

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ ĐẾN QUÁ TRÌNH TỔNG HỢP NANO BẠC BẰNG *TRICHODERMA ASPERELLUM*

Nhận bài:

27 – 08 – 2019

Chấp nhận đăng:

01 – 10 – 2019

<http://jshe.ued.udn.vn/>

Nguyễn Phúc Quân^{a*}, Ngô Anh Thy^b, Nguyễn Minh Lý^b, Trần Công Khánh^c

Tóm tắt: Tổng hợp nano bạc (AgNPs) bằng phương pháp sinh học có nhiều ưu điểm so với các phương pháp tổng hợp hóa học và vật lý, đặc biệt là tính thân thiện với môi trường và đang được chú trọng nghiên cứu trên thế giới. Nghiên cứu đã trình bày kết quả đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng tổng hợp AgNPs từ 2 chủng vi nấm *Trichoderma asperellum*. Kết quả cho thấy, AgNPs được tổng hợp có kích thước trong khoảng 2-7 nm. Bổ sung citric acid với nồng độ 10 g/l vào giai đoạn ủ sinh khối vi nấm và nước cất cho phép tăng hiệu suất tổng hợp AgNPs lên đến 1,8 lần. Lắc hỗn hợp dịch lọc và AgNO₃ với tốc độ 140 vòng/phút trong 120 giờ không ảnh hưởng đến hiệu quả tổng hợp AgNPs. Dịch AgNPs tổng hợp từ chủng *T. asperellum* r1 có khả năng ức chế sự sinh trưởng cao nhất đối với các chủng vi sinh vật gây bệnh *E. coli* và *R. solanacearum*.

Từ khóa: nano bạc; *Trichoderma asperellum*; *R. solanacearum*; tổng hợp nano bạc.

1. Đặt vấn đề

Hiện nay, nano bạc (AgNPs) đang được sử dụng tương đối rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khoa học khác nhau của đời sống như y học, nông nghiệp, môi trường, điện tử vì những đặc tính hóa lí và sinh học đặc biệt của nó (Song and Kim, 2008; Elamawi et al., 2018). Quá trình tổng hợp AgNPs có thể thực hiện được thông qua phương pháp vật lý, hóa học và sinh học. Phương pháp vật lý thường có hiệu suất thấp, trong khi đó phương pháp hóa học và đòi hỏi chi phí cao, trang thiết bị hiện đại cùng những điều kiện phức tạp khác, đặc biệt là tiềm ẩn nguy cơ gây ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng đến sức khỏe con người (Wang et al., 2007). Trong những năm gần đây, trên thế giới đã phát triển phương pháp tổng hợp nano bạc xanh, thân thiện với môi trường có hiệu suất cao bằng với chi phí thấp bằng cách sử dụng các hệ thống sinh học (Mukherjee, 2008; Roy, 2013).

Cho đến nay đã có nhiều công bố về việc nghiên

cứ và ứng dụng thực vật, tảo, vi khuẩn, vi nấm để tổng hợp các loại vật liệu nano bao gồm nano bạc, nano vàng, nano đồng (Sastry, 2003; Agarwal, 2019; Aritonang, 2019). Trong đó đã có rất nhiều nghiên cứu của nhiều tác giả trên thế giới về ứng dụng vi nấm, đặc biệt là chi *Trichoderma* sp. trong tổng hợp AgNPs do có nhiều lợi thế hơn các đối tượng khác về sự đơn giản của kỹ thuật nuôi cấy, hiệu suất thu sinh khối cao, khả năng sinh trưởng và phát triển ở hàm lượng kim loại cao, số lượng các chất và enzyme chuyển hóa chuyển hóa tạo AgNPs cao (Guilger-Casagrande et al., 2019; Guilger-Casagrande and Lima 2019).

Ở nấm *Trichoderma* sp. việc tổng hợp AgNPs đã nghiên cứu thành công ở 5 loài khác nhau bao gồm *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. pseudokoningii* và *T. virens*; (Devi, 2013; Guilger-Casagrande et al., 2019). Các nghiên cứu cũng cho thấy, đặc điểm vật lý, hóa học và hoạt tính sinh học của AgNPs cũng thay đổi tùy thuộc vào loài nấm được sử dụng; điều kiện nuôi cấy nấm bao gồm nhiệt độ, độ pH, các chất kích kháng, điều kiện ủ sinh khối với dung dịch AgNO₃ (Guilger-Casagrande and Lima 2019). Mukherjee P. và cs (2008) đã tổng hợp được AgNPs có đường kính 13 - 18 nm khi sử dụng dịch lọc sinh khối *T. asperellum* với dung dịch AgNO₃, trong khi đó đường kính AgNPs

^aTrung tâm Quốc gia nghiên cứu phát triển sâm Ngọc Linh

^bTrường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng

^cTrường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học quốc gia TP. Hồ Chí Minh

* Tác giả liên hệ

Nguyễn Phúc Quân

Email: phucquan95@ued.udn.vn

thu được từ loài *T. viride* là 2-4 nm và từ *T. harzianum* là 88-183 nm (Fayaz, 2010; Guilger-Casagrande et al., 2019). El-Moslamy và cs (2017) đã chỉ ra khi tăng lượng glucose trong một giới hạn nhất định thì lượng sinh khối và lượng nano bạc cũng tăng đối với loài *T. harzianum*. Ngoài ra, quá trình tổng hợp AgNPs ở loài *T. harzianum* cũng chịu ảnh hưởng của nhiệt độ ủ với dung dịch dung dịch AgNO₃, hiệu suất tổng hợp tối ưu thu được ở nhiệt độ 40°C (Ahluwalia et al., 2014).

Như vậy, việc tiếp tục đánh giá ảnh hưởng của các chất kích kháng và điều kiện tổng hợp sẽ cho phép nâng cao hiệu suất và hiệu quả của AgNPs thu được.

2. Vật liệu phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Trong nghiên cứu đã sử dụng hai chủng *T. asperellum* r1 và *T. asperellum* r2 được cung cấp bởi Khoa Sinh Môi trường, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng.

2.1. Phương pháp

Thu sinh khối các chủng vi sinh vật. Các chủng vi sinh vật được nuôi cấy trong môi trường Czapek Dox lỏng có chứa (g/L) 7,0 g/L KH₂PO₄; 2,0 g/L K₂HPO₄; 0,1 g/L MgSO₄.7H₂O; 1,0 g/L (NH₂)SO₄; 0,6 g/L yeast extract; 10,0 g/L glucose ở nhiệt độ 28°C với tốc độ lắc 140 vòng/phút. Sinh khối vi khuẩn được thu sau 120 giờ bằng cách lọc qua giấy lọc Whatman đường kính 10 mm.

Tổng hợp nano bạc. Quy trình tổng hợp nano bạc được tiến hành theo phương pháp do Devi (2013) đề xuất. Sinh khối nấm *Trichoderma* được rửa sạch 4 lần bằng nước cất. Sau đó, ủ 10 g sinh khối nấm ướt trong 100 ml nước cất trong vòng 24 giờ. Tiếp theo, lọc dịch thu được bằng giấy lọc Whatman 10 để loại bỏ sinh khối nấm mốc. Trộn 100 ml dịch lọc thu được với 100 ml AgNO₃ 1 mM, và ủ trong tối ở nhiệt độ 28±2°C trong thời gian 120 giờ theo 2 công thức thí nghiệm là lắc mẫu ở 140 vòng/phút và không lắc mẫu (Ahluwalia et al., 2014).

Xử lý sinh khối nấm bằng chất kích kháng citric acid. Bổ sung citric acid (nồng độ từ 5, 10, 15 mg/l) trong quá trình ủ sinh khối nấm với nước cất. Lắc hỗn hợp sinh khối nấm và nước cất ở 140 vòng/phút, sau đó thu dịch lọc để ủ với AgNO₃.

Kiểm tra sự có mặt của AgNPs trong dịch ủ. Sự có mặt của AgNPs trong dịch ủ được kiểm tra bằng

phương pháp đo quang phổ trên máy UV-VIS (Labomed UVD-2950) có sử dụng mẫu nano bạc hóa học được cung cấp bởi Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.

Phân tích kích thước và hình thái hạt bằng kính hiển vi điện tử (TEM, JEOL JEM-1400). Mẫu được chuẩn bị bằng cách nhỏ một giọt huyền phù hạt trên lưới đồng phủ cacbon sau đó để bay hơi dung môi ở nhiệt độ phòng. Không pha loãng dung dịch khi phân tích.

Kiểm tra khả năng ứng chế vi khuẩn bằng dịch AgNPs sinh học. Khả năng kháng khuẩn của dịch AgNPs được với vi khuẩn *E. coli* và *R. solanacearum* được tiến hành theo phương pháp đục lỗ thạch (Nguyen, 2018). Cây trang 1,0 ml dịch lọc vi khuẩn lên đĩa thạch môi trường đặc hiệu cho từng loại vi khuẩn (môi trường LB (1,0% peptone; 0,5%; 1% NaCl) đối với *E. coli*, và TZC (1% peptone; 0,5% glucose; 0,1% casein; 0,01% 2,3,5-Triphenyltetrazolium·HCl) đối với *R. Solanacearum*). Đục lỗ thạch đường kính 1 cm, nhỏ vào lỗ thạch 1,0 ml dịch AgNPs thô. Ủ đĩa thạch ở 30°C trong 24 giờ và quan sát vòng kháng khuẩn thu được. Công thức đối chứng bao gồm dung dịch AgNO₃ 1,0 mM và nước cất 2 lần, dịch lọc nấm.

Xử lý số liệu. Kết quả nghiên cứu được xử lý theo phương pháp ANOVA bằng phần mềm Microsoft excel 2013 với giá trị $p=0,05$.

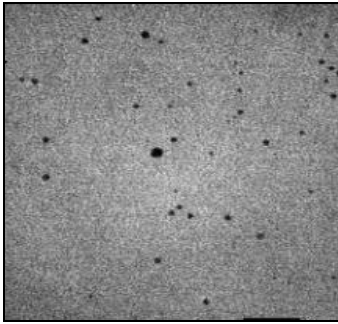
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tổng hợp AgNPs bằng *T. asperellum*

Kết quả cho thấy, chủng *T. asperellum* r1 có khả năng tổng hợp AgNPs hiệu suất cao, ổn định hơn chủng *T. asperellum* r2. Ngoài ra, cũng nhận thấy các hạt AgNPs được tổng hợp từ chủng *T. asperellum* r1 có độ bền cao hơn trong thời gian dài. Cụ thể, sau 180 ngày sau khi tổng hợp chỉ có mẫu AgNPs tổng hợp từ chủng *T. asperellum* r1 còn giữ nguyên hoạt tính.

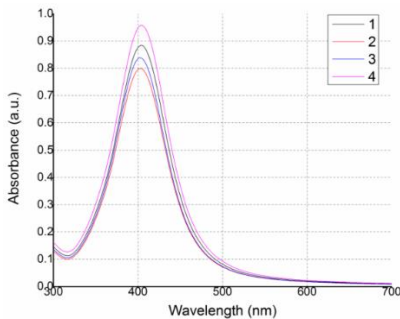
Quan sát mẫu AgNPs bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) cho thấy các hạt AgNPs có tính phân tán và kích thước đều dao động trong khoảng 2-7 nm với đường kính trung bình là 2,5±1,5 nm (Hình 1). So với các nghiên cứu đã công bố, AgNPs thu được trong nghiên cứu này có kích thước nhỏ hơn (Mukherjee, 2008; Fayaz, 2010; Guilger-Casagrande et al., 2019). Theo một số nghiên cứu hoạt tính của AgNPs có thể thay đổi theo kích thước hạt, kích thước hạt càng nhỏ thì

hoạt tính gây độc cho các tế bào sống càng cao (Siddiqi, 2018). Điều này có thể giải thích là khi kích thước hạt càng nhỏ thì AgNPs càng dễ xâm nhập vào bên trong màng tế bào sinh vật.

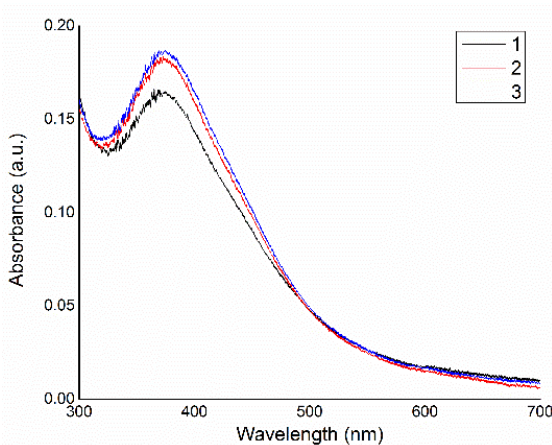


Hình 1. Hạt AgNPs được tổng hợp từ *T. asperellum r1* soi dưới kính hiển vi điện tử (TEM) (thước chuẩn 100nm)

Phân tích phổ hấp thụ quang phổ cực đại của mẫu AgNPs tổng hợp từ *T. asperellum r1* nhận thấy có sự tương đồng về bước sóng hấp thụ cực đại so với mẫu AgNPs tổng hợp hóa học. Bước sóng hấp thụ cực đại đặc trưng cho AgNPs sinh học và hóa học nằm trong khoảng 400-420 nm (Hình 2, Hình 3).



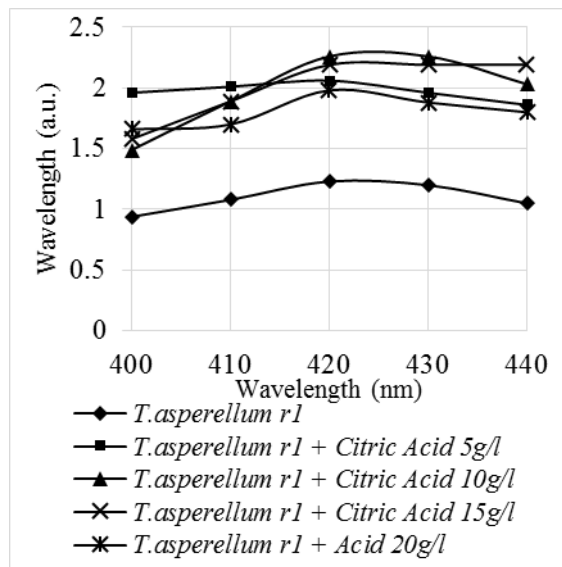
Hình 2. Kết quả phân tích quang phổ hấp thụ cực đại của mẫu nano bạc sinh học. 1, 2, 3, 4 - các lần đo lặp lại của thí nghiệm



Hình 3. Kết quả phân tích quang phổ hấp thụ cực đại của mẫu nano bạc hóa học. 1, 2, 3 - các lần đo lặp lại của thí nghiệm

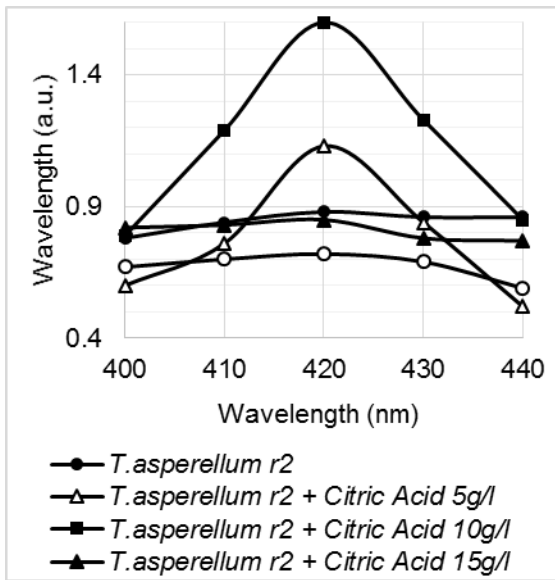
3.2. Ảnh hưởng của citric acid đến quá trình tổng hợp AgNPs của *T. asperellum*

Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi bổ sung citric acid ở các nồng độ khác nhau đã làm thay đổi hiệu suất của quá trình tổng hợp AgNPs ở cả 2 chủng nấm *T. asperellum*. Nồng độ citric acid tối ưu cần bổ sung là 10 mg/l, ở nồng độ này hiệu suất sinh tổng hợp AgNPs lên 1,8 lần so với nghiệm thức không bổ sung đối với chủng *T. asperellum r1* và 1,26 lần đối với chủng *T. asperellum r2* (Hình 4, Hình 5).

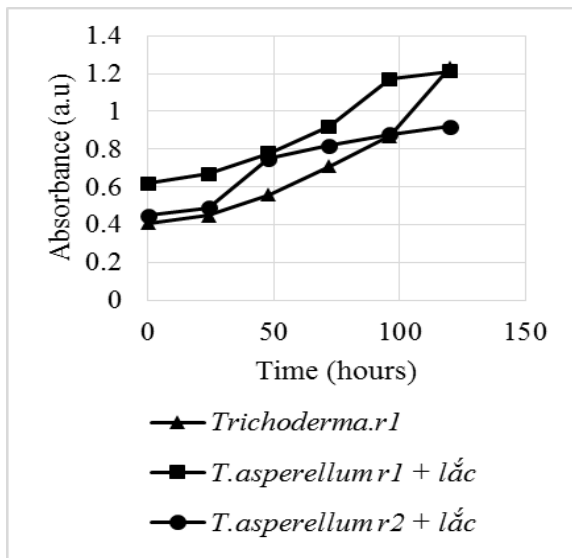


Hình 4. Giá trị UV-vis của dung dịch AgNPs được tổng hợp từ chủng *T. asperellum r1* khi bổ sung citric acid

Khi tăng nồng độ lên 20 mg/l thì hiệu suất tổng hợp AgNPs lại có xu hướng giảm đi. Điều này có thể giải thích do citric acid là một thành phần của chu trình Krebs và góp phần tạo ra NADH, trong đó NADH có vai trò rất quan trọng trong quá trình tổng hợp AgNPs. Hietzschold và cộng sự (2019) đã chỉ ra rằng quá trình tổng hợp hạt nano xảy ra do tác động của NADPH, mà không cần enzyme khử nitrat. Tuy nhiên ở nồng độ quá cao citric acid lại ức chế hoạt động của NADH.



Hình 5. Giá trị UV-vis của dung dịch AgNPs được tổng hợp từ chủng *T. asperellum* r2 khi bổ sung citric acid



Hình 6. Ảnh hưởng của quá trình lắc đến hiệu quả tổng hợp nano bạc theo thời gian

3.3. Ảnh hưởng của chế độ lắc đến hiệu quả tổng hợp AgNPs

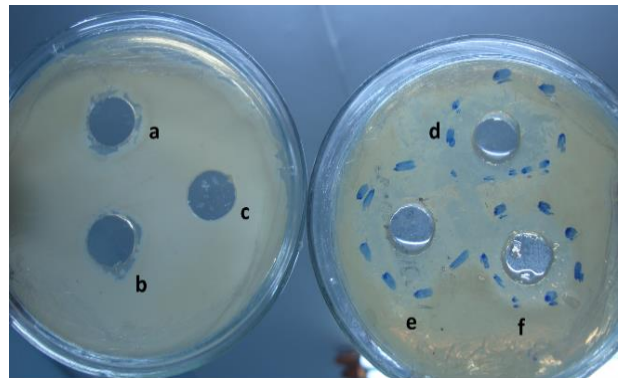
Hiện nay, trong quy trình tổng hợp AgNPs từ nấm nói chung và từ chi *Trichoderma* sp. nói riêng tồn tại 2 quan điểm khác nhau về điều kiện lắc trong quá trình ủ dịch lọc và $AgNO_3$ (Fayaz et al., 2010; Devi et al., 2013). Kết quả phân tích trong nghiên cứu này cho

Bảng 1. Đường kính vòng ức chế sinh trưởng vi khuẩn gây bệnh bằng chế phẩm nano bạc(mm)

thấy, sau 120 giờ ủ không nhận thấy sự khác biệt về hiệu suất tổng hợp AgNPs giữa nghiệm thức lắc và không lắc (Hình 6). Như vậy, điều kiện lắc trong quá trình ủ dịch lọc và $AgNO_3$ không có ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp AgNPs ở loài *T. asperellum*.

3.4. Đánh giá khả năng kháng khuẩn của dịch AgNPs

Dựa trên kết đo đường kính vòng kháng khuẩn, nhận thấy dịch AgNPs tổng hợp từ các chủng *T. asperellum* có hoạt tính đối kháng với các loại vi khuẩn cao hơn các công thức đối chứng (Hình 7, Bảng 1). Trong đó, AgNPs được tổng hợp từ chủng *T. asperellum* r1 có tính kháng khuẩn cao hơn từ chủng *T. asperellum* r2 đối với cả *E. coli* và *R. solanacearum*.



Hình 7. Test đối kháng với vi khuẩn *E. coli*: a - $AgNO_3$ 1mM; b - dịch lọc tế bào; c - nước cất; d, e, f - AgNPs

Dịch nano bạc thô thu được bao gồm dịch lọc sinh khối nấm, dung dịch $AgNO_3$ và nước cất. Nhận thấy rằng, dung dịch $AgNO_3$ và dịch lọc *T. asperellum* hầu như không có khả năng đối kháng lại các loại vi khuẩn. Từ đó, có thể loại trừ khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh của dịch lọc nấm cũng như $AgNO_3$. Như vậy, có thể khẳng định, chỉ có dịch AgNPs hình thành từ sự tương tác giữa $AgNO_3$ và dịch lọc sinh khối nấm có khả năng ức chế sinh trưởng của vi sinh vật.

Chủng vi khuẩn gây bệnh	Đối Chứng				Đối Chứng	
	Nước cất	AgNO ₃ 1mM	Dịch lọc <i>T. asperellum</i> r1	Dịch lọc <i>T. asperellum</i> r2	Nano bạc- <i>T. asperellum</i> r1	Nano bạc- <i>T. asperellum</i> r2
<i>E. coli</i>	0,0	2,0	3,0	0,0	14,7±1,5	5,7±0,6
<i>R. solanacearum</i>	0,0	2,0	2,0	0,0	10,7±1,5	3,0±1,0

Trong các nghiên cứu trước đây đã công bố, dịch AgNPs được tổng hợp theo phương pháp sinh học có kháng lại nhiều loại vi khuẩn và vi nấm có hại như *B. subtilis*, *Vibrio cholerae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Syphilis typhus*, *A. Alternate*, *Helminthosporium sp.*, *Botrytis sp.* and *P. arenaria*... (Siddiqi et al., 2018). Trong nghiên cứu này, dịch AgNPs thu được từ chủng *T. asperellum* r1 đã biểu hiện khả năng đối kháng cao đối với vi khuẩn *Ralsonia solanacearum*. Đây là loại vi khuẩn gây ra bệnh héo xanh rất nguy hiểm đối với nhiều loại cây trồng nông nghiệp khác nhau (Elphinstone, 2005). Từ đây cũng có thể được sử dụng dịch AgNPs từ chủng *T. asperellum* r1 để nghiên cứu sản xuất chế phẩm phòng chống bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralsonia solanacearum* gây ra.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, AgNPs được tổng hợp từ *T. asperellum* có kích thước trong khoảng 2-7 nm. Bổ sung citric acid với nồng độ 10g/l vào quá trình ủ sinh khối vi nấm cho phép tăng hiệu suất tổng hợp AgNPs. Đối với loài *T. asperellum* lắc hỗn hợp dịch lọc và AgNO₃ không ảnh hưởng đến hiệu quả tổng hợp AgNPs. Dịch AgNPs tổng hợp từ chủng *T. asperellum* r1 có khả năng ức chế sinh trưởng của các chủng vi sinh vật gây bệnh như *E. coli* và *R. solanacearum*.

Tài liệu tham khảo

[1] Ali M., Kim B., Belfield K.D., Norman D., Brennan M., Ali G.S. (2016). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Artemisia absinthium* aqueous extract - A comprehensive study. *Materials Science and Engineering*, 58, 359-365.

[2] Ahluwalia V., Kumar J., Sisodia R., Shakil N. A., Walia S. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles by *Trichoderma harzianum* and their bio-efficacy evaluation against *Staphylococcus*

aureus and *Klebsiella pneumoniae*. *Industrial Crops and Products*, 55, 202–206.

[3] Devi T.P., Kulanthaivel S., Kamil D., Borah J.L., Prabhakaran N., Srinivasa N. (2013). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Trichoderma* species. *Indian journal of experimental biology*, 51(7), 543-547.

[4] El-Moslamy S.H., Elkady M.F., Rezk A.H., Abdel-Fattah Y.R. (2017). Applying Taguchi design and large-scale strategy for mycosynthesis of nano-silver from endophytic *Trichoderma harzianum* SYA. F4 and its application against phytopathogens. *Scientific Reports*, 7, 45297.

[5] Elamawi R.M., Al-Harbi R.E., Hendi A.A. (2018). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum* and their effect on phytopathogenic fungi. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28, 28.

[6] Elphinstone J.G. (2005). *The current bacterial wilt situation: a global overview*. In: Allen C, Prior P, Hayward AC (eds) *Bacterial wilt: the disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. APS Press, St. Paul, 9-28.

[7] Fayaz M., Tiwary C., Kalaichelvan P., Venkatesan R. (2010). Blue orange light emission from biogenic synthesized silver nanoparticles using *Trichoderma viride*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 175-178.

[8] Guilger-Casagrande M., Germano-Costa T., Pasquoto-Stigliani T., Fraceto R.F., Lima R. (2019). Biosynthesis of silver nanoparticles employing *Trichoderma harzianum* with enzymatic stimulation for the control of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Sci Rep* 9, 14351.

[9] Guilger-Casagrande M., Lima R. (2019). Synthesis of Silver Nanoparticles Mediated by Fungi: A Review. *Front. Bioeng. Biotechnol*, 7, 287.

[10] Hietzschold S., Walter A., Davis C., Taylor A.A., Sepunaru L. (2019). Does nitrate reductase play a role in silver nanoparticle synthesis? Evidence for NADPH as the sole reducing agent. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 7, 8070-8076.

[11] Mukherjee P., Roy M., Mandal B., Dey G.,

- Mukherjee P., Ghatak J., Tyagi A., Kale S. (2008). Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by a non-pathogenic and agriculturally important fungus *T. asperellum*. *Nanotechnology*, 19(7), 075103.
- [12] Nguyen P.Q., Tran Q.V., Kieu T.M.Y., Le V.K.T., Nguyen M.L., Tran C.K. (2018) Comparison of the antibacterial activity against *Escherichia coli* of silver nanoparticle produced by chemical synthesis with biosynthesis. *Materials Science*, 2(2).
- [13] Roy S., Mukherjee T., Chakraborty S., Kumar das T. (2013). Biosynthesis, characterisation and antifungal activity of silver nanoparticles by the fungus *Aspergillus foetidus* MTCC8876. *Digest J NanomaterBiostruct*, 8, 197-205
- [14] Sastry M., Ahmad A., Islam N.I., Kumar R. (2003). Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Curr Sci.*, 85, 162-170.
- [15] Siddiqi K.S., Husen A., Rao, R.A.K. (2018). A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J Nanobiotechnol*, 16, 14.
- [16] Song J.Y., Kim B.S. (2008). Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32(1), 79-84.
- [17] Wang Z., Chen J., Yang P., Yang W. (2007). Biomimetic synthesis of gold nanoparticles and their aggregates using a polypeptide sequence. *ApplOrganomet Chem.*, 21(8), 645-651.

EFFECT OF VARIOUS PARAMETERS ON SILVER NANOPARTICLES BIOSYNTHESIS BY *TRICHODERMA ASPERELLUM*

Abstract: Synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) by biological methods has many advantages compared to the chemical and physical methods, especially the eco-friendly attribute and focusing on research in the world. The study presented the results on evaluation the effect of several factors on the AgNPs synthesis through two *Trichoderma asperellum* strains. The results showed that the synthesized AgNPs' size was in the range of 2-7 nm. Adding citric acid at a concentration of 10 g/l to the incubation of fungal biomass and distilled water increased AgNPs synthesis efficiency by 1.8 times. Shaking the filtrate and AgNO₃ at 140 rpm in 120 hours did not affect the efficiency of AgNPs synthesis. The solution of AgNPs from *T. asperellum* r1 strain was able to inhibit the growth of the pathogenic strains including *E. coli* and *R. solanacearum*.

Key words: silver nanoparticle; *Trichoderma asperellum*; *R. solanacearum*; silver nanoparticle synthesis.