

Tiềm năng ứng dụng nano bạc và đồng ức chế nấm *Penicillium digitatum* gây bệnh mốc xanh trên cam Việt Nam

Nguyễn Vũ Mai Linh, Phan Thị Hồng Thảo*,
Nguyễn Văn Hiếu, Nguyễn Thị Hồng Liên

Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 20 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: Nấm *Penicillium* là một trong các tác nhân chính gây hại trên cam sau thu hoạch. Tại Việt Nam, việc phòng ngừa loại nấm này phụ thuộc nhiều vào hóa chất gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến môi trường và sức khỏe con người. Hiện nay đã có những vật liệu mới - vật liệu nano có hiệu quả trong việc hạn chế nấm bệnh và ít gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người, là một vật liệu tiềm năng trong tương lai. Trong nghiên cứu này, nấm N11 gây bệnh mốc xanh được phân lập trên quả cam Tuyên Quang. Dựa vào đặc điểm hình thái và trình tự gen ITS, chủng nấm N11 được định danh là *Penicillium digitatum* N11. Bên cạnh đó, khả năng sử dụng các hạt nano kim loại Ag, Cu và nano composite Ag ở các nồng độ khác nhau trong hạn chế tác hại của nấm *P. digitatum* ở các giai đoạn sinh trưởng đã được khảo sát trong phòng thí nghiệm. Nồng độ nano Ag từ 200 ppm đến 400 ppm và nano Cu ở nồng độ 250 ppm có thể ức chế khả năng phát triển của nấm ở giai đoạn sinh dưỡng trong vòng 21 ngày lên đến trên 50%. Sử dụng nồng độ nano Cu 500 ppm có thể ức chế hoàn toàn sự phát triển của nấm. Nano composite của Ag-silica làm tăng khả năng hạn chế sự phát triển của nấm N11 tốt hơn so với nano composite Ag-bentonite. Đối với giai đoạn bảo quản, nano Ag, Cu và nano composite Ag-silica và Ag-bentonite ở các nồng độ lần lượt là trên 200 ppm, 1000 ppm, trên 2000 ppm và 4000 ppm có khả năng ức chế sự hình thành khuẩn lạc nấm trên 90% sau 3 ngày.

Từ khóa: Cam, *Penicillium digitatum*, nano Ag, nano Cu, MIC.

1. Đặt vấn đề

Cam (*Citrus sinensis* L.) là một loại quả rất quan trọng được con người sử dụng, chứa nhiều chất dinh dưỡng, trong đó có vitamin C có ảnh hưởng tốt đến sức khỏe con người. Hiện nay,

cam được trồng ở hơn 100 quốc gia trên 6 châu lục của thế giới [1]. Tuy nhiên đối với cây có múi thì 40% năng suất lại bị thất thu trong quá trình sau thu hoạch và chủ yếu do nấm gây ra [2].

Tại Việt Nam, cam là mặt hàng có giá trị thương mại cao có hiệu quả kinh tế với người nông dân. Tuy nhiên, tình trạng thối hỏng sau thu hoạch của các loại trái cây có múi nói chung và quả cam nói riêng đang gây ra những thất thoát lớn về kinh tế. Nấm mốc xanh

*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-24-37916882.

Email: pthongthaoibt@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4630>

(*Penicillium*) là một trong những chi nấm lớn nhất và được quan tâm nhất với hơn 400 loài được mô tả trên thế giới, là chi gây bệnh nghiêm trọng sau thu hoạch đối với cây có múi, mà chi phí tổn thất lên đến 25% tổng sản lượng trên toàn thế giới [2]. Không những vậy, nấm còn có thể tạo ra các chất chuyển hóa thứ cấp gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người [3]. Hiện nay, các vùng trồng cam quýt ở nước ta và trái có múi sau thu hoạch thường bị nhiễm bệnh do nấm *Penicillium* (nấm mốc xanh) gây thiệt hại đáng kể về năng suất và chất lượng. Để loại bỏ các loài nấm này, chủ yếu dựa vào các loại hóa chất. Hiện nay, nhiều nghiên cứu trên thế giới tập trung vào nghiên cứu sử dụng các vật liệu mới trong đó các loại vật liệu nano sử dụng như một loại thuốc trừ sâu để loại bỏ nấm gây hại mà ít ảnh hưởng đến môi trường và sức khỏe con người.

Các vật liệu nano có kích thước trong khoảng từ 1-100 nm đang thu hút sự chú ý về những đặc tính khác biệt của chúng và khả năng ứng dụng chuyên sâu trong nhiều lĩnh vực khoa học như dược phẩm, hóa học, nông nghiệp, công nghệ sinh học,... [4, 5]. Việc áp dụng công nghệ nano vào các ngành nông nghiệp và thực phẩm được đặt ra lần đầu tiên trong chương trình hành động của Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ vào 9/2003 [6], và được dự đoán sẽ là công nghệ then chốt tạo ra thay đổi quan trọng trong các ngành này. Trong những năm đầu tiên, việc áp dụng công nghệ nano trong sản xuất nông nghiệp chủ yếu được thực hiện qua các nghiên cứu trong phòng thí nghiệm, nhưng ngay sau đó nó đã bắt đầu và đang tiếp tục có ảnh hưởng đáng kể trong các lĩnh vực quan trọng như lai tạo các giống cây trồng mới, phát triển vật liệu chức năng mới và hệ thống phân phối thông minh cho hóa chất nông nghiệp như thuốc diệt cỏ, phân bón và thuốc trừ sâu, hệ thống thông minh cho chế biến thực phẩm, bao bì và các lĩnh vực khác như khắc phục hậu quả của dư lượng chất diệt cỏ và thuốc trừ sâu trong thực vật và đất, trong xử lý nước thải, quản lý tài nguyên thiên nhiên và phát hiện sớm các mầm bệnh, các chất gây ô nhiễm trong cây trồng và

thực phẩm,... [7]. Vật liệu nano đang được nhiều tác giả quan tâm đến khả năng diệt nấm, hứa hẹn sẽ là tác nhân tiềm năng kiểm soát nấm gây bệnh thực vật do hiệu quả tác dụng cao, không phát triển các chủng kháng thuốc và ít độc hại cho con người và động vật so với thuốc diệt nấm tổng hợp [8]. Trong nghiên cứu này, chủng nấm gây bệnh thối xanh trên cam Tuyên Quang được phân loại và khảo sát khả năng sử dụng các nano kim loại Ag và Cu khác nhau trong kiểm soát nấm bệnh.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. *Đối tượng*: Trái cam Tuyên Quang nhiễm bệnh

2.2. *Vật liệu*: Các chế phẩm nano Ag và Cu nhận từ Viện Công nghệ Môi trường

Bảng 1. Tính chất của các nano Ag và Cu sử dụng trong nghiên cứu

| Vật liệu | Hình dạng | Kích thước hạt nano, nm |
|--------------------|------------|-------------------------|
| Ag | Hình cầu | < 20 nm |
| Cu | Hình cầu | 30 nm |
| Ag-bentonite (AgB) | Chứa | ~ 30 nm |
| Ag-silica (AgS) | 2% nano Ag | < 12 nm |

2.3. *Phương pháp nghiên cứu*

Phân lập nấm Penicillium gây bệnh mốc xanh

Trái cam Tuyên Quang có các triệu chứng nhiễm nấm tại vườn cam Tuyên Quang được thu nhận để nghiên cứu sâu hơn. Chọn ngẫu nhiên 10 quả nhiễm nấm. Các trái cây này được rửa sạch bằng nước, khử trùng bề mặt bằng natri hypochlorite (NaClO) 1% và sau đó rửa lại 3 lần trong nước cất vô trùng. Mẫu vỏ quả được cắt bằng dụng cụ tiệt trùng từ ranh giới giữa mô khỏe và mô bệnh (3-5 mm) và đặt trên môi trường phân lập PDA và ủ ở $25 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 5 ngày. Các dòng nấm phân lập được làm sạch và giữ trên môi trường PDA để nghiên cứu sâu hơn.

Xác định đặc điểm nuôi cấy và phân loại nấm dựa trên phân tích trình tự gen ITS

Xác định đặc điểm sinh học của nấm thông qua sự phát triển của sợi nấm, hình dạng khuẩn lạc nấm, đặc điểm cơ quan sinh sản và bào tử phân sinh [9-11]. Phân loại nấm dựa vào xác định trình tự vùng ITS của rDNA bằng cặp mồi ITS1 (5'-TCC GTA GGTGAA CCT GCG G-3') and ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') theo Ni et al., 2012 [12].

Khảo sát khả năng ức chế nấm của nano kim loại

Chuẩn bị dung dịch bào tử nấm: Để chuẩn bị dịch giống bào tử trong quá trình kiểm tra ảnh hưởng của các loại nano đến giai đoạn bào tử, nảy mầm, nấm được nuôi trong ống thạch nghiêng từ 5 ngày – 10 ngày đến khi sinh bào tử, bổ sung glycerol 30% để thu bào tử. Bào tử nấm sử dụng trong nghiên cứu là 10^6 CFU/ml (xác định bằng buồng đếm hồng cầu dưới kính hiển vi quang học).

Xác định MIC và MFC

Tính nhạy cảm của nấm ở giai đoạn bào tử và bào tử nảy mầm đối với nano được xác định theo MIC, trong đó MIC (Minimum Inhibitory Concentration) là nồng độ ức chế tối thiểu, và MFC (Minimum Fungal Concentration) là nồng độ tối thiểu diệt nấm. Sử dụng phương pháp pha loãng $\frac{1}{2}$ để thu được các nồng độ nano khảo sát. Sau 72 giờ lắc với nano, xác định MIC, MFC của các nano đối với nấm *P. digitatum* N11 [13].

Xác định khả năng ức chế nấm ở giai đoạn sinh dưỡng

Hoạt động kháng nấm của nano kim loại được đánh giá trên đĩa thạch Petri. Môi trường đĩa thạch Hansen được bổ sung nano kim loại ở các nồng độ khác nhau, nano Ag: 10, 30, 50, 100, 200, 300, 400 ppm; nano Cu: 100, 250, 500, 1000, 1500 ppm. Các đĩa nấm *Penicillium* được nuôi trong 5 ngày ở 25°C được sử dụng làm giống. Các khoan thạch nấm giống đường kính 6 mm được đặt vào trung tâm đĩa thạch

nano. Ủ đĩa ở 25°C và theo dõi đường kính sinh trưởng của nấm theo thời gian, đĩa đối chứng (-) không bổ sung nano và đối chứng (+) sử dụng Carbendazim 400 ppm. Hiệu quả ức chế của nano kim loại với nấm được tính toán theo công thức sau: Tỷ lệ ức chế (%) = $\frac{R-r}{R} \times 100$,

trong đó R: đường kính khuẩn lạc nấm trên đĩa đối chứng và r là đường kính khuẩn lạc nấm trên đĩa thí nghiệm [14].

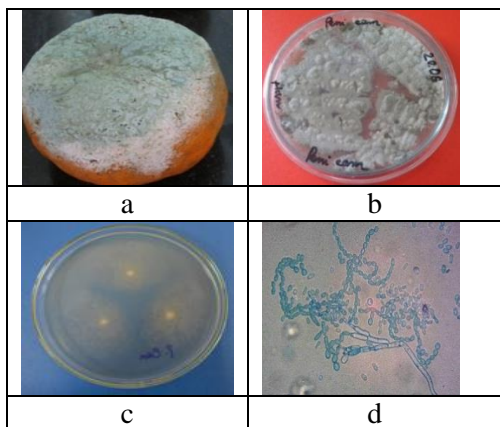
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập nấm Penicillium từ cam nhiễm bệnh và đặc điểm hình thái của nấm Penicillium

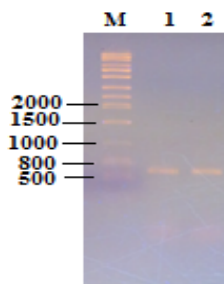
Trên các mẫu quả cam thu thập tại Tuyên Quang, trên các mẫu quả thu nhận để trong điều kiện nhiệt độ phòng. Triệu chứng ban đầu của nấm mốc xanh là sự xuất hiện của một vết mềm, hơi nước và hơi bị đổi màu từ 1-2 cm. Vết bệnh mau chóng lan rộng đường kính 3-5 cm sau 1 đến 2 ngày. Sợi nấm trắng xuất hiện trên bề mặt khi nấm bắt đầu lan 2-3 cm thì bắt đầu xuất hiện các bào tử màu xanh. Các ngày tiếp theo toàn bộ bề mặt trái cây nhanh chóng được bao phủ bởi các bào tử màu xanh lá cây.

Khuẩn lạc nấm N11 phát triển trên môi trường Czapek khá nhanh, đường kính đạt 4-5 cm/7 ngày ở nhiệt độ 24-26°C. Mặt khuẩn lạc bằng phẳng, dạng nhung, vùng mép dị thường. Hệ sợi nấm thường mờ, thành mỏng, ráp nhẹ. Mặt trái màu vàng nhạt đến nâu. Giọt tiết và sắc tố không thấy. Cơ quan sinh bào tử được sinh ra từ bề mặt hoặc từ hệ sợi khí sinh. Dưới kính hiển vi quang học có độ phóng đại 400 lần, quan sát được cuống từ 70-150 x 5-7 μ m, với thành mỏng và nhẵn, mang các chồi khi phát triển tốt nhất là ba vòng thể bình, nhưng thường là hai vòng hoặc dị thường. Nhánh 20-30 x 5-6 μ m, nhẵn; metulae thường 2-3 cái, kích thước 15-25 x 5-6 μ m; thể bình trên một vòng thường 3-5 cái, hình trụ tròn đầu, kích thước 10-15 (-20) x 4-5 μ m; bào tử trần hình elip đến trụ tròn, 6-8 (-15) x 2.5-

5(- 6) μm , nhẵn, tạo thành chuỗi dài đặc trưng cho các đặc điểm của nấm *Penicillium digitatum*. Dựa trên các triệu chứng, mô tả hình thái học của nấm được xác định là *P. digitatum* [9, 10].



Hình 1. Quả cam bị bệnh mốc xanh (a), hình thái trên môi trường (b) Hansen và (c) Czapek-Dox, (d) cấu trúc sinh sản và bào tử nấm *P. digitatum* N11 (độ phóng đại 400 lần)



Hình 2. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại vùng ITS của chủng nấm N11. Trong đó: M là marker và giếng 1 và 2 là sản phẩm PCR của N11.

Sản phẩm PCR khuếch đại gen vùng ITS của N11 thu được có chất lượng tốt với một băng rõ duy nhất trên gel điện di, có kích thước khoảng 500 bp. So sánh trình tự gen 5,8S rRNA (562 bp) của chủng nấm phân lập với các trình tự tương ứng trên ngân hàng dữ liệu cơ sở GenBank bằng công cụ BLAST trên NCBI cho thấy, trình tự ITS của chủng nấm nghiên cứu có độ tương đồng cao với các chủng nấm thuộc loài *P. digitatum* như: *P. digitatum* FRR1313 (99%); *P. digitatum* CBS 112082 (99%) (Bảng 2).

Dựa vào các đặc điểm sinh học và phân tích trình tự vùng ITS cho thấy, chủng nấm N11 có độ tương đồng cao và có nhiều đặc điểm gần gũi với loài *Penicillium digitatum* nên chủng nấm này được đặt tên là *Penicillium digitatum* N11.

Bảng 2. Kết quả so sánh trình tự vùng ITS của chủng *P. digitatum* N11 với dữ liệu tương ứng của các chủng nấm được đăng ký trên GenBank

| Chủng nấm so sánh | Mã số truy cập trên GenBank | Độ tương đồng (%) |
|------------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| <i>P. digitatum</i> FRR1313 | AY373910 | 99 |
| <i>P. digitatum</i> CBS 112082 | KJ834506 | 99 |
| <i>Penicillium</i> sp. 13 BRO-2013 | KF367511 | 99 |
| <i>P. digitatum</i> NRRL 786 | AF033471 | 99 |
| <i>P. digitatum</i> M2 | HQ850929 | 99 |
| <i>P. digitatum</i> CBS 136.65 | AB479307 | 99 |

Khả năng ức chế của các nano kim loại Ag và Cu đến khả năng sinh trưởng của nấm P. digitatum N11

Giai đoạn bào tử

Trong nghiên cứu dưới đây, chúng tôi xác định nồng độ ức chế tối thiểu, nồng độ tiêu diệt và ảnh hưởng của các nano Ag và nano Cu đến khả năng phát triển thành khuẩn lạc của bào tử nấm *P. digitatum* N11 gây bệnh trên cam ở Việt Nam. Kết quả được chỉ ra ở Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3. Mức độ ảnh hưởng của nano kim loại đến khả năng hình thành khuẩn lạc của nấm *P. digitatum*

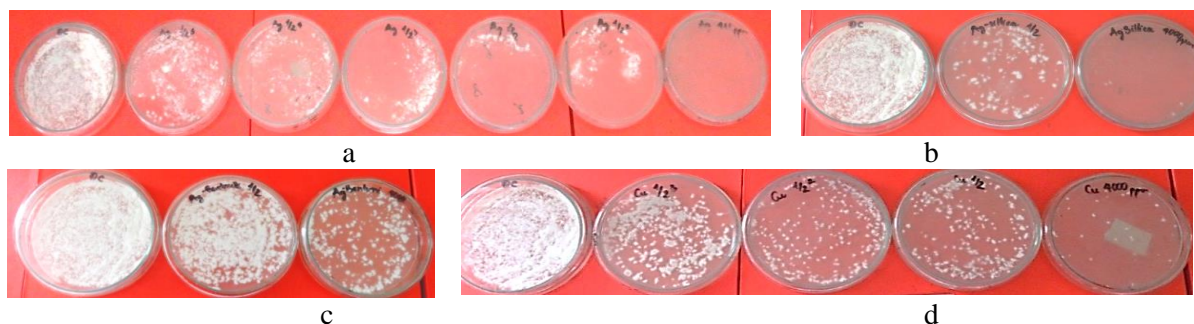
| Nano kim loại | MIC (ppm) | MFC (ppm) |
|---------------|-----------|-----------|
| Ag | 12,5 | 400 |
| Cu | 500 | 1000 |
| Ag- bentonite | 4000 | >4000 |
| Ag-silica | 2000 | >4000 |

Kết quả cho thấy, nano Ag thể hiện hiệu quả ức chế bào tử nấm *P. digitatum* phát triển ở nồng độ thấp 12,5 ppm và thể hiện nồng độ tiêu diệt ở nồng độ 400 ppm. Nano Cu thể hiện hiệu quả ức chế bào tử nấm *P. digitatum* phát triển ở

nồng độ 500 ppm và thể hiện nồng độ tiêu diệt ở nồng độ 1000 ppm, Nano composite Ag-silica thể hiện hiệu quả ức chế bào tử nấm *P. digitatum* phát triển ở nồng độ 2000 ppm (tương đương với nano Ag trong đó là 40 ppm) và thể hiện nồng độ tiêu diệt ở nồng độ trên 4000 ppm (tương đương trong đó chứa 80 ppm Ag). Như vậy, có thể cho thấy nếu sử dụng thêm bentonite và silica để tạo chế phẩm Ag composite với hai loại vật liệu này sẽ cho hiệu quả ức chế nấm tốt hơn.

Đã có nhiều nghiên cứu chứng minh nano Ag có khả năng kháng nấm [15] và trong hầu hết các trường hợp, sự ức chế sự phát triển của nấm bệnh thực vật được ghi nhận ở nồng độ

100 ppm [16], cao gấp 8 lần nồng độ nano Ag ức chế nấm *P. digitatum* (12,5 ppm) trong nghiên cứu của chúng tôi. Mahdizadeh và cs đã báo cáo rằng dung dịch nano Ag nồng độ 35 ppm ức chế được *Aspergillus*, *Penicillium* và *Trichoderma*. Nguyên nhân của sự khác nhau này có thể do đặc tính của nano sản xuất và chủng nấm kiểm định [17]. Kanhed và cs (2014) đã nghiên cứu khả năng ức chế của nano Cu với các nấm gây bệnh ở thực vật như *Phoma destructiva*, *Curvularia lunata*, *Alternaria alternata* và *Fusarium oxysporum* nhưng chưa có nghiên cứu cụ thể nào trên nấm *Penicillium* sp. [18].



Hình 3. Đánh mức mức độ tác động của nano với nấm N11 ở giai đoạn bào tử
a) nano Ag, b) nano composite AgS, c) nano composite AgB, d) nano Cu.

Bào tử nấm *P. digitatum* N11 được ủ với dung dịch nano ở các nồng độ khác nhau trong 3 ngày. Sau đó trải lên đĩa kiểm tra hiệu quả ức chế sự hình thành khuẩn lạc nấm của các nano khảo sát. Kết quả cho thấy, nano Ag ở nồng độ 12,5 ppm ức chế rõ rệt sự phát triển thành khuẩn lạc của các bào tử nấm so với đĩa đối chứng. Nồng độ nano Ag 400 ppm ức chế hoàn toàn khả năng hình thành khuẩn lạc nấm N11. Đối với nano composite Ag-silica, nồng độ nano 2000 ppm (tương đương với nano Ag chứa trong đó là 40 ppm) ức chế sự hình thành khuẩn lạc trên 90 % và tiêu diệt hoàn toàn ở nồng độ 4000 ppm. Ag-bentonite thể hiện khả năng ức chế sự hình thành khuẩn lạc thấp hơn so với Ag-silica, ở cùng nồng độ 2000 ppm chỉ ức chế được trên 30%, ở nồng độ 4000 ppm ức

chế được trên 90%. Nano Cu ức chế nấm N11 tương đối tốt, ở nồng độ 500 ppm đã ức chế rõ rệt và ở nồng độ từ 1000 ppm trở nên thì tỷ lệ ức chế sự phát triển của bào tử nấm lên đến trên 90% (Hình 3).

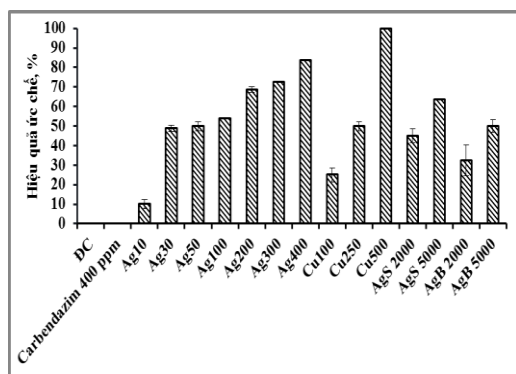
Giai đoạn sinh dưỡng

Trong hầu hết các trường hợp, hiệu ứng ức chế sự phát triển của nấm tăng dần theo nồng độ các nano sử dụng. Ở giai đoạn sinh dưỡng, nano Ag ức chế 50% sự phát triển của nấm ở nồng độ 30 ppm và tăng dần lên trên 80% ở nồng độ 400 ppm. Trong khi đó nano Cu ức chế 50% ở nồng độ 250 ppm và sự ức chế 100% được quan sát thấy ở nồng độ 500 ppm. Hóa chất diệt nấm carbendazim trên thị trường cũng ức chế 100% ở nồng độ 400 ppm. Mức ức chế

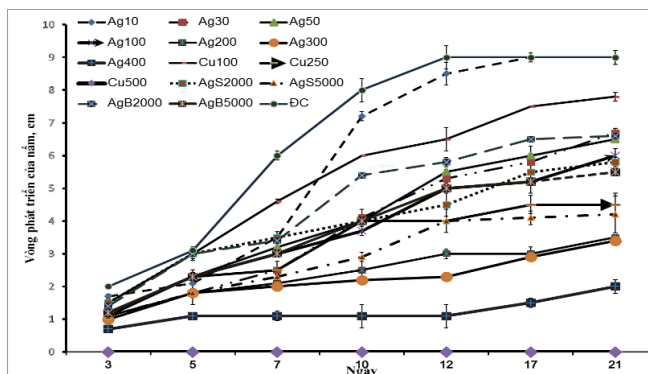
thấp nhất dưới 10% được quan sát trên môi trường bổ sung nồng độ nano Ag là 10 ppm. Trong khi đó nano composite Ag với bentonite và silica thể hiện hoạt tính kháng nấm lần lượt là 32 và 45% ở nồng độ 2000 ppm và tăng dần lên 50 đến 63% ở nồng độ 5000 ppm (Hình 4a và Hình 5).

Theo khảo sát (Hình 4 b) cho thấy, nano Ag ở các nồng độ đều giảm dần khả năng ức chế nấm *P. digitatum* N11 theo thời gian. Các nồng độ nano Ag từ 10÷100 ppm chỉ có khả năng ức chế sinh trưởng nấm tốt trong vòng 7-10 ngày.

Các nồng độ nano Ag từ 200÷400 ppm có thể duy trì khả năng ức chế nấm kéo dài đến 21 ngày. Tương tự, nano Cu có khả năng ức chế nấm tốt và khá bền, hoạt tính ức chế có thể duy trì trên 50% sau 21 ngày ở nồng độ 250 ppm và 100% ở 500 ppm. Nano composite Ag-silica có hoạt tính ức chế nấm tốt hơn và bền hơn nano Ag-bentonite và nồng độ sử dụng để ức chế nấm có thể sử dụng là 2000÷5000 ppm. Điều này được giải thích do mạng silica đã giúp phân tán nano Ag đều hơn, hạn chế sự co cụm, làm giảm tác động ức chế nấm của các nano Ag.

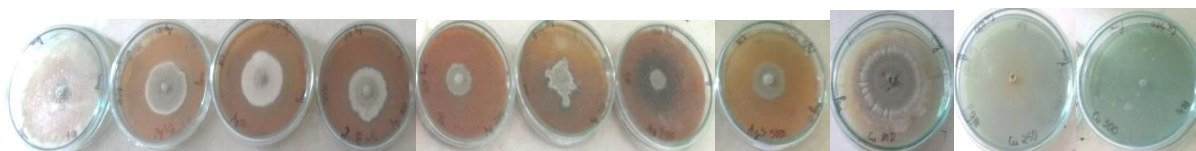


a



b

Hình 4. Hiệu quả ức chế nấm của các nano khác nhau sau 10 ngày trên môi trường nuôi Hansen (a) và hiệu quả ức chế của các nano Ag và Cu đối với nấm *P. digitatum* N11 theo thời gian.



Hình 5. Hiệu quả ức chế nấm của các nano khác nhau đối với nấm N11 sau 10 ngày.

Các báo cáo về cơ chế tác động ức chế ion bạc trên vi sinh vật đã chỉ ra rằng khi xử lý bằng ion Ag^+ , DNA mất khả năng nhân bản, dẫn đến sự biểu hiện bất hoạt của các protein tiểu đơn vị ribosome, cũng như một số protein và các enzyme tế bào khác cần thiết cho sản xuất ATP. Người ta cũng giả thuyết rằng ion Ag^+ chủ yếu ảnh hưởng đến chức năng của enzyme gắn màng, chẳng hạn như trong chuỗi

hô hấp [16]. Kết quả ức chế của nano Cu trong thí nghiệm này cũng tương đồng với kết quả của Phạm Van Viet và cs, sau 9 ngày nuôi cấy đường kính phát triển của nấm *Fusarium* sp. hầu như không tăng ở các mẫu ở nồng độ nano Cu là 450 ppm và nồng độ nano Cu càng tăng thì đường kính nấm sẽ giảm [19].

4. Kết luận

Chủng nấm mốc xanh N11 được phân lập từ quả cam Tuyên Quang. Trong bài báo này, kết hợp nghiên cứu một số đặc điểm hình thái và phân tích trình tự vùng ITS-rDNA, chủng N11 có độ tương đồng cao (99%) với loài *P. digitatum*, do đó, được định tên là *P. digitatum* N11. Sử dụng nano Ag và Cu có khả năng ức chế nấm *P. digitatum* N11. Trong khi đó, các hóa chất ở nồng độ cao benomyl (200 ppm), thiabendazole (2000 ppm) đều không có khả năng loại bỏ nấm mốc [20]. Carbendazim và thiabendazole là những chất kháng nấm thường được sử dụng để kiểm soát nấm bệnh do *Penicillium* sp. gây ra cho cây có múi [21], nhưng lại có tác động tiêu cực lâu dài cho con người và môi trường. Như vậy, có thể ứng dụng các nano này thay thế thuốc bảo vệ thực vật trong hạn chế tác hại của nấm bệnh trong tương lai.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này nhận được sự hỗ trợ kinh phí từ nhánh số 7 thuộc hợp phần II “Nghiên cứu ứng dụng các chế phẩm nano trong trồng trọt”, MS” VAST.TĐ.NANO.02/15-18 thuộc Dự án trọng điểm cấp Viện Hàn lâm KHCVN và trang thiết bị của phòng TNTĐCNG, Viện Công nghệ Sinh học.

Tài liệu tham khảo

- [1] Shaikh N. U. and Chavan A. M. , Isolation and characterization of *Penicillium* sp. from Citrus, *International Journal of Current Research*, Vol. 9, Issue 07, (2017): 53465-53466.
- [2] Akhtar N., Tanjum T., Jabeen R., Isolation and Identification of Storage Fungi from Citrus Sampled from Major Growing areas of Punjab, Pakistan, *Int J Agric Biol*, Vol. 15, (2013): 1283–1288.
- [3] Yin G., Zhang Y., Pennerman K. K., Wu G., Hua S. S. T., Yu J., Jurick W. M. II, Guo A., Bennett J. W., Characterization of Blue Mold *Penicillium* Species Isolated from Stored Fruits Using Multiple Highly Conserved Loci, *J Fungi* ,Vol. 3, No. 1, (2017): 12.
- [4] Roduner E., Size matters: why nanomaterials are different, *Chemical Society Review*, Vol. 35, (2006): 583-592.
- [5] Jafari A., Pourakabar L., Farhadi K., Lida M. L., Goosta Y., Biological synthesis of silver nanoparticles and evaluation of antibacterial and antifungal properties of silver and copper nanoparticles, *Turkish Journal of Biology*, Vol. 39, (2015): 556-56.
- [6] Tarafdar J. C., Sharma S, Raliya R., Nanotechnology: Interdisciplinary science of applications, *Afr J Biotechnol*, Vol. 12, (2013):219-226.
- [7] Stoimenov P. K., Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents, *Langmuir*, Vol. 18, (2002):6679-86
- [8] Gavanji S., The effects of silver Nano particles on microorganisms: A review, *Applied Science Reports*, Vol. 1, No. 2, (2013): 50-56.
- [9] Pitt J. I., Laboratory guide to common *Penicillium* species, *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. Food Research laboratory* (1991), N.S.W. Australia.
- [10] Frisvad J. C. and Samson R. A., Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins, *Studies in Mycology*, Vol. 49, (2004): 1-174.
- [11] El-Gali Z. I., Control of *Penicillium digitatum* on Orange Fruits with Calcium Chloride Dipping, *Journal of Microbiology Research and Reviews*, Vol. 2, No. 6, (2014): 54-61.
- [12] Ni H-F., Yang H-R, Chen R-S., Liou R-F., Hung T-H., New Botryosphaeriaceae fruit rot of mango in Taiwan: identification and pathogenicity, *Botanical Studies* (2012), Vol. 53, (2012): 467-478.
- [13] Andrew J.M., Determination of minimum inhibitory concentrations, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Suppl S1*, Vol. 48, (2001): 5-16.
- [14] Abdel-Hafez S. I. I., Nafady N. A., Abdel-Rahim I. R., Shaltout A. M., Daro J.-A., Mohamed M. A., Assessment of protein silver nanoparticles toxicity against pathogenic *Alternaria solani*, 3 *Biotech*, Vol. 6, (2016): 199, DOI 10.1007/s13205-016-0515-6.
- [15] Kim K. J., Sung W. S., Moon S. K.; Choi J. S., Kim J. G., Lee D. G., Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes, *Journal of*

- microbiology and biotechnology*, Vol. 18, No. 8, (2008): 1482- 1484.
- [16] Kim S. W., Jung J. H., Lamsal K, Kim K. S., Min J. S, Lee Y. S., Antifungal Effects of Silver Nanoparticles (AgNPs) against Various Plant Pathogenic Fungi, *Mycobiology*, Vol. 40, No. 1, (2012): 53–58.
- [17] Mahdizadeh V., Safaie N., Khelghatibana F., Evaluation of antifungal activity of silver nanoparticles against some phytopathogenic fungi and *Trichoderma harzianum*, *J Crop Prot*, Vol. 4, No 3, (2015): 291-300.
- [18] Kanhed, P. *et al.*, *In vitro* antifungal efficacy of copper nanoparticles against selected crop pathogenic fungi, *Mat. Lett.* 115, (2014): 13-17.
- [19] Pham Van Viet, Hai Thi Nguyen, Thi Minh Cao, and Le Van Hieu, *Fusarium* Antifungal Activities of Copper Nanoparticles Synthesized by a Chemical Reduction Method, *Journal of Nanomaterials*, Volume 2016, (2016).
- [20] Chen P. S., Peng Y. H., Chung W. C., Chung K. R., Huang H. C. and Huang J. W., Inhibition of *Penicillium digitatum* and Citrus Green Mold by Volatile Compounds Produced by Enterobacter cloacae, *J Plant Pathol Microbiol*, (2016) 7:339.
- [21] Cunningham N. M.& Taverner P. D., Efficacy of integrated postharvest treatments against mixed inoculations of *Penicillium digitatum* and *geotrichum citriaurantii* in ‘leng’ navel oranges (citrus sinensis), *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, Vol. 35, No. 2, (2007), 187-192.

Potential Applications of Silver and Copper Nanoparticles for the Control of *Penicillium digitatum* Causing Green Mould Disease on Orange Fruits in Vietnam

Nguyen Vu Mai Linh, Phan Thi Hong Thao,
Nguyen Van Hieu, Nguyen Thi Hong Lien

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

Abstract: *Penicillium digitatum* is a major pathogen of post-harvest decay on orange fruits. In Vietnam, the control of *P. digitatum* is usually done mostly with use of chemicals which adversely affect on local environment and human health. Recently, nanomaterials show significant effectiveness in treating pathogenic fungi without harming the environment and human health. Therefore, nanomaterials are regarded as promising agents in plant protection and post-harvest processing. In this study, a fungus labeled as N11 causing green mould disease was isolated from decayed orange fruits of Tuyen Quang province and identified as *Penicillium digitatum* N11. The fungus was subjected to treatment with silver and copper nanoparticles and nano composites to evaluate the effectiveness of those materials on inhibition of fungal growth. Various concentrations of the nanoparticles were tested for different growth stages of the fungus. For silver and copper nanoparticles, the inhibition of fungal growth up to 50% was observed after 21 days of inoculation at the concentrations of 200 - 400 ppm and 250 ppm, respectively. At 500 ppm, copper nanoparticles completely inhibited the growth of *P. digitatum* N11. Nano composite Ag-silica (AgS) showed stronger inhibition of fungal growth than Ag-Bentonite (AgB) nano composite. In the treatment of fungal spores, inhibition of germination up to 90% for three days was observed at the concentrations of 1000 ppm for Cu, over 200 ppm for Ag nanoparticles, over 2000 ppm of AgS nano composite and 4000 ppm of AgB nano composite.

Keywords: Orange fruits, *Penicillium digitatum*, Ag nanoparticles, Cu nanoparticles, MIC.