gây hại *Pestalotiopsis vismiaie* NS12.2 ở hình 5. Như vậy, ở nồng độ 2% của AM-QS tương đương nồng độ của từng đơn chất là 0,1 mg/l preventol, 0,4 mg/l α-BCA và 0,4 mg/l đồng sunfat, các chủng nấm bị ức chế sinh trưởng hoàn toàn. Như vậy, so với khi sử dụng từng đơn chất, nồng độ thực tế của mỗi đơn chất trong hỗn hợp đã giảm 50 lần. Hiệu quả

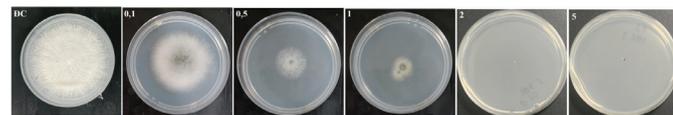
hiệp đồng ức chế của các đơn chất trong chế phẩm AM-QS được thể hiện một cách rõ rệt so với sử dụng từng đơn chất.

Bảng 5. Giá trị nồng độ mg/l của mỗi đơn chất trong chế phẩm AM-QS.

AM-QS (mg/l)	AM-QS (%)				
	0,1	0,5	1	2	5
Preventol	0,005	0,025	0,050	0,100	0,25
α-BCA	0,020	0,100	0,200	0,400	1,00
Đồng sunfat	0,020	0,100	0,200	0,400	1,00

Bảng 6. Khả năng kháng nấm của AM-QS ở các nồng độ 0,1, 0,5, 1, 2 và 5%.

Các chủng nấm	Đường kính khuẩn lạc nấm ở các nồng độ (mm)					
	Đối chứng	0,1	0,5	1	2	5
<i>Paratytopella citricola</i> BS2.2	90,8±0,68	20,8±0,57	11,9±0,99	2,5±0,55	0,00	0,00
<i>Aspergillus flavus</i> BS18.2	89,8±0,97	21,7±0,75	13,8±0,86	2,6±0,74	0,00	0,00
<i>Aspergillus gracilis</i> BSK6.1	88,7±0,70	21,7±0,65	10,2±0,80	3,4±0,35	0,00	0,00
<i>Aspergillus niger</i> TSS	90,8±0,76	24,7±0,64	13±0,80	4,4±0,59	0,00	0,00
<i>Curvularia eragrostidis</i> TD4.2	86,4±1,31	18±1,10	8,2±0,25	4,2±0,76	0,00	0,00
<i>Aspergillus sydowii</i> TD5	85,8±0,76	21,1±0,85	9,7±0,61	2,3±0,35	0,00	0,00
<i>Pestalotiopsis vismiaie</i> NS12.2	86,6±1,25	18,2±0,40	7,6±0,60	2,6±0,53	0,00	0,00
<i>Camarosporium brabeji</i> ND6.3	87,1±1,10	20,9±1,21	7,8±0,76	2,1±0,15	0,00	0,00

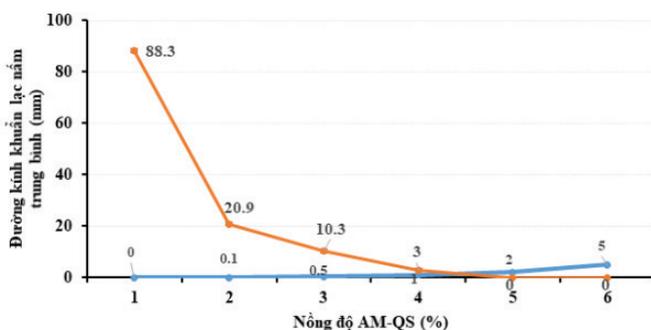


Hình 5. Hình ảnh thử nghiệm khả năng kháng nấm của AM-QS với chủng *Pestalotiopsis vismiaie* NS12.2 ở các nồng độ 0,1, 0,5, 1, 2 và 5%.

Công bố của H.N. Tumah (2005) [21] đã chỉ ra, sự kết hợp giữa Triclosan 0,5% với 2-phenylphenol 0,5% đã làm tăng hiệu quả hiệp đồng của 2 hoạt chất lên 3 chủng nấm *C. albicans*, *A. versicolor* và *A. corymbifera* chỉ ở nồng độ 1,5 µg/ml hỗn hợp và với *P. verrucosum* var. *cyclopium* chỉ ở nồng độ 3 µg/ml. Hiệu quả hiệp đồng của 2 chất đã làm tăng khả năng diệt nấm lên khoảng 5-10 lần đồng thời giảm nồng độ của mỗi hoạt chất sử dụng. Điều này có thể làm giảm thiểu tác dụng phụ có thể có của 2 hoạt chất. Nghiên cứu khác của L. Cai và cs (2020) [14] về công thức kháng nấm *Postia placenta*, *Gloeophyllum trabeum* gây hại trên gỗ thông, chứa hỗn hợp methyl-β-cyclodextrin và cinnamaldehyde đã cho thấy hiệu quả đáng kể dựa vào sự kết hợp của các hoạt chất. Khối lượng gỗ bị mất đi sau xử lý với hỗn hợp cinnamaldehyde và 50% dung dịch methyl-β-cyclodextrin chỉ là 5,5% với nấm gây hại *P. placenta* và chỉ 6,86% do nấm gây hại *G. trabeum* so với đối chứng khoảng 35%. Hỗn hợp chất của Nano-CuO và dịch chiết lá *Nerium oleander* có khả năng ức chế nấm *Trametes hirsuta*, *Postia placenta* gây hại trên gỗ cao su (*Hevea brasiliensis*). Khối lượng gỗ bị mất đi sau xử lý với công thức hỗn hợp chất là 24,75% do nấm gây hại *T. hirsuta* so với gỗ không được xử lý 28,28%, và mất đi 13,19% do nấm gây hại *P. placenta* so với gỗ không được xử lý 51,59% [25].

Nhằm quan sát tổng thể khả năng ức chế nấm gây hại cellulose mạnh của hỗn hợp 3 đơn chất trên, một đường xu hướng biểu thị giá trị trung bình đường kính khuẩn lạc của

8 chủng nấm thử nghiệm theo nồng độ chế phẩm AM-QS thử nghiệm được xây dựng. Từ đồ thị cho thấy, đường kính trung bình khuẩn lạc nấm có xu thế giảm mạnh, bắt đầu từ 88,3 mm giảm xuống còn 20,9 mm (nồng độ thử nghiệm 0,1%) và tiếp tục giảm đến giá trị 0 mm khi nồng độ chế phẩm AM-QS tăng lên đến 2% (hình 6).



Hình 6. Đường xu hướng biểu diễn kích thước khuẩn lạc nấm theo nồng độ chế phẩm AM-QS từ 0,1, 0,5, 1, 2 đến 5%.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã đánh giá khả năng ức chế 8 chủng nấm gây hại gỗ mạnh của 3 đơn hoạt chất preventol, α -BCA và đồng sunfat, đồng thời cũng đánh giá hiệu quả hiệp đồng của một công thức chế phẩm AM-QS kháng nấm chứa hỗn hợp 3 đơn chất trên. Hoạt chất preventol ở nồng độ 1 mg/l ức chế 90% đường kính khuẩn lạc nấm và ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của các chủng nấm ở MIC là 5 mg/l. Đối với α -BCA, đường kính khuẩn lạc nấm giảm 93,5% ở nồng độ 10 mg/l và giá trị MIC là 20 mg/l. Đồng sunfat ức chế sinh trưởng nấm giảm 94,9% ở 10 mg/l và MIC là 20 mg/l. Chế phẩm AM-QS có khả năng ức chế sinh trưởng nấm tăng 50 lần so với dạng đơn chất, trong đó nồng độ ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của các chủng nấm là 2% tương đương 0,1 mg/l (preventol), 0,4 mg/l (α -BCA) và 0,4 mg/l (đồng sunfat).

LỜI CẢM ƠN

Bài báo được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài “Nghiên cứu chế tạo chế phẩm đặc chủng AM-QS chống nấm mốc cho vật liệu gốc xenlulo ứng dụng trong công tác bảo quản vũ khí trang bị” (mã số 2022.11.41) do Bộ Quốc phòng quản lý. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] C.C. Ruiz, R. Avendaño, E.E. Leyva, et al. (2018), "Two new cellulolytic fungal species isolated from a 19th century art collection", *Sci. Rep.*, **8**(1), DOI: 10.1038/s41598-018-24934-7.

[2] F.E. Bergadi, F. Laachari, S. Elabed, et al. (2013), "Cellulolytic potential and filter paper activity of fungi isolated from ancient manuscripts from the Medina of Fez", *Ann. Microbiol.*, **64**, pp.815-822, DOI: 10.1007/s13213-013-0718-6.

[3] A.C. Pinheiro, S.O. Sequeira (2020), "Mycological studies in cultural heritage", *Reference Module in Life Sciences*, Elsevier, DOI: 10.1016/B978-0-12-809633-8.21003-0.

[4] A. Russel (2003), "Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **52**(5), pp.750-763, DOI: 10.1093/jac/dkg422.

[5] T.C. Chou (2006), "Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies", *Pharmacol. Rev.*, **58**(3), pp.621-681, DOI: 10.1124/pr.58.3.10.

[6] Y. Akimoto, S. Nito, G. Urakubo (1988), "Studies on the metabolic fate of alpha-bromocinnamaldehyde (an antifungal agent) in rat", *Eisei Kagaku*, **34**(4), pp.303-312, DOI: 10.1248/jhs1956.34.303.

[7] J.H. Haines, S.A. Kohler (1986), "An evaluation of ortho-phenyl phenol as a fungicidal fumigant for archives and libraries", *Journal of The American Institute for Conservation*, **25**(1), pp.49-55, DOI: 10.2307/3179414.

[8] T.K. Mazu, B.A. Bricker, H.F. Rozas, et al. (2016), "The mechanistic targets of antifungal agents: An overview", *Mini Rev. Med. Chem.*, **16**(7), pp.555-578, DOI: 10.2174/1389557516666160118112103.

[9] E.O. Oziengbe, J.O. Osaze (2012), "Antifungal activity of copper sulphate against *Colletotrichum Gloeosporioides*", *Journal of Asian Scientific Research*, **2**(12), pp.835-839.

[10] A. Unger, A. Schniewind, W. Unger (2001), *Conservation of Wood Artifacts: A Handbook*, Springer Berlin, Heidelberg, DOI: 10.1007/978-3-662-06398-9.

[11] J.H. Kim, N.C. Faria, M.L. Martins, et al. (2012), "Enhancement of antimycotic activity of amphotericin B by targeting the oxidative stress response of *Candida* and *Cryptococcus* with natural dihydroxybenzaldehydes", *Front. Microbiol.*, **3**, DOI: 10.3389/fmicb.2012.00261.

[12] M. Wóznik (2022), "Antifungal agents in wood protection - A review", *Molecules*, **27**(19), DOI: 10.3390/molecules27196392.

[13] Z. Bi, S. Fang, Q. Gao, et al. (2021), "Improvement of mould resistance of wood with cinnamaldehyde chitosan emulsion", *Wood Sci. Technol.*, **56**, pp.187-204, DOI: 10.1007/s00226-021-01349-8.

[14] L. Cai, H. Lim, D.D. Nicholas, et al. (2020), "Bio-based preservative using methyl- β -cyclodextrin essential oil complexes for wood protection", *Int. J. Biol. Macromol.*, **147**, pp.420-427, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.056.

[15] C.C. Ngo, Q.H. Nguyen, T.H. Nguyen, et al. (2021), "Identification of fungal community associated with deterioration of optical observation instruments of museums in Northern Vietnam", *Appl. Sci.*, **11**(12), DOI: 10.3390/app11125351.

[16] K.A. Seifert, W. Gams (2011), "The genera of Hyphomycetes - 2011 update", *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, **27**, pp.119-129, DOI: 10.3767/00315851X617435.

[17] A. Balla, A. Silini, H.C. Silini, et al. (2022), "Screening of cellulolytic bacteria from various ecosystems and their cellulases production under multi-stress conditions", *Catalysts*, **12**(7), DOI: 10.3390/catal12070769.

[18] E.I. Lacleite, J. Blaz, C.A.P. Torres, et al. (2022), "Antifungal effect of copper nanoparticles against *Fusarium kuroshium*, an obligate symbiont of *Eurwallacea kuroshio* ambrosia beetle", *Fungi (Basel)*, **8**(4), DOI: 10.3390/jof8040347.

[19] M. Balouiri, M. Sadiki, S.K. Ibensouda (2016), "Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review", *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **6**(2), pp.71-79, DOI: 10.1016/j.jppha.2015.11.005.

[20] J.W. Eckert, O.F. Esuruoso, J. Carey (1979), "Fungitoxicity of derivatives of o-phenylphenol", *The American Phytopathological Society*, **69**(10), pp.1092-1095.

[21] H.N. Tumah (2005), "Synergistic effect of the combination triclosan with 2-phenylphenol against *Pseudomonas aeruginosa* and fungi", *Saudi Med. J.*, **26**(5), pp.723-727.

[22] Z. Gan, J. Huang, J. Chen, et al. (2020), "Synthesis and antifungal activities of cinnamaldehyde derivatives against *Penicillium digitatum* causing citrus green mold", *Journal of Food Quality*, **2020**, DOI: 10.1155/2020/8898692.

[23] T.H. Kang, E.I. Hwang, B.S. Yun, et al. (2007), "Inhibition of chitin synthases and antifungal activities by 2-benzoyloxycinnamaldehyde from *Pleuropterus cilinervis* and its derivatives", *Biol. Pharm. Bull.*, **30**(3), pp.598-602, DOI: 10.1248/bpb.30.598.

[24] K.H. Bang, B.S. Min, Y.H. Lee (1998), "Antifungal activity of cinnamaldehyde derivatives", *The Korean Journal of Mycology*, **26**(4), pp.525-530.

[25] K.S. Shiny, S. Nair, N. Mamatha, et al. (2022), "Decay resistance of wood treated with copper oxide nanoparticles synthesised using leaf extracts of *Lantana camara* L. and *Nerium oleander* L.", *Wood Material Science & Engineering*, **17**(6), pp.727-733, DOI: 10.1080/17480272.2021.1934728.