



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0002426

(51) **A61K 31/722**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2020-00179

(22) 09/12/2016

(67) 1-2016-04826

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/06/2018 363A

(76) Nguyễn Đại Hải (VN)

01 Mạc Đĩnh Chi, quận 1, thành phố Hồ Chí Minh

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT HẠT NANO BẠC-CHITOSAN KẾT HỢP THUỐC TRỊ NẤM

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất hạt nano bạc-chitosan kết hợp thuốc trị nấm có chứa Zineb, Propineb, Tricyclazol và Hexaconazol với tỉ lệ nano bạc-chitosan:thuốc trị nấm = 2:1 được tạo ra theo các bước sau: (i) Tổng hợp hạt nano bạc-chitosan; và (ii) Kết hợp hạt nano bạc-chitosan với thuốc đặc trị nấm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực hoá sinh tạo chất diệt sinh học từ hợp chất hoá học, cụ thể là đề cập đến quy trình sản xuất hạt nano bạc-chitosan kết hợp thuốc trị nấm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Để phòng trị các bệnh trên cây trồng, cho đến nay việc sử dụng các loại thuốc hóa học vẫn là phổ biến. Tuy nhiên, biện pháp này vẫn còn hạn chế vì thời gian dập tắt dịch bệnh kéo dài một khi bệnh khởi thì năng suất cây trồng giảm rõ rệt. Đáng ngại hơn là việc sử dụng không ít loại thuốc hóa học kém chất lượng, đồng thời để giữ năng suất, phần lớn nông dân đã tăng nồng độ thuốc, tăng liều lượng hoặc tăng số lần phun thuốc, v.v., dẫn đến hậu quả tai hại làm tăng chi phí sản xuất song hiệu quả phòng trừ thấp, năng suất thấp, lợi nhuận thu không cao, gây ra thiệt hại lớn cho các giống cây trồng hiện đang canh tác. Nhìn chung, về lâu dài, đặc biệt ở một nước đang phát triển như nước ta, các loại hóa chất nông nghiệp không mang lại hiệu quả kinh tế cũng như không đảm bảo tính an toàn đối với môi trường.

Nano bạc-chitosan đã được tổng hợp thành công và sử dụng phổ biến cả trong nước và trên thế giới như một hợp chất kháng khuẩn và kháng vi sinh (Jing An, 2011; Carmen, 2011; Govindan, 2012; Abderahman, 2012; Pawan Kaur, 2013; Akmaz, 2013; Sang Jin Lee, 2014; Fatima, 2014; Lung Shou Wang, 2015). Patent của Hàn Quốc số 10216 002 11 59 và patent Trung Quốc số 104 94 74 18 cũng đã đề cập đến việc tổng hợp thành công nano bạc-chitosan và sử dụng làm giấy kháng khuẩn và sợi cotton kháng khuẩn. Tuy nhiên, việc sử dụng nano bạc-chitosan đơn lẻ không đem lại hiệu quả diệt khuẩn, nấm hay chống vi sinh tốt nhất, trong khi nồng độ sử dụng mỗi chất rất cao, gây ảnh hưởng lớn đến sức khỏe và môi trường. Trước thực trạng đó, việc nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học dựa trên tương tác hiệp đồng chống các bệnh do nấm gây ra của thuốc trị nấm với nano bạc-chitosan là một trong những giải pháp tích cực. Chitosan có khối lượng phân tử thấp là một sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên, an toàn và hiệu quả. Nhiều công trình

nghiên cứu đã chứng minh sản phẩm này không chỉ có hiệu ứng kích thích tăng trưởng cây trồng mà còn có tác dụng giúp cho cây trồng kháng lại sự xâm nhiễm của các vi sinh vật gây bệnh thông qua sự kích thích hệ thống miễn dịch thực vật (hiệu ứng phytoalexin). Thêm vào đó, nano bạc là một sản phẩm có hiệu lực kháng khuẩn và nấm cao với liều lượng thấp. Nghiên cứu kết hợp các hạt nano bạc-chitosan và thuốc đặc trị nấm sẽ tạo ra một sản phẩm mới vừa có khả năng tiêu diệt các vi sinh vật gây bệnh, bảo vệ cây trồng, vừa có khả năng kháng lại sự xâm nhiễm của các vi sinh vật gây bệnh thông qua hiệu ứng kháng sinh thực vật, đồng thời kích thích sự tăng trưởng của cây hồng và đặc biệt là không gây ô nhiễm môi trường. Kết quả nghiên cứu cho thấy khi kết hợp nano bạc-chitosan với thuốc trị nấm ở nồng độ thấp đã ngăn chặn sự phát triển của nấm trong khi với cùng nồng độ thuốc trên, việc ngăn chặn nấm phát triển không đạt hiệu quả mong muốn khi chỉ sử dụng thuốc trị nấm đơn thuần. Việc kết hợp cả nano bạc-chitosan với thuốc đem lại hiệu quả cao và chất lượng tốt hơn hẳn do sự tương tác hiệp đồng giữa hai chất này trong quá trình diệt nấm. Ngoài ra, việc tạo ra một loại thuốc đặc hiệu sẽ làm giảm lượng thuốc kháng sinh cũng như các loại thuốc trị nấm khác trong công tác phòng và trị bệnh. Điều này đồng nghĩa với việc giảm dư lượng trên cây trồng, tránh gây ô nhiễm môi trường, góp phần tăng năng suất, tăng chất lượng sản phẩm. Mặc dù hạt bạc-chitosan đã được nghiên cứu khá nhiều nhưng ở Việt Nam và trên thế giới chưa có công bố nào về việc hiệp đồng giữa bạc-chitosan với một loại thuốc đặc hiệu. Việc sử dụng bạc-chitosan kết hợp thuốc trị nấm để ngăn chặn sự phát triển của nấm trong nông nghiệp nói chung và trên lúa, lạc, vùng, hồ tiêu và thanh long nói riêng là nghiên cứu và thử nghiệm đầu tiên, chưa từng được thực hiện trước đây. Dựa trên nghiên cứu này, các phương pháp tiếp cận mới đối với nhiều loại kháng nấm, kháng khuẩn, kháng virus, v.v., có nhiều tiềm năng phát triển trong tương lai. Đây là một bước tiến đầy triển vọng trong nông nghiệp, góp phần làm giảm lượng thuốc trừ sâu, hạn chế tính độc hại cho sản phẩm. Hơn nữa, giảm lượng thuốc không chỉ bảo vệ sức khỏe con người, nâng cao chất lượng trái cây mà còn bảo vệ môi trường, góp phần xây dựng môi trường sống xanh, sạch và an toàn tự nhiên.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, mục đích của sáng chế là đưa ra quy trình sản xuất hạt nano bạc-chitosan kết hợp thuốc trị nấm phòng trừ bệnh trên cây lúa, lạc, vừng, hồ tiêu và thanh long nhằm góp phần giảm lượng bạc-chitosan và thuốc trị nấm sử dụng, tăng lợi nhuận và xây dựng nền nông nghiệp an toàn, bền vững.

Để đạt được mục đích nêu trên, quy trình sản xuất hạt nano bạc-chitosan kết hợp thuốc trị nấm được tạo ra qua các bước:

- (i) Tổng hợp và đánh giá hạt nano bạc-chitosan; và
- (ii) Kết hợp nano bạc-chitosan với thuốc đặc trị nấm.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 là kết quả quang phổ hồng ngoại (FT-IR) của nano bạc chitosan (a) và chitosan (b).

Hình 2 là kết quả phổ phân tích nhiễu xạ X (XRD) của nano bạc-chitosan.

Hình 3 là kết quả đo kích thước hạt (a) và biểu đồ phân bố kích thước hạt (b) của nano bạc-chitosan.

Hình 4 là kết quả thí nghiệm so sánh đường kính kháng nấm của nano bạc, nano bạc- chitosan, thuốc trị nấm Zineb và hỗn hợp nano bạc-chitosan-Zineb trên nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh đốm nâu trên thanh long.

Hình 5 là kết quả thí nghiệm so sánh đường kính kháng nấm của nano bạc (a), chitosan (b), thuốc trị nấm Antracol (c) và hỗn hợp nano bạc-chitosan-Antracol (d) trên nấm *Phytophthora* gây bệnh chết nhanh trên cây hồ tiêu.

Hình 6 là kết quả thí nghiệm so sánh đường kính kháng nấm của nano bạc (a), chitosan (b), thuốc trị nấm Trihexad (c) và hỗn hợp nano bạc-chitosan-Trihexad (d) trên nấm *Pyricularia oryzae* gây bệnh đạo ôn trên cây lúa.

Mô tả chi tiết sáng chế

Quy trình sản xuất hạt nano bạc-chitosan kết hợp thuốc trị nấm theo bản đồ quy trình sáng chế được tạo ra qua các bước: (i) Tổng hợp và đánh giá hạt nano bạc-chitosan; (ii) Kết hợp nano bạc-chitosan với thuốc đặc trị nấm; (iii) Đánh giá và so sánh khả năng diệt nấm của thành phần và hạt nano bạc-chitosan kết hợp thuốc trị nấm.

Quy trình sản xuất hạt nano bạc-chitosan kết hợp thuốc trị nấm được mô tả chi tiết như sau:

Chuẩn bị nguyên liệu gồm Chitosan (có độ de acetyl $\geq 75\%$), axit axetic (CH_3COOH), bạc nitrat (AgNO_3), natri Hydroxit (NaOH) và thuốc đặc trị nấm.

(i) Tổng hợp và đánh giá hạt nano bạc-chitosan:

Nano bạc-chitosan được chuẩn bị với phương pháp khử hóa học bằng việc sử dụng nitrat bạc với natri hydroxit. Chitosan được sử dụng đóng vai trò hỗ trợ bảo vệ nano bạc. Dung dịch chitosan hòa tan trong dung dịch axit axetic ở nhiệt độ 30-40°C với pH bằng 3,5. Sau đó, hòa tan dung dịch chitosan với 250 L dung dịch bạc nitrat (0,0029 w/w) trên máy khuấy cơ trong thời gian từ 30-45 phút. Các dung dịch muối bạc được thêm vào dung dịch chitosan bằng cách sử dụng hệ thống bơm là ống tiêm tự động. Natri hydroxit được hòa tan trong nước cất và sau đó cho vào phản ứng bằng hệ thống bơm là ống tiêm tự động. Cuối cùng, phản ứng còn lại để nguội đến nhiệt độ phòng. Nano bạc-chitosan được bảo quản ở nhiệt độ phòng. Các hạt nano bạc-chitosan được đánh giá bằng các phương pháp kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM), phương pháp phổ hồng ngoại biến đổi (FT-IR) và phương pháp nhiễu xạ tia X (XRD).

(ii) Kết hợp nano bạc-chitosan với thuốc đặc trị nấm:

Thuốc trị nấm kết hợp với hạt nano bạc-chitosan ở các tỉ lệ khác nhau bằng cách trộn lẫn với tỉ lệ nano bạc-chitosan : thuốc trị nấm = 2:1 bằng phương pháp khuấy trộn trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng.

Thuốc trị nấm được sử dụng có thành phần được chọn từ nhóm bao gồm Zineb, Propineb, Tricyclazol và Hexaconazol.

Khả năng diệt các loại nấm của từng thành phần: bạc, chitosan, bạc-chitosan và hợp chất bạc-chitosan kết hợp thuốc đặc trị được đánh giá và so sánh bằng phương pháp đĩa giấy khuếch tán.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 - Tổng hợp hạt nano bạc-chitosan

Đầu tiên, 20 kg chitosan hòa tan trong 1000 L dung dịch axit axetic (1% v/v) ở nhiệt độ 30-40°C với pH bằng 3,5. Sau đó, hòa tan dung dịch chitosan với 250 L

dung dịch bạc nitrat (0,0029 w/w) trên máy khuấy cơ trong thời gian từ 30-45 phút. Đến khi tạo thành dung dịch đồng nhất, ta thu được dung dịch bạc-chitosan. Tiếp theo, 1000 L dung dịch natri hydroxit 1M được thêm vào dung dịch bạc-chitosan bằng cách sử dụng một ống tiêm tự động để tạo hạt và duy trì phản ứng với tốc độ không đổi. Sau 15-20 phút, ta thu được hạt nano bạc-chitosan. Nano bạc-chitosan được đặt trong tủ lạnh để lượng bạc không tiếp tục giảm trong suốt quá trình bảo quản.

Sau khi thu được sản phẩm ta tiến hành kiểm tra với các phương pháp phân tích hiện đại thì cho được kết quả như sau.

Kết quả phân tích quang phổ hồng ngoại (FT-IR):

Sự tồn tại của liên kết hóa học giữa chitosan và nano bạc được thể hiện qua phổ FT-IR (Hình 1). Các đỉnh đặc trưng của nano bạc-chitosan ở 3421 cm^{-1} và chitosan ở 3424 cm^{-1} là sự hiện diện của nhóm NH- trong amin. Các liên kết ankan $-\text{CH}_2$ và $-\text{CH}_3$ thể hiện ở các mũi 2920 cm^{-1} và 2924 cm^{-1} . Liên kết C=C của các nhóm amin trong vòng thơm được thể hiện ở đỉnh 1380 cm^{-1} . Có thể thấy rằng thông qua nhóm amin tự do, protein như một chất ổn định làm giảm lượng bạc nitrat để tạo thành nano bạc trong quá trình này. Thông qua liên kết tĩnh điện, nhóm $-\text{NH}_2$ và nhóm $-\text{OH}$ của chitosan đã được kết hợp với Ag^+/Ag_0 , tạo ra các hạt nano bạc-chitosan.

Kết quả phân tích nhiễu xạ tia X (XRD):

Hình 2 minh họa mô hình nhiễu xạ tia X của nano bạc-chitosan. Đỉnh 9° chỉ ra sự hiện diện của chitosan trong hợp chất nano bạc-chitosan. Sự vắng mặt của đỉnh tại $2\theta\ 13^\circ$, 23° và 26° cho thấy chitosan đã bị deacetyl hóa. Các đỉnh ở $38,16^\circ$; $46,12^\circ$; $64,09^\circ$; $77,01^\circ$ và 86° tương ứng với sự có mặt của nano bạc trong hợp chất. Kết quả nhiễu xạ của hợp chất cho kết quả tương tự với kết quả khi đo chitosan và nano bạc tinh khiết. Điều này cho thấy không có sự thay đổi về mặt cấu trúc của nano bạc sau khi kết hợp với polyme chitosan.

Thông qua giản đồ nhiễu xạ tia X có thể xác định kích thước tinh thể của hạt khoảng 3,77 nm bằng áp dụng công thức Scherrer cho đỉnh nhiễu xạ tia X ở vị trí $2\theta = 46,5^\circ$:

$$D = (0,9\lambda)/(B\cos \theta)$$

Trong đó:

- D: kích thước hạt
- B: độ rộng bán phổ của đỉnh nhiễu xạ
- λ : 1,54056 Å
- θ : vị trí đỉnh nhiễu xạ

Kết quả đo hiển vi điện tử truyền qua (TEM):

Theo hình 3, ảnh TEM cho thấy các phân tử nano bạc-chitosan có dạng cầu, có kích thước đều nhỏ hơn 5nm. Biểu đồ phân bố kích thước hạt cho thấy các phân tử nano phân bố đều với đường kính trung bình $4,1 \pm 0,3$ nm. Hạt không tụ lại và phân bố đều cho thấy tính ổn định tốt của chitosan đã ngăn chặn tốt sự kết tụ của nano bạc trong suốt quá trình tổng hợp.

Hạt nano bạc-chitosan này được sử dụng làm nguyên liệu để nạp thuốc trị nấm trong các Ví dụ dưới đây.

Ví dụ 2 - Kết hợp nano bạc-chitosan với thuốc trị nấm Zineb Bul 80WP trị bệnh đốm nâu trên thanh long

(a) Hạt nano bạc-chitosan được nạp với thuốc trị nấm Zineb bằng cách ngâm chúng trong nước, tiếp theo khuấy liên tục trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Lượng Zineb được pha cùng dung dịch bạc-chitosan với tỉ lệ nano bạc-chitosan:Zineb = 2:1.

(b) Hợp chất được sử dụng để đánh giá khả năng diệt nấm bằng phương pháp đĩa giấy khuếch tán (giấy khuếch tán đường kính 5 mm). Phương pháp dựa theo tính nhạy cảm của nấm đối với chế phẩm sinh học. Đĩa cấy chứa môi trường thạch đã trải mầm cấy chủng nấm. Sau khi đem ủ, quan sát xung quanh đĩa để theo dõi vòng ức chế sự tăng trưởng nấm đối với chế phẩm sinh học, dựa theo đường kính của vòng để xác định mức độ nhạy cảm của chủng nấm đối với từng nồng độ của chế phẩm sinh học.

(c) Chế phẩm sinh học trị nấm được đóng chai để thuận tiện cho việc sử dụng.

Kết quả kiểm tra khả năng diệt nấm:

Bảng 1: Đường kính kháng nấm của nano bạc, nano bạc-chitosan, thuốc trị nấm Zineb và hỗn hợp nano bạc-chitosan-Zineb

Nồng độ (ppm)			Đường kính kháng nấm (mm)
Ag	CS	Zi	
1	-	-	$7,67 \pm 0,58$
2	-	-	$10,43 \pm 0,51$
5	-	-	$12,33 \pm 0,58$
10	-	-	$13,33 \pm 0,58$
1	2000	-	$7,87 \pm 1,53$
2	4000	-	$11,67 \pm 0,58$
5	10000	-	$15,00 \pm 0,00$
10	20000	-	$17,76 \pm 2,08$
-	-	500	$5,00 \pm 0,00$
-	-	1000	$5,00 \pm 0,00$
-	-	2500	$7,67 \pm 0,58$
-	-	5000	$9,00 \pm 0,00$
2	4000	500	$12,00 \pm 0,00$
2	4000	1000	$15,00 \pm 1,73$
2	4000	2500	$20,67 \pm 0,58$
2	4000	5000	$25,00 \pm 2,00$

Từ bảng 1 và hình 4, kết quả cho thấy khi chỉ sử dụng nano bạc, khả năng kháng nấm là khá thấp. Tuy nhiên, khi kết hợp Ag với chitosan (CS), khả năng diệt nấm được tăng lên đáng kể. Cụ thể là ở nồng độ 5 ppm, đường kính kháng nấm của nano bạc-chitosan là $15,00 \pm 0,00$ mm, tốt hơn khi sử dụng nano bạc ở nồng độ 10 ppm ($13,33 \pm 0,58$ mm). Đặc biệt, khi kết hợp nano bạc-chitosan với thuốc đặc trị nấm Zineb, kết quả được tăng lên nhanh chóng. Trong khi việc sử dụng Zineb ở nồng độ 500 ppm và 1000 ppm, khả năng diệt nấm hoàn toàn không thể hiện thì vùng kháng nấm của nano bạc-chitosan-Zineb tăng lên đến $12,00 \pm 0,00$ mm, gần bằng kết quả của việc sử dụng 5 ppm nano bạc ($12,33 \pm 0,58$ mm) và cao hơn nhiều lần Zineb ở nồng độ cao nhất 5000 ppm ($9,00 \pm 0,00$ mm). Sau khi hàng loạt các thí nghiệm với từng nồng độ khác nhau, nano bạc-chitosan 2 ppm là nồng độ

thấp nhất cho kết quả kháng nấm tối ưu khi kết hợp với nồng độ khác nhau của Zineb để so sánh trong nghiên cứu này.

So với khả năng diệt nấm ban đầu của mỗi thành phần riêng biệt, nấm chỉ bị diệt khi sử dụng nồng độ cao của nano bạc hoặc thuốc đặc trị nấm. Do sự kết hợp của nano bạc- chitosan, nồng độ mỗi thành phần giảm đáng kể trong khi đó kết quả kháng nấm vẫn rất tốt. Lượng bạc sử dụng đã giảm nhiều lần so với nồng độ thuốc trị nấm thực tế trong đời sống. Lượng bạc và thuốc trị nấm sử dụng giảm đem lại kết quả tốt trong việc giải quyết vấn đề gây ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng sức khỏe do dư lượng thuốc và độc tính của chất sử dụng cao. Qua đó góp phần giảm thiểu chi phí, bảo vệ sức khỏe người nông dân và người tiêu dùng, tăng năng suất và tăng chất lượng sản phẩm.

Ví dụ 3 – Kết hợp nano bạc-chitosan với thuốc Antracol 70 WP (An) trị bệnh chết nhanh trên cây tiêu

(a) Hạt nano bạc-chitosan được nạp với thuốc trị nấm Antracol 70 WP bằng cách ngâm chúng trong nước, tiếp theo khuấy liên tục trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Lượng Antracol được pha cùng dung dịch bạc-chitosan với tỉ lệ nano bạc-chitosan:Antracol = 2:1

(b) Hợp chất được sử dụng để đánh giá khả năng diệt nấm bằng phương pháp đĩa giấy khuếch tán (giấy khuếch tán đường kính 5 mm). Phương pháp dựa theo tính nhạy cảm của nấm đối với chế phẩm sinh học. Đĩa cấy chứa môi trường thạch đã trải mầm cấy chủng nấm. Sau khi đem ủ, quan sát xung quanh đĩa để theo dõi vòng ức chế sự tăng trưởng nấm đối với chế phẩm sinh học, dựa theo đường kính của vòng để xác định mức độ nhạy cảm của chủng nấm đối với từng nồng độ của chế phẩm sinh học.

(c) Chế phẩm sinh học trị nấm được đóng chai để thuận tiện cho việc sử dụng.

Kết quả kiểm tra khả năng diệt nấm *Phytophthora*:

Hình 5 cho thấy kết quả thí nghiệm so sánh đường kính kháng nấm của nano bạc, chitosan, thuốc trị nấm Antracol và hỗn hợp nano bạc-chitosan-Antracol trên nấm *Phytophthora* gây bệnh chết nhanh trên cây hồ tiêu. So sánh kết quả đường kính kháng nấm *Phytophthora*, khi sử dụng bạc, chitosan hay thuốc trị nấm riêng lẻ cho kết quả diệt nấm mức trung bình. Khi kết hợp cả ba thành phần với nồng độ các chất giảm gần 1,2 lần so với nồng độ ban đầu, lượng nấm diệt tăng lên đáng kể và rõ rệt. Cụ thể là ở nồng độ cao nhất được sử dụng, bạc chỉ diệt khoảng 13,33 mm vòng khuẩn, chitosan diệt gần 9,29 mm và ở 5000 ppm, Antracol chỉ tạo vòng khuẩn 8,71 mm. Trong khi đó, khi trong hỗn hợp tạo ra, chỉ 2 ppm kết hợp 4000 ppm CS, khả năng diệt khuẩn ở nồng độ Antracol thấp nhất vẫn tạo ra vòng nấm trên 11 mm, Tương tự khi diệt nấm đốm nâu trên thanh long, nồng độ kim loại và polyme giảm đáng kể cũng như lượng thuốc trị nấm giảm nhiều lần so với nồng độ sử dụng thực tế trong đời sống. Tiết kiệm chi phí, đảm bảo an toàn sức khỏe và đem lại hiệu quả kháng nấm cao trở thành lợi thế của hỗn hợp hạt nano bạc-chitosan khi kết hợp với thuốc đặc trị.

Ví dụ 4 - Kết hợp nano bạc-chitosan với thuốc Trihexad 700WP (Tri) trị bệnh đạo ôn trên cây lúa

(a) Hạt nano bạc-chitosan được nạp với thuốc trị nấm Trihexad 700WP bằng cách ngâm chúng trong nước, tiếp theo khuấy liên tục trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Lượng Trihexad được pha cùng dung dịch bạc-chitosan với tỉ lệ nano bạc-chitosan:Trihexad = 2:1.

(b) Hợp chất được sử dụng để đánh giá khả năng diệt nấm bằng phương pháp đĩa giấy khuếch tán (giấy khuếch tán đường kính 5 mm). Phương pháp dựa theo tính nhạy cảm của nấm đối với chế phẩm sinh học. Đĩa cấy chứa môi trường thạch đã trải mầm cấy chủng nấm. Sau khi đem ủ, quan sát xung quanh đĩa để theo dõi vòng ức chế sự tăng trưởng nấm đối với chế phẩm sinh học, dựa theo đường kính của vòng để xác định mức độ nhạy cảm của chủng nấm đối với từng nồng độ của chế phẩm sinh học.

(c) Chế phẩm sinh học trị nấm được đóng chai để thuận tiện cho việc sử dụng.

Kết quả kiểm tra khả năng diệt nấm *Pyricularia oryzae*

Hình 6 cho thấy kết quả thí nghiệm so sánh đường kính kháng nấm của nano bạc, chitosan, thuốc trị nấm Trihexad và hỗn hợp nano bạc-chitosan-Trihexad trên nấm *Pyricularia oryzae* gây bệnh đạo ôn trên cây lúa. Sự chênh lệch ở đường kính kháng nấm *Pyricularia oryzae* khi sử dụng đĩa giấy khuyếch tán cho thấy khả năng kháng bệnh vượt trội của thuốc Trihexad kết hợp với nano bạc-chitosan. Ở nồng độ cao nhất của Trihexad 1000 ppm, vòng tròn chỉ đạt 9,47 mm khi sử dụng thuốc đơn lẻ trong khi đường kính lên đến 25,80 mm với sự có mặt của nano bạc-chitosan. Bên cạnh đó, 400 ppm Trihexad tự do hầu như không thể hiện khả năng kháng nấm nhưng cùng với sự kết hợp của 2 ppm Ag và 1000 ppm CS, hợp chất nano diệt nấm đạt đường kính trung bình 11,39 mm.

Rõ ràng chitosan-bạc đã hỗ trợ và tăng cường khả năng kháng nấm lên mức tối ưu của thuốc đặc trị. Nồng độ của các thành phần riêng biệt cũng giảm đáng kể và cho kết quả không thua kém chính thành phần đó khi sử dụng ở nồng độ cao hơn nhiều lần. Sự kết hợp giữa hạt nano chitosan và thuốc đặc trị nấm giúp bảo vệ sức khỏe người nông dân, người tiêu dùng và cả môi trường sống do giảm thiểu một cách tối đa hàm lượng kim loại và thuốc trị nấm. Sự kết hợp này có tiềm năng ứng dụng rất lớn.

Những hiệu quả có thể đạt được

Nhờ có chế phẩm sinh học hạt nano bạc-chitosan kết hợp thuốc trị nấm phòng trừ bệnh, hàm lượng các loại thuốc trị nấm sử dụng giảm nhiều lần so với bình thường trong khi hiệu ứng chống nấm vẫn thể hiện kết quả tốt và mang theo rất nhiều lợi nhuận cho kinh tế nhưng không ảnh hưởng đến năng suất cây trồng. Do vậy có thể nâng cao năng suất thu hoạch, đem lại nguồn thu lớn cho người nông dân. Hơn thế nữa, giảm lượng thuốc sử dụng góp phần bảo vệ sức khỏe người nông dân, nâng cao chất lượng nông sản, đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm và góp phần bảo vệ môi trường xanh và an toàn bền vững. Chính vì lý do đó, quy trình

này cần được quan tâm như là một trong các ứng dụng mở rộng của các hạt nano chitosan- bạc có thể diệt nấm an toàn cho nông nghiệp. Đây sẽ là hướng đi rộng và đầy tiềm năng cho việc kết hợp nhiều loại thuốc trừ sâu khác nhau trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- An, Jing, et al. "Preparation and characterization of silver- chitosan nanocomposite particles with antimicrobial activity." *Journal of Applied Polymer Science* 120.6 (2011): 3180-3189.
- Rodríguez-Argüelles, M. Carmen, et al. "Chitosan and silver nanoparticles as pudding with raisins with antimicrobial properties." *Journal of colloid and interface Science* 364.1 (2011): 80-84.
- Govindan, s., et al. "Synthesis and characterization of chitosan-silver nanocomposite." *AppliedNanoscience* 2.3 (2012): 299-303.
- Abdelgawad, Abdelrahman M., Samuel M. Hudson, and Orlando J. Rojas. "Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver- NPs/polyvinyl alcohol) Systems." *Carbohydratepolymers* 100 (2014): 166-178.
- Kaur, Pawán, Ashok Choudhary, and Rajesh Thakur. "Synthesis of chitosan-silver nanocomposites and their antibacterial activity." *IntJSci EngRes* 4 (2013): 869-872.
- Akmaz, Solmaz, et al. "The effect of Ag content of the chitosan-silver nanoparticle composite material on the structure and antibacterial activity." *Advances in Materials Science and Engineering* 2013 (2013).
- Lee, Sang Jin, et al. "Electrospun chitosan nanofibers with controlled levels of silver nanoparticles. Preparation, characterization and antibacterial activity." *Carbohydrate polyme* 111(2014): 530-537.
- Ibrahim, Fatima M., et al. "Bone Repair Stimulation in Rat Mandible by New Chitosan Silver (I) Complexes." *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 63A6 (2014): 846-858.
- Wang, Lung-Shuo, et al. "Synthesis and anti-fungal effect of silver nanoparticles- chitosan composite particles." *Internationaljournal of nanomedicine* 10 (2015): 2685.

YÊU CẦU BẢO HỘ

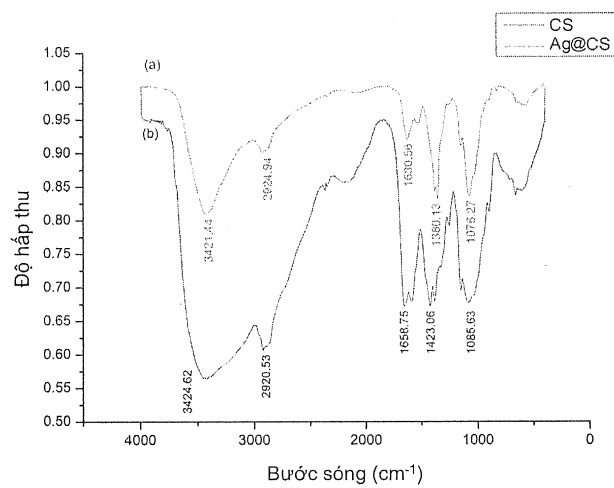
1. Quy trình sản xuất hạt nano bạc-chitosan kết hợp thuốc trị nấm bao gồm các bước:

(i) Tổng hợp hạt nano bạc-chitosan bằng cách hòa tan chitosan có độ đề axetyl $\geq 75\%$ trong dung dịch axit axetic 1% theo thể tích ở nhiệt độ từ 30°C đến 40°C và pH là 3,5; sau đó hòa tan với dung dịch bạc nitrat 0,0029% theo khối lượng từ 30 đến 45 phút; tiếp tục hòa tan với dung dịch natri hydroxit 1M bằng ống tiêm tự động để tạo hạt và duy trì phản ứng trong vòng 15 đến 20 phút để thu được hạt chitosan chứa nano bạc; và

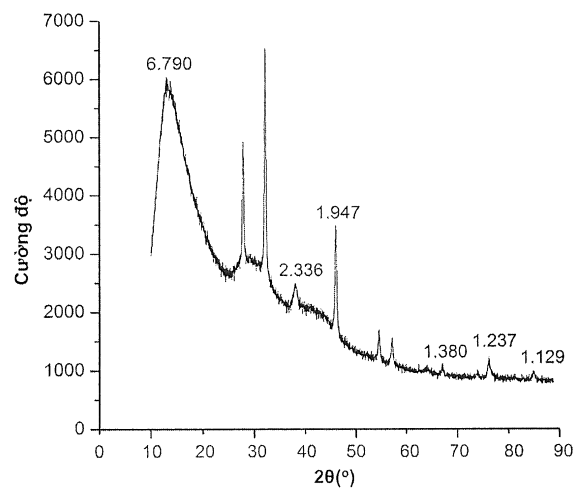
(ii) Kết hợp hạt nano bạc-chitosan với thuốc trị nấm bằng cách khuấy trộn với thuốc trị nấm theo tỉ lệ 2:1 trong vòng 24 giờ ở nhiệt độ phòng.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó thuốc trị nấm có thành phần được chọn từ nhóm bao gồm Zineb, Propineb, Tricyclazol và Hexaconazol.

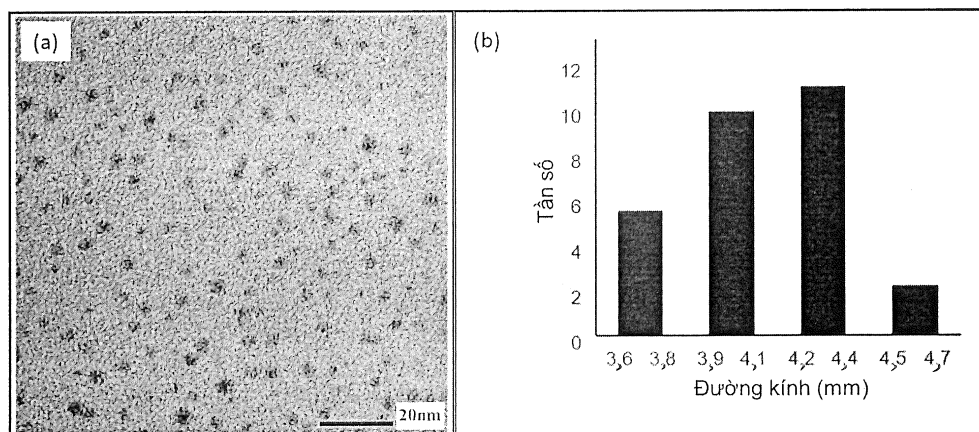
Hình 1



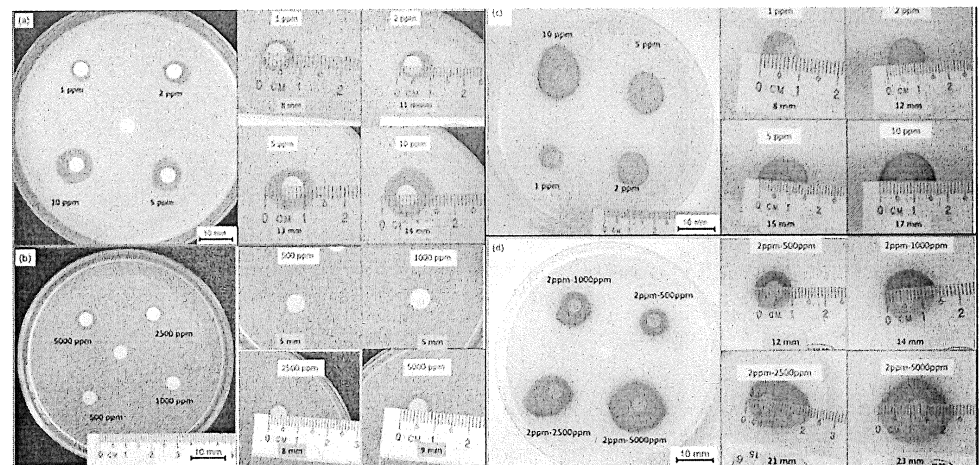
Hình 2



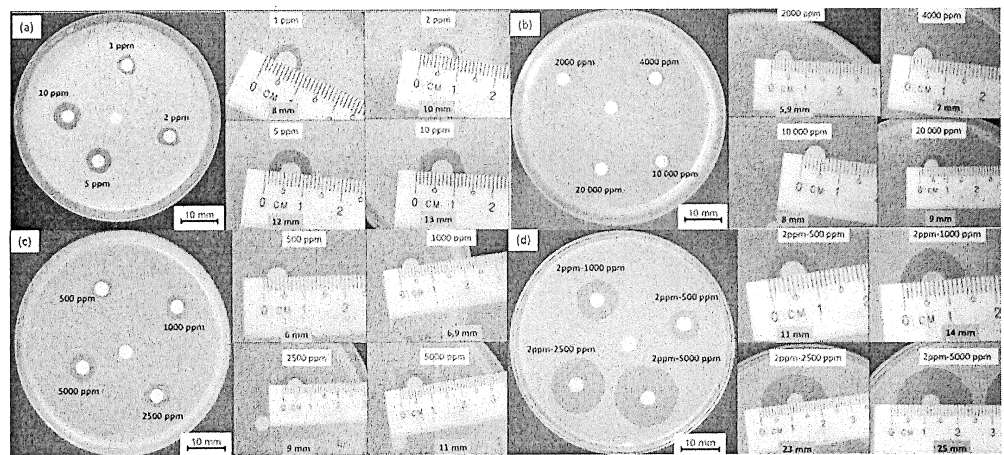
Hình 3



Hình 4



Hình 5



Hình 6

