

## KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM *ASPERGILLUS NIGER* N2 TRÊN HÀNH TĂM SAU THU HOẠCH CỦA NANOCHITOSAN ĐƯỢC TẠO RA BẰNG PHƯƠNG PHÁP GEL IONIC KẾT HỢP SÓNG SIÊU ÂM

Lê Thanh Long<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Kim Uyên<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thị Thủy Tiên<sup>1</sup>, Lê Đại Vương<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Nông lâm, Đại học Huế;

<sup>2</sup>Trường Cao đẳng Công nghiệp Huế

\*Liên hệ email: [lethanlong@huaf.edu.vn](mailto:lethanlong@huaf.edu.vn)

### TÓM TẮT

Nghiên cứu đã khảo sát khả năng kháng nấm *Aspergillus niger* N2 gây bệnh thối mốc đen hại hành tằm sau thu hoạch của nanochitosan tạo ra bằng phương pháp gel ionic kết hợp sóng siêu âm ở các điều kiện *in vitro* và *in vivo*. Kết quả nghiên cứu chứng minh rằng nanochitosan có khả năng hạn chế sự sinh trưởng và phát triển của nấm *A. niger* N2 trên môi trường PDA và PDB. Nồng độ 0,4% và 0,2% nanochitosan ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của nấm *A. niger* N2 tương ứng trên môi trường PDA và PDB. Hiệu lực ức chế 50% và 90% đường kính tán nấm, sinh khối khô đạt được tương ứng với các nồng độ nanochitosan 0,1% và 0,26%, 0,1% và 0,18%. Ở điều kiện *in vivo*, dung dịch 0,2% nanochitosan có khả năng ức chế 100% sự phát triển gây bệnh của *A. niger* N2 trên hạt hành tằm sau 15 ngày ở 28°C. Trong khi, dung dịch 0,1% nanochitosan có khả năng khống chế 80,18% tỷ lệ nhiễm bệnh trên hạt hành tằm, giá trị MIC<sub>50</sub> và MIC<sub>90</sub> tương ứng là 0,04% và 0,15%.

**Từ khóa:** *Aspergillus niger*, bệnh thối mốc đen, hành tằm, nanochitosan.

Nhận bài: 31/1/2019

Hoàn thành phản biện: 20/2/2019

Chấp nhận bài: 28/2/2019

### 1. MỞ ĐẦU

Hành tằm (*Allium schoenoprasum*) là một trong những loại rau gia vị có giá trị dược liệu và kinh tế cao, tuy nhiên hành tằm sau thu hoạch chủ yếu bảo quản bằng phương pháp truyền thống chưa hạn chế được hư hỏng do nấm bệnh gây ra. Trong đó, bệnh thối mốc đen (thối củ) do nấm *Aspergillus niger* là bệnh thường gặp và gây tổn thất lớn trên hành tằm sau thu hoạch (Rabinowitch và Currah, 2002).

Bệnh thối mốc đen sau thu hoạch thường xâm nhiễm từ hạt giống, đất trước thu hoạch và phát triển mạnh trên củ hành tằm khi bảo quản ở nhiệt độ trên 30°C với độ ẩm trên 80%. Để khống chế bệnh thối mốc đen phát triển trên hành tằm sau thu hoạch, ngoài việc làm sạch bề mặt, hạn chế tổn thương, duy trì nhiệt độ thấp dưới 15°C và độ ẩm thấp, thì việc xử lý bằng các loại hoá chất diệt nấm như SO<sub>2</sub>, Benomyl thường được áp dụng (Brewster, 2008). Mặc dù việc sử dụng hóa chất rất có hiệu quả và dễ áp dụng nhưng việc lạm dụng chúng đã gây ra tình trạng ô nhiễm môi trường. Thêm vào đó, yêu cầu ngày càng cao về chất lượng vệ sinh an toàn thực phẩm với các quy định khắt khe về dư lượng thuốc hoá học khiến phương pháp kiểm soát bệnh sau thu hoạch bằng hóa chất không được khuyến khích áp dụng.

Chitosan, một polymer tự nhiên không độc hại, dễ phân huỷ với những hoạt tính sinh học hữu ích trong bảo vệ thực vật như kháng khuẩn, kháng nấm nhưng chỉ hoà tan trong acid tạo dung dịch có độ nhớt cao nên khả năng ứng dụng còn nhiều hạn chế (Badawy và Rabea, 2011). Khác với chitosan, chitosan ở dạng nano (nanochitosan) có kích thước nanomet, được tạo ra bằng các phương pháp khác nhau, phân tán tốt trong nước, có diện tích và điện tích bề

mặt lớn hơn nên có hoạt tính kháng nấm vượt trội hơn nhiều so với chitosan (Zahid và cs., 2012). Mặc dù được xem như một polymer có hoạt tính sinh học mạnh, có khả năng kháng nấm, kháng khuẩn nhưng việc sử dụng nanochitosan trong kháng bệnh thối mốc đen trên hành tím chưa được nghiên cứu một cách đầy đủ. Kết quả bước đầu của chúng tôi cho thấy, nanochitosan được tạo ra bằng phương pháp tạo gel ionic có kích thước khá nhỏ, hiệu quả đáng kể trong kháng nấm *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani* gây bệnh thán thư và thối quả trên cà chua (Nguyễn Cao Cường và cs., 2014; Nguyễn Thị Thuý Tiên và cs., 2017), *Colletotrichum acutatum* trên ớt (Lê Thanh Long và cs., 2015). Tuy vậy, dung dịch nanochitosan được tạo ra có tính đồng nhất chưa cao, ít nhiều ảnh hưởng đến hoạt tính của chế phẩm và cảm quan màng phủ được tạo ra trên rau quả khi xử lý. Đồng thời, việc sử dụng nanochitosan trong kháng bệnh mốc đen trên hành tím là khá mới chưa được công bố.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả tạo nanochitosan bằng phương pháp gel ionic kết hợp sóng siêu âm đồng thời khảo sát khả năng kháng nấm *A. niger* N2 gây bệnh thối mốc đen trên hành tím sau thu hoạch của nanochitosan ở điều kiện *in vitro* và *in vivo*.

## 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Hành tím được thu thập tại chợ đầu mối rau quả thành phố Huế với mẫu hành tím có vết bệnh thối mốc đen điển hình để phân lập. Mẫu thí nghiệm khác được lựa chọn đồng đều về màu sắc, kích thước, không bị tổn thương cơ học hay nhiễm bệnh.

Chitosan thương mại đạt chất lượng sử dụng cho thực phẩm do Công ty TNHH Hùng Tiến, Tp Cần Thơ cung cấp với độ deacetyl (DD): 85 - 90%, cặn tro không tan trong HCl: 0,1%.

### 2.2. Phương pháp thí nghiệm

#### 2.2.1. Phương pháp chuẩn bị chế phẩm nanochitosan

Nanochitosan được chuẩn bị từ chitosan theo phương pháp gel ionic của Tang và cs., (2007) với một vài điều chỉnh. Dung dịch chitosan (pha trong acid acetic 1%) với các nồng độ 0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1; 1,2; 1,5% được siêu âm tần số 24 kHz trong 10 phút. Nhỏ từ từ 20 mL dung dịch sodium tripolyphosphates (STPP) với các nồng độ 0,125; 0,25; 0,375; 0,5; 0,625; 0,75% lần lượt vào 40 mL dung dịch chitosan đã siêu âm, khuấy từ 1.500 v/phút và giữ ở nhiệt độ phòng trong 1 tuần. Có 3 trạng thái tạo thành: phân lớp riêng biệt, kết tủa và nhũ tương đồng nhất. Dung dịch nhũ tương đồng nhất được xác định là trạng thái nano bền (Balcerzak và cs., 2013). Hạt nanochitosan được chụp bằng kính hiển vi điện tử quét FE-SEM S4800.

#### 2.2.2. Phân lập, định danh loài nấm *A. niger* gây bệnh thối mốc đen trên hành tím

Môi trường PDA được dùng để phân lập nấm mốc từ hành tím. Dựa vào hình thái, màu sắc khuẩn lạc, đặc điểm bào tử khi soi dưới kính hiển vi so với chủng đối chứng, sơ bộ tuyển chọn ra loài nấm mốc nghi ngờ là *A. niger*. Chủng này được định danh bằng phương pháp khuếch đại (PCR), giải trình tự gene mã hoá 28S rRNA và tra cứu bằng công cụ BLAST.

#### 2.2.3. Ảnh hưởng của nanochitosan đến sự phát triển của *A. niger* N2 trên môi trường PDA

Môi trường PDA tiệt trùng có chứa các nồng độ nanochitosan khảo sát (0% (đối chứng), 0,025%, 0,05%, 0,1%, 0,2% và 0,4%) được phân phối vào các đĩa Petri đường kính 6 cm (10 mL/đĩa), 3 lần lặp lại ở mỗi công thức. Tán nấm có đường kính 2 mm cắt từ rìa đĩa khuẩn lạc nấm *A. niger* thuần chủng (nuôi 7 ngày ở 28°C) được đặt vào tâm các đĩa môi trường

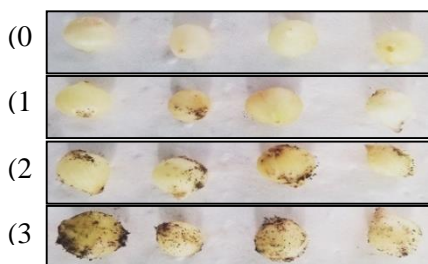
đã chuẩn bị sẵn, nuôi ở 28°C. Theo dõi và đo đường kính tản nấm (ĐKTN), 2 ngày/lần bằng thước kẹp điện tử. Hiệu lực ức chế được tính theo tỷ lệ phần trăm (%) ức chế sự phát triển của đường kính tản nấm, PIRG (%) (Percentage Inhibition of Radial Growth); Hiệu lực ức chế 50% và 90% (MIC\_Minimum Inhibitory Concentration) được tính theo phương trình tương quan giữa nồng độ nanochitosan và hiệu lực ức chế trong khoảng nồng độ khảo sát (Al-Hetar và cs., 2011).

#### 2.2.4. Ảnh hưởng của nanochitosan đến sinh khối sợi nấm *A. niger* N2 trên môi trường PDB

Cắt tản nấm có đường kính 2 mm từ mép rìa của khuẩn lạc nấm *C. niger* N2 đặt vào giữa các đĩa Petri có chứa 4 mL môi trường PDB với các nồng độ nanochitosan cần khảo sát (0 g/L (đối chứng), 0,025%, 0,05%, 0,1% và 0,2%), mỗi nồng độ lặp lại 3 lần. Sinh khối khô của sợi nấm được xác định sau khi nuôi ở 28°C trong 7 ngày bằng cách lọc qua giấy lọc và sấy ở 55°C cho đến khối lượng không đổi. Xác định hiệu lực ức chế của nanochitosan đến sinh khối nấm *A. niger* (Al-Hetar và cs., 2011).

#### 2.2.5. Xác định khả năng kháng nấm *A. niger* N2 của nanochitosan ở điều kiện in vivo

Mẫu hành tằm sạch bệnh được rửa bằng nước sạch, khử trùng bằng cồn 70° trong 3 phút, rửa lại bằng nước cất vô trùng và làm khô ở nhiệt độ phòng. Mẫu hành tằm đã khử trùng được lây bệnh bằng cách nhúng vào huyền phù bào tử *A. niger* N2 nồng độ 10<sup>5</sup> bào tử/mL. Để khô tự nhiên trong 2 giờ, nhúng vào các dung dịch nanochitosan có nồng độ 0% (đối chứng), 0,025%, 0,05%, 0,1% và 0,2% trong 2 phút, lặp lại 3 lần ở mỗi nồng độ khảo sát. Cho hành tằm đã lây bệnh và xử lý với nanochitosan vào đĩa Petri có lót giấy giữ ẩm vô trùng, bọc bằng túi PE (có đục lỗ) và ủ ở 28°C. Sau 2 - 3 ngày bệnh hình thành, xác định tỷ lệ nhiễm bệnh 3 ngày/lần theo công thức của Zhansheng và cs., (2006).



Hình 1. Các mức nhiễm bệnh trên hành tằm.

$$DI = \frac{1xN_1 + 2xN_2 + 3xN_3}{3xN}$$

Trong đó: N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>: Lần lượt là số hạt nhiễm bệnh theo mức độ 1, 2, 3 (mức 1: nhiễm ¼ hạt, mức 2: nhiễm ½ - ¾ hạt, mức 3: nhiễm ½ - ¾ hạt). N là tổng số hạt.

#### 2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phân tích phương sai ANOVA để xác định sự sai khác giữa các giá trị trung bình, có ý nghĩa với độ tin cậy p < 0,05, sử dụng phần mềm SAS, phiên bản 9.13.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả tạo chế phẩm nanochitosan

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ chitosan và STPP đến trạng thái dung dịch nanochitosan

Nồng độ chitosan (%)	Nồng độ STPP (%)					
	0,125	0,25	0,375	0,50	0,625	0,75
0,1	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
0,3	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
0,5	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
0,8	↑↑↑	ooo	ooo	o°o	↑↑↑	↑↑↑
1,0	↑↑↑	ooo	ooo	o°o	↑↑°	↑↑↑
1,2	↑↑↑	↑↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
1,5	↑↓↓	↑↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓

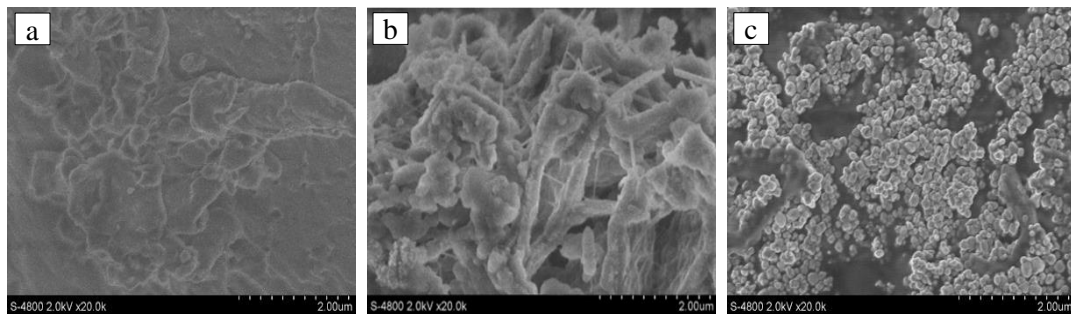
Ghi chú: ↑: phân lớp riêng biệt; ↓: kết tủa; °: nhũ tương đồng nhất

Kết quả từ Bảng 1 cho thấy, trạng thái dung dịch nanochitosan được tạo thành sau 1 tháng ở nhiệt độ phòng chỉ xuất hiện ở một vài nồng độ chitosan kết hợp với STPP. Trạng thái dung dịch nhũ tương đồng nhất bền của dung dịch nanochitosan chỉ hình thành ở khoảng nồng độ chitosan 0,8 - 1,0% kết hợp với STPP nồng độ 0,25 - 0,50% (Hình 2).



(a) Phân lớp riêng biệt; (b) Kết tủa; (c) Nhũ tương đồng nhất

**Hình 2.** Trạng thái hỗn hợp dung dịch chitosan sau 1 tuần phối trộn.



(a) Bột chitosan; (b) Chitosan hòa tan trong acetic 1%; (c) Chế phẩm nanochitosan

**Hình 3.** Ảnh chụp trên kính hiển vi điện tử quét FE-SEM của chitosan và chế phẩm nanochitosan.

Từ kết quả thu được, để tiết kiệm chi phí công thức được chọn tạo dung dịch nanochitosan khi kết hợp dung dịch chitosan nồng độ 0,8% và dung dịch STPP nồng độ 0,375%. Tiến hành làm khô và quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét phân giải cao FE-TEM các hạt nanochitosan hình cầu được tạo ra bởi phản ứng tạo gel ion có kích thước ổn định (Hình 3).

### 3.2. Kết quả phân lập và định danh nấm *A. niger*

Từ các hạt hành tằm bị bệnh đã phân lập được 2 mẫu nấm ký hiệu là N1, N2. Kết quả so sánh cho thấy mẫu N2 có mức tương đồng cao nhất về hình thái, màu sắc khuẩn lạc cũng như đặc điểm sinh bào tử với nấm *A. niger* theo quan sát của Gautam và Bhadauria (2012). Trên môi trường PDA, tản nấm xốp, sợi nấm phân nhánh mỏng dần về phía rìa tản nấm, có màu nâu đen tới đen. Bào tử phân sinh có dạng hình cầu có vách ngăn, dính lại, cành bào tử trong suốt không màu.

Mẫu nấm N2 được định danh bằng phương pháp giải trình tự một phần gen mã hoá cho tiểu phần ribosome 28S (rRNA 28S), trình tự nucleotide của nấm N2 được trình bày bên dưới.

Kết quả so sánh trình tự gen rRNA 28S của mẫu nấm N2 bằng chương trình BLAST trên NCBI cho thấy trình tự gen tương đồng 100% với mẫu *A. niger* KAML02. Kết quả này đã cho phép kết luận rằng mẫu nấm N2 là 1 chủng thuộc loài *A. niger*, ký hiệu là *A. niger* N2.

CCCCGCCCAAGACGGGATTCTCACCTCTCTGACGGCCCGTTCCAGGGCACTTAGACGGG  
 GGCCGCACCCAAAGCATCCTCTGCAAATTACAATGCGGACTCCGAAGGAGCCAGCTTTC  
 AAATTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCGGTTGGTTTCTTTTC  
 CTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTG  
 GAAAGAATGGTTGGAAAACGTCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTACAGAGCATGTGACAAA  
 GCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCCGTCCCCCG  
 GAGAGGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGG  
 ACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTC  
 ACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAA  
 CCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATTCAATCAACTCAGACTGCACGC  
 TTTCAGACAGTGTTCGTGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGCCCGGGGGGAGAGGGCGC  
 CCCCCGGCGGCCGACAAGCGGCGGGCCCGCCGAAGCAACAGGGTACAATAGACACGG  
 ATGGGAGGTTGGGCCCAAAGGACCCGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTAC  
 GGAAACCTTGTACGACTTTTACTTCTCTAAATGACCGGGTTTGACCAACTTTCGGGCTC  
 TGGGGGGTTCGTTGCCAACCCTCCTGAGCCAGT CCGAAGGCCTCACCGAGCCATCAATC

### 3.3. Ảnh hưởng của nanochitosan đến sự phát triển của *A. niger* N2 trên môi trường PDA

Ảnh hưởng của nanochitosan đến sự phát triển của *A. niger* N2 trên môi trường PDA được thể hiện qua bảng 2.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của nanochitosan đến sự sinh trưởng của *A. niger* N2 trên môi trường PDA

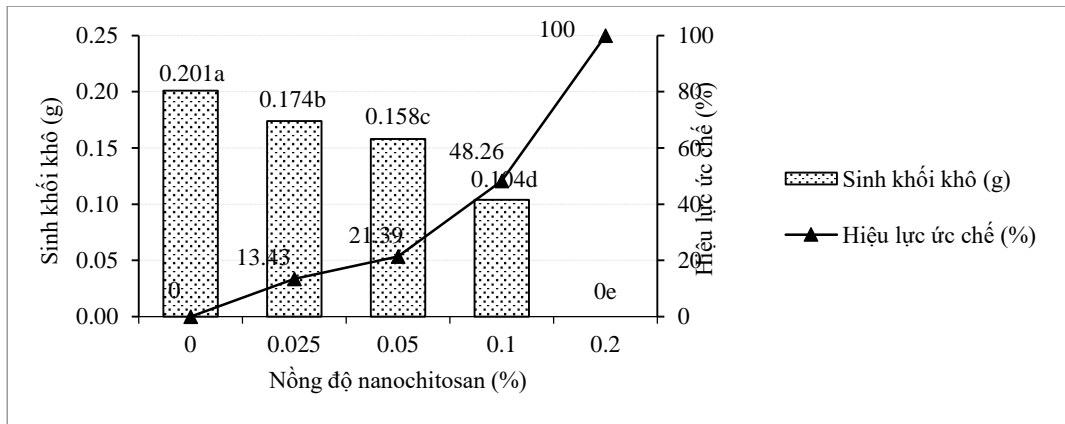
Nồng độ (%)	Đường kính tán nấm (cm)					PIGR (%) 10 ngày
	2 ngày	4 ngày	6 ngày	8 ngày	10 ngày	
0,0 (ĐC)	1,75 <sup>a</sup>	3,36 <sup>a</sup>	3,67 <sup>a</sup>	4,26 <sup>a</sup>	5,22 <sup>a</sup>	
0,025	1,42 <sup>b</sup>	2,61 <sup>b</sup>	3,24 <sup>b</sup>	3,65 <sup>b</sup>	4,14 <sup>b</sup>	20,69
0,05	1,05 <sup>c</sup>	2,24 <sup>c</sup>	2,39 <sup>c</sup>	3,34 <sup>bc</sup>	3,79 <sup>c</sup>	27,39
0,1	0 <sup>d</sup>	0,59 <sup>d</sup>	2,19 <sup>c</sup>	3,08 <sup>c</sup>	3,50 <sup>d</sup>	32,95
0,2	0 <sup>d</sup>	0 <sup>e</sup>	0,23 <sup>d</sup>	0,66 <sup>d</sup>	0,81 <sup>e</sup>	84,48
0,4	0 <sup>d</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	100

Ghi chú: Các giá trị trung bình đường kính tán nấm theo cột có cùng chữ cái in thường là không sai khác ở mức ý nghĩa  $p < 0,05$ .

Kết quả từ Bảng 2 cho thấy nanochitosan ảnh hưởng đáng kể đến sự phát triển của *A. niger* N2 ở tất cả các nồng độ khảo sát. So với ĐC, ĐKTN giảm dần khi nồng độ nanochitosan tăng lên. Sau 6 ngày, nấm mới bắt đầu phát triển ở công thức bổ sung 0,2% nanochitosan trong khi ĐKTN ở ĐC đã đạt 3,67 cm và sự sinh trưởng của nấm bị ức chế hoàn toàn ở nồng độ nanochitosan 0,4%. Sau 10 ngày, ĐKTN từ 5,22 cm (ĐC) giảm xuống còn 0,81 cm (nanochitosan 0,2%), tương ứng với hiệu lực ức chế đạt đến 84,48%. Giá trị MIC<sub>50</sub> và MIC<sub>90</sub> tương ứng là 0,1% và 0,26% ( $y = -594,37x^2 + 481,31x + 3,83$ ;  $R^2 = 0,95$ ).

### 3.4. Ảnh hưởng của nanochitosan đến phát triển sinh khối của *A. niger* N2 trên môi trường PDB

Ảnh hưởng của nanochitosan đến sự phát triển sinh khối của *A. niger* N2 sau 10 ngày nuôi trên môi trường PDB được thể hiện qua Hình 4.



**Hình 4.** Ảnh hưởng của nanochitosan đến sinh khối của nấm *A. niger* N2 và hiệu lực ức chế của chúng sau 10 ngày nuôi cấy ở 28°C.

Kết quả khảo sát cho thấy việc bổ sung nanochitosan vào môi trường PDB gây ức chế rõ rệt đến sự phát triển sinh khối của nấm *A. niger* N2 và tác dụng mạnh hơn so với môi trường PDA. Sau 10 ngày nuôi cấy, khối lượng khô của nấm thu được tỷ lệ nghịch với nồng độ nanochitosan trong môi trường. Khối lượng khô của nấm giảm gần một nửa ở nồng độ 0,1% và 100% ở nồng độ 0,2% so với ĐC. Hiệu lực ức chế của nanochitosan tới sự phát triển sinh khối của nấm thấp nhất ở nồng độ 0,025% (13,43%) và đạt 100% ở nồng độ 0,2%. Giá trị MIC<sub>50</sub> và MIC<sub>90</sub> tương ứng là 0,1% và 0,18% ( $y = 504,63x - 1,54$  ;  $R^2 = 0,98$ ).

**3.5. Ảnh hưởng của nanochitosan đến tỷ lệ nhiễm bệnh thối mốc đen do nấm *A. niger* N2 trên hành tằm ở điều kiện *in vivo***

Khả năng ức chế sự phát triển bệnh thối mốc đen do nấm *A. niger* N2 của nanochitosan trên hành tằm được thể hiện thông qua tỷ lệ nhiễm bệnh (DI) (bảng 3). Kết quả cho thấy, tỷ lệ nhiễm bệnh bằng lây nhiễm nhân tạo trên hành tằm chịu ảnh hưởng đáng kể của xử lý tạo màng bởi dung dịch nanochitosan ở các nồng độ khác nhau. Tỷ lệ nhiễm bệnh do nấm *A. niger* N2 gây trên hành tằm giảm dần theo chiều tăng của nồng độ nanochitosan xử lý. Sau 15 ngày quan sát, tỷ lệ nhiễm bệnh ở mẫu ĐC đạt tới 84,44% cao gấp 4,22 lần so với công thức 0,1%. Trong khi đó, bệnh không xuất hiện ở nồng độ xử lý nanochitosan 0,2% (hình 5). Giá trị MIC<sub>50</sub> và MIC<sub>90</sub> tương ứng là 0,04% và 0,15% ( $y = 28,91\ln(x) + 145,53$  ;  $R^2 = 0,97$ ).

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của nanochitosan đến tỷ lệ nhiễm bệnh thối mốc đen do nấm *A. niger* N2 trên hành tằm

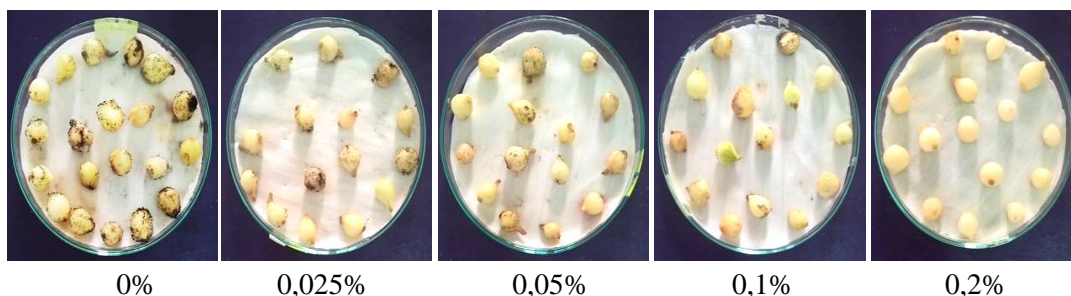
Nồng độ (%)	DI (%)					PIGR (%)
	3 ngày	6 ngày	9 ngày	12 ngày	15 ngày	15 ngày
0,0 (ĐC)	16,30 <sup>a</sup>	31,85 <sup>a</sup>	48,15 <sup>a</sup>	75,56 <sup>a</sup>	84,44 <sup>a</sup>	
0,025	10,37 <sup>b</sup>	18,52 <sup>b</sup>	31,11 <sup>b</sup>	40,01 <sup>b</sup>	48,89 <sup>b</sup>	42,1
0,05	5,19 <sup>c</sup>	11,11 <sup>c</sup>	20,02 <sup>c</sup>	29,63 <sup>c</sup>	39,26 <sup>c</sup>	53,51
0,1	0,74 <sup>d</sup>	5,93 <sup>d</sup>	10,37 <sup>d</sup>	14,82 <sup>d</sup>	16,74 <sup>d</sup>	80,18
0,2	0 <sup>d</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	100

Ghi chú: Các giá trị trung bình tỷ lệ nhiễm bệnh theo cột có cùng chữ cái in thường là không sai khác ở mức ý nghĩa  $p < 0,05$ .

Nanochitosan được tạo ra từ chitosan bằng phương pháp gel ionic với STPP thường được lựa chọn do dễ thực hiện với kích thước hạt nhỏ, phân bố đồng đều và điện thế hạt nano

cao (Grenha, 2012). Tuy nhiên, trạng thái nano thường không ổn định và phụ thuộc lớn vào nồng độ chitosan, tỷ lệ STPP/chitosan và khối lượng phân tử chitosan (Helene và cs., 2012; Nguyễn Cao Cường và cs., 2014). Kết quả của chúng tôi cho thấy, nanochitosan được tạo ra từ dung dịch chitosan có tương tác của sóng siêu âm ở tần số 24 kHz trong 10 phút cho trạng thái dung dịch nhũ tương đồng nhất (trạng thái nanochitosan) bền sau 1 tháng theo dõi ở điều kiện thường. Rõ ràng dưới tác dụng của sóng siêu âm ở tần số cao, cấu trúc phân tử mạch chitosan đã bị ảnh hưởng theo hướng giảm kích thước và làm bền hạt nano hình thành khi tạo gel ionic với STPP (Yavuz và cs., 2014). Sự khác biệt về độ bền dung dịch nanochitosan còn có thể được giải thích do sự khác nhau về loại chitosan sử dụng (độ tinh sạch, khối lượng phân tử, mức độ DD), tác nhân tạo nối STPP hoặc do sự khác nhau về phương pháp đông khô (freeze-drying) khi thu hồi hạt nanochitosan.

Hiệu quả ức chế của chitosan và dẫn xuất nanochitosan tới sự sinh trưởng của nấm nấm, hình thành sinh khối của nấm gây bệnh sau thu hoạch ở điều kiện *in vitro* trên quả cà chua, chuối, đu đủ và thanh long đã được công bố (Munoz và cs, 2009; Zahid và cs, 2012; Mustafa và cs, 2013). Nanochitosan được tạo ra bằng phương pháp tạo gel ionic của chúng tôi cũng đã được khẳng định hiệu quả đáng kể trong kháng nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên cà chua (Nguyễn Cao Cường và cs., 2014) và *Colletotrichum acutatum* trên ớt (Lê Thanh Long và cs., 2015). Các nghiên cứu trên cho thấy chitosan và nanochitosan đều có tác dụng ức chế đáng kể các đối tượng nấm bệnh khác nhau trong khoảng nồng độ 0,5 - 2%, đồng thời nanochitosan với các kích thước hạt khác nhau đều có hiệu quả ức chế phát triển nấm bệnh tốt hơn so với chitosan thông thường. Cơ chế tác dụng của chitosan và nanochitosan lên các loại nấm bệnh cũng đã được đánh giá ở các mức độ khác nhau và được giải thích theo cơ chế tương tác trực tiếp của nhóm  $\text{NH}_3^+$  có trong cấu trúc chitosan lên bề mặt màng tế bào nấm (hình thành các phức polyelectrolyte giữa chitosan với nhóm điện tích âm trên bề mặt tế bào) gây rò rỉ, thay đổi vật chất bên trong tế bào (tính thấm thay đổi, co rút nguyên sinh chất). Ngoài ra chitosan và dẫn xuất nanochitosan có thể gây tổn thương trực tiếp màng tế bào, ảnh hưởng đến tính toàn vẹn của tế bào gây ức chế phát triển nấm (Hernandez và cs., 2011; Zahid và cs., 2012). Như vậy, kết quả kháng nấm *A. niger* N2 trên hành tím của chúng tôi bằng chế phẩm nanochitosan thu được ở điều kiện *in vitro* là phù hợp với các nghiên cứu khả năng kháng nấm của chitosan và nanochitosan của các tác giả đã công bố ở trên.



**Hình 5.** Ảnh hưởng xử lý nanochitosan đến sự phát triển bệnh thối mốc đen do *A. niger* N2 trên hành tím sau 15 ngày bảo quản ở 28°C.

Ở điều kiện *in vivo*, chitosan và dẫn xuất nanochitosan cũng đã được khảo sát khả năng kháng các loại nấm bệnh khác nhau trên rau quả (Zahid và cs., 2012). Kết quả nghiên cứu chứng tỏ xử lý nanochitosan có tác dụng ức chế rõ rệt sự phát triển bệnh thối mốc đen do

nấm *A. niger* N2 trên hành tím thông qua tỷ lệ nhiễm bệnh. Tuy nhiên, khác với sự sinh trưởng và phát triển bệnh do nấm được lây nhân tạo từ các vết tổn thương trên quả, tác dụng ức chế phát triển bào tử nấm *A. niger* N2 trên bề mặt hành tím của nanochitosan mạnh hơn so với điều kiện *in vitro*. Kết quả cũng cho thấy dung dịch nanochitosan có khả năng tạo ra một lớp màng bán thấm, có tác dụng điều hòa sự trao đổi khí, giảm quá trình thoát hơi nước và làm chậm quá trình chín (không được trình bày). Bên cạnh đó, ngoài tác dụng trực tiếp lên bề mặt tế bào nấm, chitosan còn có tác dụng như một chất kích kháng ngoại bào, có thể tạo ra sức đề kháng ở vật chủ (hạt) bằng cơ chế kích thích tăng cường sinh tổng hợp một số enzyme phòng vệ như chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) (Asgar và cs., 2012). Tuy vậy, do không tiếp xúc nhanh (qua lớp vỏ lụa trên hạt hành tím) với môi trường dinh dưỡng tối thích ở hạt hành tím sau thu hoạch, nấm *A. niger* N2 phát triển chậm hơn trên bề mặt hạt, tác dụng ức chế của nanochitosan tốt hơn so với điều kiện *in vitro* có thể được lý giải.

#### 4. KẾT LUẬN

Nanochitosan được tạo ra bằng phương pháp gel ionic có khả năng ức chế mạnh mẽ đến sự sinh trưởng của tản nấm, sự phát triển sinh khối của nấm *A. niger* N2 cũng như hạn chế sự phát triển, gây hại của nấm trên hạt hành tím. Nồng độ 0,4% và 0,2% nanochitosan có khả năng ức chế hoàn toàn sự phát triển của nấm *A. niger* N2 tương ứng ở điều kiện *in vitro* và *in vivo*. Có thể hạn chế 50% mức độ nhiễm bệnh trên hạt trong trường hợp hành tím bị bệnh mốc đen tấn công khi xử lý hành tím với dung dịch nanochitosan 0,04%.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

##### 1. Tài liệu tiếng Việt

Nguyễn Cao Cường, Lê Thanh Long, Nguyễn Thị Thủy Tiên, Trần Bích Lam. (2014). Nghiên cứu ứng dụng nanochitosan trong phòng trừ bệnh thán thư hại ớt sau thu hoạch. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, ĐH Bách Khoa HCM*, 52(5C), 222-228.

Lê Thanh Long, Nguyễn Thị Nga, Nguyễn Cao Cường, Trần Ngọc Khiêm, Nguyễn Thị Thủy Tiên. (2015). Khả năng ức chế của nanochitosan đối với *Colletotrichum acutatum* L2 gây hại quả cà chua sau thu hoạch. *Tạp chí Khoa học và Phát triển, Học viện Nông nghiệp VN*, 13(8), 1481-1487.

Nguyễn Thị Thủy Tiên, Lê Thanh Long, Nguyễn Hiền Trang, Trần Thị Thu Hà, Nguyễn Cao Cường. (2017). Khả năng kháng nấm *Fusarium solani* gây thối quả cà chua sau thu hoạch của nanochitosan. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế*, 3(4), 65-72.

##### 2. Tài liệu tiếng nước ngoài

Al-Hetar, M. Y., Zainal, A. M. A., Sariah, M., Wong, M. Y. (2010). Antifungal activity of chitosan against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. *Journal of Applied Polymer Science*, 120, 2434-2439.

Asgar A., T.M. Mahmud., Yasmeen, S. (2012). Control of anthracnose by chitosan through stimulation of defence-related enzymes in Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit. *Journal of Biology and Life Science*, 3 (1), 1-12.

Badawy, M.E.I., & Rabea, E.I. (2011). A biopolymer chitosan and Its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 1-29.

Balcerzak J., Kucharska M., & Gruchala, B. (2013). Preparation of micro and nanostructures of chitosan by ultrasonic coalescence of W/O emulsions. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, 18(18), 13-20.



- Brewster, J. L. (2008). Onions and Other Vegetable Alliums. *CABI Publishing*.
- Gautam, A.K., & Bhaduria, R. (2012). Characterization of *Aspergillus* associated with commercially stored triphala powder. *African Journal of Biotechnology*, 11(104), 16814-16823.
- Grenha, A. (2012). Chitosan nanoparticles - a survey of preparation methods. *Journal of Drug Targeting*, 20(4), 291-300.
- Helene, J., Anna-Lena K., & Marianne, H. (2012). Stability of Chitosan Nanoparticles Cross-Linked with Tripolyphosphate. *Biomacromolecules*, 13, 3747-3756.
- Hernández, L.A., Valle, M.G., & Guerra-Sánchez, M.G. (2011). Current status of action mode and effect of chitosan against phytopathogens fungi. *Microbiological Research*, 5(25), 4243-4247.
- Muñoz, Z., Moret, A., & Garcés, S. (2009). Assessment of chitosan for inhibition of *Colletotrichum* sp. on tomatoes and grapes. *Crop Protection*, 28, 36-40.
- Mustafa, M.A., A. Ali., & Manickam, S. (2013). Application of a chitosan based nanoparticle formulation as an edible coating for tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). *Acta Horticulturae*, 1012, 445-452.
- Rabinowitch, H.D., & Currah, L. (2002). Allium Crop Science: Recent Advances. *CABI Publishing*.
- Tang, Z.X., Qian, J.Q., Q.Q., & Shi, L.E. (2007). Preparation of chitosan nanoparticles as carrier for immobilized enzyme. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136(1), 77-96.
- Yavuz, G., Burcu C., Nuray Y., Ayla C., & Zeki, A. (2014). Ultrasonication of chitosan nanoparticle suspension: Influence on particle size. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 462, 75-81.
- Zahid, N., Ali, A., Manickam, S., Siddiqui, Y., & Maqbool, M. (2012). Potential of chitosan-loaded nanoemulsions to control different *Colletotrichum* spp. and maintain quality of tropical fruits during cold storage. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 925 - 939.

**ANTIFUNGAL ABILITY OF NANOCHITOSAN PREPARED BY IONIC  
GELATION METHOD COMBINATING WITH ULTRASONICATION AGAINST  
*ASPERGILLUS NIGER* N2 IN POSTHARVEST CHIVES BULBS**

**Le Thanh Long<sup>1\*</sup>, Nguyen Thi Kim Uyen<sup>1</sup>,  
Nguyen Thi Thuy Tien<sup>1</sup>, Le Dai Vuong<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Hue University – University of Agriculture and Forestry;

<sup>2</sup>Hue Industrial College

\*Contact email: [lenthlong@huaf.edu.vn](mailto:lenthlong@huaf.edu.vn)

**ABSTRACT**

The study examined the antifungal effect of nanochitosan prepared by ionic gelation method combining with ultrasonication on *Aspergillus niger* N2 isolated from Black mould rot infected chives bulbs both in *in vitro* and *in vivo*. The results demonstrated that nanochitosan inhibited the growth of *A. niger* N2 on PDA and PDB media. Concentration of 0.4% and 0.2% nanochitosan completely inhibited the growth of *A. niger* N2 on PDA and PDB media, respectively. Inhibitory effect of 50% and 90% mycelial diameter and dry biomass was achieved at the nanochitosan concentration of 0.1% and 0.26%, 0.1% and 0.18%, respectively. In *in vivo*, the concentration of 0.2% nanochitosan completely inhibited the growth of *A. niger* N2 on chives bulbs after 15 days at 28°C. While, the nanochitosan of 0.1% inhibited 80.18% the infection rate of disease on chives bulbs and MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> was achieved at concentration of 0.04% and 0.15%, respectively.

**Key words:** wilt, fish mint, dried, star tea, fish mint tea bag.

*Received:* 31<sup>st</sup> January 2019

*Reviewed:* 20<sup>th</sup> February 2019

*Accepted:* 28<sup>th</sup> February 2019