

DOI:10.22144/ctu.jvn.2021.037

## HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM VÀ KHÁNG KHUẨN CỦA CÁC HỢP CHẤT WELLS-DAWSON POLYOXOMETALATE

Lương Thị Kim Nga<sup>1\*</sup>, Triệu Phú Hậu<sup>1</sup>, Phan Thị Thông<sup>1</sup> và Laurens Vandebroek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Khoa Hóa, Trường Đại học KU Leuven, Bỉ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Lương Thị Kim Nga (email: ltknga@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 18/11/2020

Ngày nhận bài sửa: 05/12/2020

Ngày duyệt đăng: 28/04/2021

### Title:

Antifungal and antibacterial activities of Wells-Dawson polyoxometalates

### Từ khóa:

Bệnh thân thư, hoạt tính kháng khuẩn, hoạt tính kháng nấm, Wells-Dawson polyoxometalates

### Keywords:

Anthraxnose disease, antibacterial activity, antifungal activity, Wells-Dawson polyoxometalates

### ABSTRACT

This study is aimed at synthesizing five Wells-Dawson polyoxometalates (WD-POMs) including  $\alpha$ - $K_6P_2W_{18}O_{62} \cdot 14H_2O$  and  $\beta$ - $K_6P_2W_{18}O_{62} \cdot 19H_2O$  ( $P_2W_{18}$ ),  $K_{10}[\alpha_2-P_2W_{17}O_{61}] \cdot 20H_2O$  ( $P_2W_{17}$ ),  $\alpha_2$ - $K_8P_2W_{17}O_{61}(Co(II) \cdot H_2O) \cdot 16H_2O$  (CoWD 1:1),  $\alpha_2$ - $K_8P_2W_{17}O_{61}(Ni(II) \cdot H_2O) \cdot 17H_2O$  (NiWD 1:1) and  $\alpha_2$ - $K_8P_2W_{17}O_{61}(Cu(II) \cdot H_2O) \cdot 16H_2O$  (CuWD 1:1) to investigate their antifungal activity toward three strains of fungi *Fusarium oxysporum*, *Pyricularia oryzae* and *Colletotrichum* species and the antibacterial activity toward two strains of bacteria *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio parahaemolyticus*. Among these WD-POMs,  $P_2W_{18}$  exhibited the highest antifungal activity toward all studied strains of fungi. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of  $P_2W_{18}$  toward *F. oxysporum*, *P. oryzae* and *Colletotrichum* sp. were 1.0 mM, 3.0 mM and 1.5 mM, respectively. The study also proved that among these WD-POMs,  $P_2W_{18}$  showed the best antibacterial activity with MIC = 0.375 mM toward both *A. hydrophila* and *V. parahaemolyticus*.

### TÓM TẮT

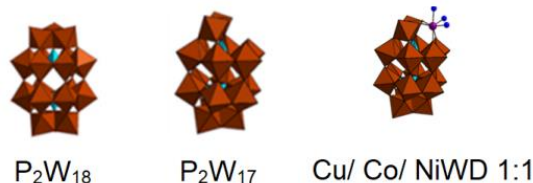
Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích điều chế 5 hợp chất Wells-Dawson polyoxometalate (WD-POM) bao gồm  $\alpha$ - $K_6P_2W_{18}O_{62} \cdot 14H_2O$  và  $\beta$ - $K_6P_2W_{18}O_{62} \cdot 19H_2O$  ( $P_2W_{18}$ ),  $K_{10}[\alpha_2-P_2W_{17}O_{61}] \cdot 20H_2O$  ( $P_2W_{17}$ ),  $\alpha_2$ - $K_8P_2W_{17}O_{61}(Co(II) \cdot H_2O) \cdot 16H_2O$  (CoWD 1:1),  $\alpha_2$ - $K_8P_2W_{17}O_{61}(Ni(II) \cdot H_2O) \cdot 17H_2O$  (NiWD 1:1) và  $\alpha_2$ - $K_8P_2W_{17}O_{61}(Cu(II) \cdot H_2O) \cdot 16H_2O$  (CuWD 1:1) để khảo sát hoạt tính kháng nấm đối với 3 loài nấm *Fusarium oxysporum*, *Pyricularia oryzae* và *Colletotrichum* species và hoạt tính kháng khuẩn đối với 2 loài vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* và *Vibrio parahaemolyticus* của chúng. Trong số các WD-POM được khảo sát,  $P_2W_{18}$  thể hiện hoạt tính kháng nấm tốt nhất đối với cả 3 loài nấm này. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của  $P_2W_{18}$  đối với *F. oxysporum*, *P. oryzae* và *Colletotrichum* sp. lần lượt là 1,0 mM, 3,0 mM và 1,5 mM. Kết quả nghiên cứu còn cho thấy  $P_2W_{18}$  thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất đối với cả 2 loài khuẩn *A. hydrophila* và *V. parahaemolyticus* với MIC = 0,375 mM.

## 1. GIỚI THIỆU

Bệnh héo vàng trên cây trồng gây ra bởi nấm *Fusarium oxysporum* ảnh hưởng rất lớn đến năng suất thu hoạch. Loài nấm này cũng có khả năng sản sinh mycotoxins, làm ảnh hưởng đến chất lượng hạt ngũ cốc lưu trữ. Bệnh thán thư gây ra bởi nấm *Colletotrichum* species cũng làm ảnh hưởng đến sự phát triển của quả và làm hư hại quả trong quá trình lưu trữ (Freeman et al., 1998). *Pyricularia oryzae* là loài nấm gây bệnh đạo ôn trên lúa được trồng ở các vùng khí hậu nhiệt đới, làm giảm đáng kể năng suất lúa và có thể lây lan trên diện rộng (Pham et al., 2019). Ngoài các bệnh gây ra do nấm trên các loại cây trồng, các bệnh trên thủy sản gây ra bởi vi khuẩn cũng dẫn đến thiệt hại lớn cho người nông dân (Pachanawan et al., 2008). Vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* gây bệnh xuất huyết trên cá da trơn và *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm. Các loại bệnh này ảnh hưởng rất lớn đến ngành thủy sản ở nhiều nước như Mexico, Trung Quốc, Malaysia, Việt Nam và Thái Lan (Praja, 2018; Soto-Rodriguez et al., 2015). Việc sử dụng các thuốc kháng nấm và kháng khuẩn tổng hợp để điều trị bệnh trên cây trồng và thủy sản có thể giúp nâng cao năng suất nhưng các loại thuốc này ảnh hưởng đến sức khỏe con người, môi trường đất và các loài sinh vật khác (Sharma et al., 2017). Ngoài ra, việc dùng các loại thuốc kháng nấm và kháng khuẩn tổng hợp này có thể dẫn đến hiện tượng quen thuốc, kháng thuốc. Vì vậy, trong những năm gần đây việc nghiên cứu để tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính kháng nấm và kháng khuẩn ít độc hại rất được quan tâm.

Gần đây, nhiều hợp chất polyoxometalate (POM) là những hợp chất vô cơ có chứa các nguyên tố kim loại chuyển tiếp như V, Nb, Ta, Mo và W ở trạng thái số oxy hóa cao của chúng đã được tổng hợp và khảo sát hoạt tính kháng nấm và kháng khuẩn (Bijelic et al., 2018). Hợp chất antimony(III)-containing polyoxometalate được công bố có tính kháng khuẩn đối với cả vi khuẩn Gram-âm và Gram-dương (Barsukova-Stuckart et al., 2012; Yang et al., 2015; Yang et al., 2016). Một số polyoxometalate bão hòa như  $H_4[SiW_{12}O_{40}] \cdot nH_2O$ ,  $H_4[SiW_{12}O_{40}] \cdot nH_2O$  và  $Na_3[PW_{12}O_{40}] \cdot nH_2O$  cũng thể hiện hoạt tính kháng khuẩn (Grama et al., 2014). Gần đây nhất, hợp chất polyoxometalate-based bạc (I) phenylethyne được chứng minh là có hoạt tính kháng nấm và kháng khuẩn (Hu et al., 2017). Trong nghiên cứu này, một loạt các chất WD-POM bao gồm  $P_2W_{18}$ ,  $P_2W_{17}$ , CuWD 1:1, CoWD 1:1, NiWD 1:1 (Hình 1) đã được tổng hợp để khảo sát tính

kháng nấm (*Colletotrichum* sp., *F. oxysporum* và *P. oryzae*) và hoạt tính kháng vi khuẩn (*A. hydrophila* và *V. parahaemolyticus*). Các hợp chất WD-POM thể hiện hoạt tính kháng nấm *Colletotrichum* sp. mạnh nhất sẽ được dùng để đánh giá khả năng phòng/ trị bệnh thán thư trên quả ớt *Capsicum hustler*.



**Hình 1. Các cấu trúc của các hợp chất WD-POM**

Các nhóm  $WO_6$  được tượng trưng bằng các bát diện màu nâu, các nhóm  $PO_4$  được tượng trưng bằng các tứ diện màu xanh da trời.  $Cu^{II}/Co^{II}/Ni^{II}$  được tượng trưng bằng hình cầu màu tím, các nguyên tử oxy của các phân tử nước và các nhóm OH được tượng trưng bằng các hình cầu màu xanh dương

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Phương tiện nghiên cứu

Các loài nấm *Colletotrichum* sp., *F. oxysporum* và *P. oryzae*; vi khuẩn *A. hydrophila* và *V. parahaemolyticus* được nuôi cấy tại Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ.

Thiết bị: Máy cộng hưởng từ hạt nhân (Bruker Avance 400) đo tại khoa Hóa, trường Đại học KU Leuven, Bỉ. Cân phân tích, máy trộn mẫu Vortex, máy đo mật độ quang UV - VIS Jasco - V730 (Nhật), tủ cấy (Class II BSC, Esco, Indonesia), nồi hấp khử trùng autoclave (HVE-50, Hirayama, Nhật Bản), máy ly tâm (Mikro 12-24, Hettich, Đức), buồng đếm hồng cầu (Marienfeld, Đức) và các thiết bị khác được sử dụng tại khoa Khoa học Tự nhiên, trường Đại học Cần Thơ.

Hóa chất:  $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ ,  $Cu(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ,  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ,  $Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  (Sigma Alrich),  $H_3PO_4$ ,  $NH_4Cl$ ,  $KCl$ ,  $NaHCO_3$  (Trung quốc) và một số các hóa chất khác. Các hóa chất được sử dụng trực tiếp, không cần tinh chế lại.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Tổng hợp các hợp chất WD-POM

**Tổng hợp  $\alpha$ - $K_6P_2W_{18}O_{62} \cdot 14H_2O$  và  $\beta$ - $K_6P_2W_{18}O_{62} \cdot 19H_2O$  ( $P_2W_{18}$ )**

$P_2W_{18}$  được điều chế như sau (Ginsberg, 1990): 125 g  $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$  được hòa tan trong 250 mL nước, kế đến 105 mL  $H_3PO_4$  85% được thêm vào. Dung dịch được đun hoàn lưu trong 4 giờ. Sau khi làm nguội, 50 g  $NH_4Cl$  được thêm vào dung dịch thu được, khuấy trong 10 phút. Thu lấy muối ammonium màu vàng nhạt bằng cách lọc và rửa bằng cách khuấy trong dung dịch chứa 12,5 g  $NH_4Cl$  trong 50 ml nước trong 10 phút và sau đó được hòa tan trong 125 mL nước ấm (45° C). 20 g KCl được thêm vào dung dịch đã làm nguội. Thu muối kali bằng cách lọc và sau đó hòa tan trong 125 mL nước nóng (80° C). Kết tinh hình kim trắng của  $[NaP_5W_{30}O_{110}]^{14-}$  xuất hiện khi làm lạnh đến 15° C được loại bỏ bằng cách lọc. Dung dịch nước lọc được xử lý trực tiếp bằng 12,5 g KCl để thu được hỗn hợp các đồng phân  $\alpha$ - và  $\beta$ - $P_2W_{18}$ . Kết tủa được lọc lấy bằng hệ thống lọc áp suất kém và để khô trong 3 ngày ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp các chất đồng phân  $\alpha$ - và  $\beta$ - $P_2W_{18}$  này thích hợp cho quá trình tổng hợp  $K_{10}[\alpha_2-P_2W_{17}O_{61}] \cdot 20H_2O$ .

**Tổng hợp  $K_{10}[\alpha_2-P_2W_{17}O_{61}] \cdot 20H_2O$  ( $P_2W_{17}$ )**

$P_2W_{17}$  được điều chế dựa vào quy trình của Ginsberg (1990) có hiệu chỉnh như sau: 20 g  $\alpha$ - và  $\beta$ - $P_2W_{18}$  được hòa tan trong 50 mL nước và 5 g  $KHCO_3$  trong 50 mL nước được thêm vào trong khi khuấy. Sau 4 giờ, kết tủa trắng được lọc và sau đó được hòa tan trong 125 mL nước nóng (95° C). Các tinh thể giống như tuyết xuất hiện khi làm nguội đến nhiệt độ phòng được lọc sau 3 giờ và để khô trong 3 ngày ở nhiệt độ phòng.

**Tổng hợp  $\alpha_2-K_8P_2W_{17}O_{61}(Co(II) \cdot H_2O) \cdot 16H_2O$  (CoWD 1:1)**

CoWD 1:1 được điều chế như sau (Lyon et al., 1991): 5,1 g  $\alpha_2-K_{10}P_2W_{17}O_{61} \cdot 20H_2O$  được hòa tan trong 50 mL nước ở 90 °C. Dung dịch được pha từ 0,336 g  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  trong 4 mL nước được thêm vào từng giọt và khuấy mạnh thu được dung dịch màu đỏ. Sau 15 phút, 3 g KCl được thêm vào. Làm lạnh dung dịch qua đêm trong tủ lạnh cho đến khi các tinh thể màu đỏ hình thành. Thu lấy các tinh thể màu đỏ này và kết tinh lại 2 lần bằng 5 mL nước sôi. Rửa sản phẩm với nước đá lạnh, lọc dưới áp suất thấp trong 6 giờ để làm khô sản phẩm.

**Tổng hợp  $\alpha_2-K_8P_2W_{17}O_{61}(Ni(II) \cdot H_2O) \cdot 17H_2O$  (NiWD 1:1)**

NiWD 1:1 được điều chế tương tự CoWD 1:1 nhưng thay 0,336 g  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  trong 4 mL nước trong quy trình bằng 0,345 g  $Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  trong 4 mL nước.

**Tổng hợp  $\alpha_2-K_8P_2W_{17}O_{61}(Cu(II) \cdot H_2O) \cdot 16H_2O$  (CuWD 1:1)**

CuWD 1:1 được điều chế tương tự CoWD 1:1 nhưng thay 0,336 g  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  trong 4 mL nước trong quy trình bằng 0,3 g  $Cu(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  trong 2,5 mL nước.

**2.2.2. Khảo sát hoạt tính kháng nấm của các hợp chất WD-POM**

**Chuẩn bị huyền phù các loài nấm**

Các loài nấm được nuôi cấy trên môi trường potato-glucose-agar (PGA) trong 14 ngày ở nhiệt độ 25 °C và thiếu ánh sáng để bào tử nấm hình thành nhanh chóng. Sau 14 ngày thu hoạch bào tử như sau: Lấy 10 mL nước đã khử trùng thêm vào đĩa nuôi, dùng lam kính hiển vi để quét nhẹ trên bề mặt nấm để bào tử phân tán vào nước. Dùng gạc y tế loại bỏ sợi nấm, thu huyền phù bào tử. Xác định mật độ bào tử nấm trong huyền phù bằng phương pháp đếm bằng buồng đếm hồng cầu và điều chỉnh mật độ đến  $10^6$  bào tử/mL.

**Khảo sát hoạt tính kháng nấm**

Hoạt tính kháng nấm của các hợp chất WD-POM được khảo sát bằng hai phương pháp gồm phương pháp khuếch tán giếng thạch để phân tích định tính và phương pháp pha loãng liên tục hai lần để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC). Hoạt tính kháng nấm của mỗi WD-POM được khảo sát ba lần lặp lại dựa vào phương pháp khuếch tán giếng thạch đã được mô tả bởi Sharma và các cộng sự năm 2017 (Sharma et al., 2017) với một vài hiệu chỉnh. Các đĩa petri thí nghiệm được chuẩn bị với PGA cho cả 3 loài nấm *F. oxysporum*, *P. oryzae* và *Colletotrichum* sp. như sau: 20 mL PGA nóng được đổ vào mỗi đĩa petri và để khô. 100  $\mu$ L bào tử  $10^6$ /mL của mỗi loài nấm được trải nhẹ nhàng trên bề mặt PGA khô. Dùng bộ dụng cụ đục lỗ đục 3 giếng (đường kính 9 mm) trên mỗi đĩa petri PGA khô. 50  $\mu$ L dung dịch WD-POM 6,0 mM được thêm vào mỗi giếng. Đĩa petri với 3 giếng không thêm dung dịch WD-POM là mẫu đối chứng âm (NC). Đĩa petri với 3 giếng thêm vào 50  $\mu$ L thuốc trừ bệnh thương mại Score 250EC (hoạt chất difenoconazole) với nồng độ khuyến cáo 250 ppm được sử dụng để làm mẫu đối chứng dương (PC) đối với nấm *F. oxysporum* và *Colletotrichum* sp., Fillia 525SC (hoạt chất propiconazole và tricyclazole) 250 ppm được sử dụng để làm mẫu đối chứng dương đối với nấm *P. oryzae*. Các đĩa petri sau đó được phủ kín bằng màng polyetylen và ủ ở 28 °C. Đường kính của vùng ức chế nấm (a, mm) được đo sau 48 giờ và kích thước của vùng ức chế nấm (b, mm) được tính bằng

công thức:  $b = a - 9$ , trong đó 9 là đường kính của giếng thạch, .

Giá trị MIC của các WD-POM đối với các loài nấm được xác định bằng phương pháp pha loãng liên tục hai lần theo Sharma et al. (2017). Môi trường potato-glucose (PG) chứa nồng độ giảm dần (từ 3,0 mM đến 0,1875 mM) của mỗi WD-POM được bổ sung huyền phù nấm  $10^6$  bào tử/mL trong eppendorf 2 ml như sau: 240  $\mu$ L môi trường PG được thêm vào 5 eppendorf 2 ml, 240  $\mu$ L WD-POM 6,0 mM được thêm vào eppendorf đầu tiên. Sự pha loãng liên tục 2 lần được thực hiện từ eppendorf đầu tiên đến eppendorf thứ năm bằng cách chuyển 240  $\mu$ L từ eppendorf này sang eppendorf kế tiếp bằng cách sử dụng micropipet. Loại bỏ 240  $\mu$ L dung dịch đã trộn trong eppendorf thứ năm. Tiếp theo, 10  $\mu$ L huyền phù bào tử nấm ( $10^6$  bào tử/mL) được thêm vào mỗi eppendorf. Một dãy thí nghiệm tương tự được thực hiện tương tự với dãy nồng độ giảm dần từ 2,0 mM đến 0,125 mM. Eppendorf đối chứng âm chứa 10  $\mu$ L huyền phù bào tử nấm ( $10^6$  bào tử/mL) và 240  $\mu$ L môi trường. Hỗn hợp trong tất cả các eppendorf sau khi được trộn lẫn đem ủ ở 28°C trong 48 giờ. Sự thay đổi màu sắc từ tím sang hồng là dấu hiệu của sự phát triển của nấm *F. Oxysporum* trong khi dung dịch từ trong suốt chuyển sang trắng đục là dấu hiệu của sự phát triển của nấm *Colletotrichum* sp. và *P. oryzae*. Nồng độ thấp nhất mà sự thay đổi màu sắc không xảy ra được lấy làm giá trị MIC. Tất cả các thí nghiệm xác định giá trị MIC được thực hiện ba lần.

### 2.2.3. Thử nghiệm khả năng phòng/ trị bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* sp. gây ra trên quả ớt

Từ kết quả khảo sát hoạt tính kháng nấm *Colletotrichum* sp. của các hợp chất WD-POM, P<sub>2</sub>W<sub>18</sub>, P<sub>2</sub>W<sub>17</sub>, CuWD 1:1 và CoWD 1:1 được khảo sát khả năng phòng/trị bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* sp. gây ra trên quả ớt. Các quả ớt được tạo vết thương trên bề mặt và ở trung tâm bằng một bó 10 cây kim tiệt trùng. Thí nghiệm bao gồm 10 nghiệm thức và mỗi nghiệm thức được thực hiện 9 lần lặp lại.

**Nghiệm thức 1** (Đối chứng âm): 10  $\mu$ L nước tiệt trùng được cho vào vết thương của quả ớt, sau đó ủ 24 h ở 25°C. Sau khi ủ, 10  $\mu$ L dung dịch huyền phù bào tử nấm có mật độ  $10^6$  bào tử/mL được thêm tiếp vào vết thương và ủ tiếp 24 h ở 25°C. Kể đến 10  $\mu$ L nước tiệt trùng được thêm vào vết thương của các quả ớt.

**Nghiệm thức 2** (Đối chứng dương): Thực hiện tương tự như nghiệm thức 1 nhưng ở bước cuối cùng

thay 10  $\mu$ L nước tiệt trùng bằng 10  $\mu$ L Score với nồng độ khuyến cáo (250 ppm).

**Nghiệm thức 3** (P<sub>2</sub>W<sub>18</sub> trước và sau): Thực hiện tương tự như nghiệm thức 1 nhưng ở bước đầu và bước cuối cùng thay 10  $\mu$ L nước tiệt trùng bằng 10  $\mu$ L P<sub>2</sub>W<sub>18</sub> 6,0 mM.

**Nghiệm thức 4** (P<sub>2</sub>W<sub>18</sub> sau): Thực hiện tương tự như nghiệm thức 1 nhưng ở bước cuối cùng thay 10  $\mu$ L nước tiệt trùng bằng 10  $\mu$ L P<sub>2</sub>W<sub>18</sub> 6,0 mM.

**Nghiệm thức 5** (P<sub>2</sub>W<sub>17</sub> trước và sau): Thực hiện tương tự như nghiệm thức 1 nhưng ở bước đầu và bước cuối cùng thay 10  $\mu$ L nước tiệt trùng bằng 10  $\mu$ L P<sub>2</sub>W<sub>17</sub> 6,0 mM.

**Nghiệm thức 6** (P<sub>2</sub>W<sub>17</sub> sau): Thực hiện tương tự như nghiệm thức 1 nhưng ở bước cuối cùng thay 10  $\mu$ L nước tiệt trùng bằng 10  $\mu$ L P<sub>2</sub>W<sub>17</sub> 6,0 mM.

**Nghiệm thức 7** (CuWD 1:1 trước và sau): Thực hiện tương tự như nghiệm thức 1 nhưng ở bước đầu và bước cuối cùng thay 10  $\mu$ L nước tiệt trùng bằng 10  $\mu$ L dung dịch CuWD 1:1 6,0 mM.

**Nghiệm thức 8** (CuWD 1:1 sau): Thực hiện tương tự như nghiệm thức 1 nhưng ở bước cuối cùng thay 10  $\mu$ L nước tiệt trùng bằng 10  $\mu$ L dung dịch CuWD 1:1 6,0 mM.

**Nghiệm thức 9** (CoWD 1:1 trước và sau): Thực hiện tương tự như nghiệm thức 1 nhưng ở bước đầu và bước cuối cùng thay 10  $\mu$ L nước tiệt trùng bằng 10  $\mu$ L dung dịch CoWD 1:1 6,0 mM.

**Nghiệm thức 10** (CoWD 1:1 sau): Thực hiện tương tự như nghiệm thức 1 nhưng ở bước cuối cùng thay 10  $\mu$ L nước tiệt trùng bằng 10  $\mu$ L dung dịch CoWD 1:1 6,0 mM.

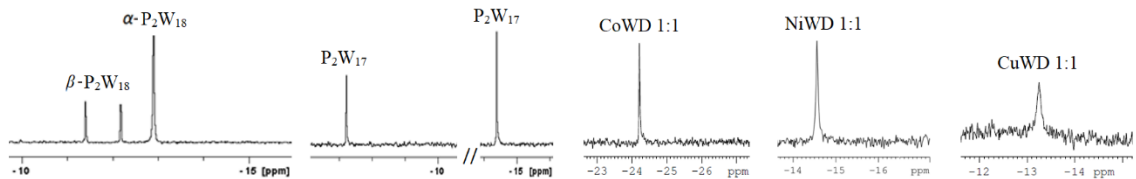
Tất cả các nghiệm thức được tiếp tục ủ ở 25°C cho đến khi bệnh thán thư xuất hiện. Kết quả được ghi nhận bằng cách đo chiều dài vết bệnh, đơn vị tính là mm.

### 2.2.4. Khảo sát tính kháng vi khuẩn của các hợp chất WD-POM

Hoạt tính kháng vi khuẩn của hợp chất WD-POM cũng được khảo sát bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch để phân tích định tính và phương pháp pha loãng liên tục hai lần để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC). Đối với phương pháp khuếch tán giếng thạch, hoạt tính kháng vi khuẩn của tất cả các WD-POM được đánh giá theo phương pháp đề nghị bởi Kirby-Bauer có hiệu chỉnh (Bauer et al., 1966). Nuôi cấy qua đêm các chủng vi khuẩn bao gồm *A. hydrophila* và *V. parahaemolyticus* trong

môi trường Luria-Bertani (LB) và được điều chỉnh đến nồng độ  $10^6$  CFU/mL để cấy vào đĩa thạch LB agar (LB-A) như sau: 20 mL LB-A nóng được đổ vào mỗi đĩa petri và sau đó để LB-A khô. 100  $\mu$ L vi khuẩn có nồng độ  $10^6$  CFU/mL được trải nhẹ nhàng trên bề mặt của LB-A khô. Dùng bộ đục lỗ đục 3 giếng trống (đường kính 9 mm) trên mỗi đĩa petri để khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của mỗi WD-POM ở các nồng độ nhất định. 50  $\mu$ L trong mỗi dung dịch WD-POM 6,0 mM được thêm vào mỗi giếng. Một dãy các đĩa petri được chuẩn bị theo cách tương tự với nồng độ giảm từ 6,0 mM đến 0,375 mM. Các đĩa sau đó được dán kín bằng màng polyetylen và ủ ở 28 °C. Đường kính của vùng ức chế khuẩn được ghi nhận sau 24 giờ. Tetracycline với nồng độ giảm dần từ 6,0 mM đến 0,375 mM được sử dụng làm đối chứng dương (PC). Môi trường LB được dùng làm đối chứng âm (NC).

Đối với phương pháp pha loãng liên tục hai lần, MIC của mỗi hợp chất WD-POM được đo dựa theo Wikler et al. (Wikler MA, 2009) với một số hiệu chỉnh. Chuẩn bị hai dãy dung dịch WD-POM với các nồng độ giảm dần tương tự như thí nghiệm xác định MIC ở thí nghiệm khảo sát hoạt tính kháng nấm ở trên, cuối cùng thêm 10  $\mu$ L dung dịch vi khuẩn có mật số  $10^6$  CFU/mL. Tất cả các eppendorf thí nghiệm xác định MIC được ủ ở 28°C trong 24 giờ. Sau khi ủ, dung dịch từ trong suốt chuyển sang trắng đục là dấu hiệu sự phát triển của khuẩn A.



**Hình 2. Phổ  $^{31}\text{P}$  NMR của  $\text{P}_2\text{W}_{18}$ ,  $\text{P}_2\text{W}_{17}$ ,  $\text{CoWD 1:1}$ ,  $\text{NiWD 1:1}$  và  $\text{CuWD 1:1}$**

Điều kiện đo: nồng độ các WD-POM: 3,0 mM, dung môi:  $\text{D}_2\text{O}$ , chất chuẩn để so sánh:  $\text{H}_3\text{PO}_4$  25%, 400 MHz, 298°K, NS = 128

**3.2. Khảo sát hoạt tính kháng nấm của các hợp chất WD-POM**

**3.2.1. Khảo sát hoạt tính kháng nấm *F. oxysporum***

Kết quả khảo sát hoạt tính kháng nấm bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch cho thấy chỉ có  $\text{P}_2\text{W}_{18}$  tạo vùng ức chế nấm hoàn toàn với kích thước là  $9,3 \pm 0,6$  mm, thấp hơn khoảng 2,5 lần so với đối chứng dương ( $24,4 \pm 0,6$  mm) (Hình 3). Các hợp chất WD-POM còn lại gồm  $\text{P}_2\text{W}_{17}$ ,  $\text{CuWD 1:1}$ ,  $\text{CoWD 1:1}$  và  $\text{NiWD 1:1}$  xuất hiện vùng kháng nấm không hoàn toàn, trong vùng này vẫn còn một ít bào

*hydrophila* và *V. parahaemolyticus*. MIC được xác định bằng nồng độ thấp nhất mà ở nồng độ đó không có sự phát triển của vi khuẩn. Tất cả các thí nghiệm các định giá trị MIC được thực hiện ba lần.

**2.2.5. Xử lý số liệu**

Số liệu được phân tích và xử lý thống kê bằng phần mềm Minitab 16.0. Các biểu đồ được vẽ bằng phần mềm Microsoft Excel 2010.

**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

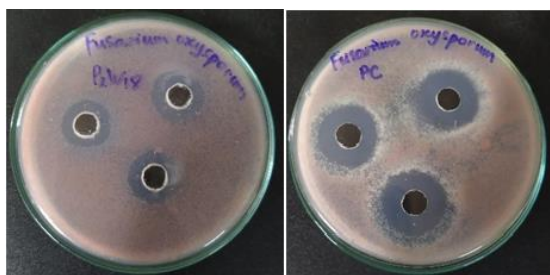
**3.1. Tổng hợp các hợp chất WD-POM**

Các hợp chất WD-POM gồm  $\text{P}_2\text{W}_{18}$ ,  $\text{P}_2\text{W}_{17}$ ,  $\text{CoWD 1:1}$ ,  $\text{NiWD 1:1}$ ,  $\text{CuWD 1:1}$  đã được tổng hợp và xác định đúng cấu trúc bằng phổ  $^{31}\text{P}$  NMR (Ginsberg, 1990; Lyon et al., 1991) (Hình 2).  $\text{P}_2\text{W}_{18}$ : 33,2 g (hiệu suất 32,5%). Phổ  $^{31}\text{P}$  NMR có 1 tính hiệu cộng hưởng tại  $\delta = -12,92$  ppm đối với đồng phân  $\alpha$  và 2 tính hiệu cộng hưởng tại  $\delta = -11,43$  ppm và  $\delta = -12,20$  ppm đối với đồng phân  $\beta$ .  $\text{P}_2\text{W}_{17}$ : 17,5 g (hiệu suất 86,4%). Phổ  $^{31}\text{P}$  NMR có 2 tính hiệu cộng hưởng tại  $\delta = -6,42$  ppm và  $\delta = -13,57$  ppm.  $\text{CoWD 1:1}$ : 3,5 g (hiệu suất 66,5%). Phổ  $^{31}\text{P}$  NMR có 1 tính hiệu cộng hưởng tại  $\delta = -24,3$  ppm.  $\text{NiWD 1:1}$ : 3,6 g (hiệu suất 73%). Phổ  $^{31}\text{P}$  NMR có 1 tính hiệu cộng hưởng tại  $\delta = -14,6$  ppm.  $\text{CuWD 1:1}$ : 3,3 g (hiệu suất 67,6%). Phổ  $^{31}\text{P}$  NMR có 1 tính hiệu cộng hưởng tại  $\delta = -13,3$  ppm.

từ nấm tồn tại. Điều này chứng tỏ trong các hợp chất WD-POM khảo sát,  $\text{P}_2\text{W}_{18}$  có hoạt tính kháng nấm mạnh nhất đối với nấm *F. oxysporum*.

Các giá trị MIC được xác định theo phương pháp pha loãng liên tục hai lần cho thấy  $\text{P}_2\text{W}_{18}$  thể hiện hoạt tính kháng nấm tốt nhất với giá trị MIC là 1,0 mM. Các WD-POM còn lại là  $\text{P}_2\text{W}_{17}$ ,  $\text{CoWD 1:1}$ ,  $\text{NiWD 1:1}$  và  $\text{CuWD 1:1}$  không ức chế nấm *F. oxysporum* trong khoảng nồng độ khảo sát. Kết quả này phù hợp với kết quả khảo sát định tính hoạt tính kháng nấm bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch.





**Hình 3. Vùng ức chế nấm của P2W18 nồng độ 6,0 mM (trái) và PC (phải) đối với nấm F. oxysporum**

**3.2.2. Khảo sát hoạt tính kháng nấm P. oryzae**

Kết quả khảo sát hoạt tính kháng nấm *P. oryzae* của các hợp chất WD-POM bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch cho thấy chỉ có P<sub>2</sub>W<sub>18</sub> 6,0 mM tạo vùng ức chế trung bình là 2,7 ± 0,6 mm ,

**Bảng 1. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng nấm Colletotrichum sp. của các hợp chất WD-POM 6,0 mM bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch**

WD-POM	Vùng ức chế nấm trung bình (mm)	WD-POM	Vùng ức chế nấm trung bình (mm)
P <sub>2</sub> W <sub>18</sub>	10,7 ± 0,6	CuWD 1:1	31,7 ± 0,6*
P <sub>2</sub> W <sub>17</sub>	30,0 ± 1,0*	CoWD 1:1	22,3 ± 0,6*
Score	25,7 ± 0,6	NiWD 1:1	32,3 ± 0,6*

\*: Vùng ức chế nấm không hoàn toàn

Kết quả xác định giá trị MIC của các WD-POM đối với *Colletotrichum sp.* cho thấy P<sub>2</sub>W<sub>18</sub> thể hiện tính kháng nấm *Colletotrichum sp.* mạnh nhất với giá trị MIC là 1,5 mM. Các WD-POM P<sub>2</sub>W<sub>17</sub> và CoWD 1:1 có giá trị MIC tương tự nhau là 3,0 mM trong khi CuWD 1:1 và NiWD 1:1 không thể hiện hoạt tính kháng nấm khi khảo sát bằng phương pháp này. Nghiên cứu này cho thấy rằng phương pháp pha

thấp hơn khoảng 5 lần so với PC 250 ppm (16,3 ± 1,2 mm). Trong khi đó các WD-POM còn lại gồm P<sub>2</sub>W<sub>17</sub>, CuWD 1:1, CoWD 1:1 và NiWD 1:1 không thể hiện hoạt tính kháng nấm đối với nấm *P. oryzae*. Giá trị MIC của P<sub>2</sub>W<sub>18</sub> đối với nấm *P. oryzae* được xác định bằng phương pháp pha loãng liên tục hai lần là 3,0 mM.

**3.2.3. Khảo sát tính kháng nấm Colletotrichum sp.**

Kết quả khảo sát hoạt tính kháng nấm *Colletotrichum sp.* của các hợp chất WD-POM bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch được trình bày trong Bảng 1 cho thấy chỉ có P<sub>2</sub>W<sub>18</sub> tạo vùng ức chế nấm hoàn toàn với kích thước là 10,7 ± 0,6 mm, nhỏ hơn khoảng 2,5 lần so với vùng ức chế nấm của PC (Score) trong khi các hợp chất WD-POM còn lại đều tạo vùng ức chế nấm không hoàn toàn.

loãng liên tục hai lần nhạy hơn so với phương pháp khuếch tán giếng thạch.

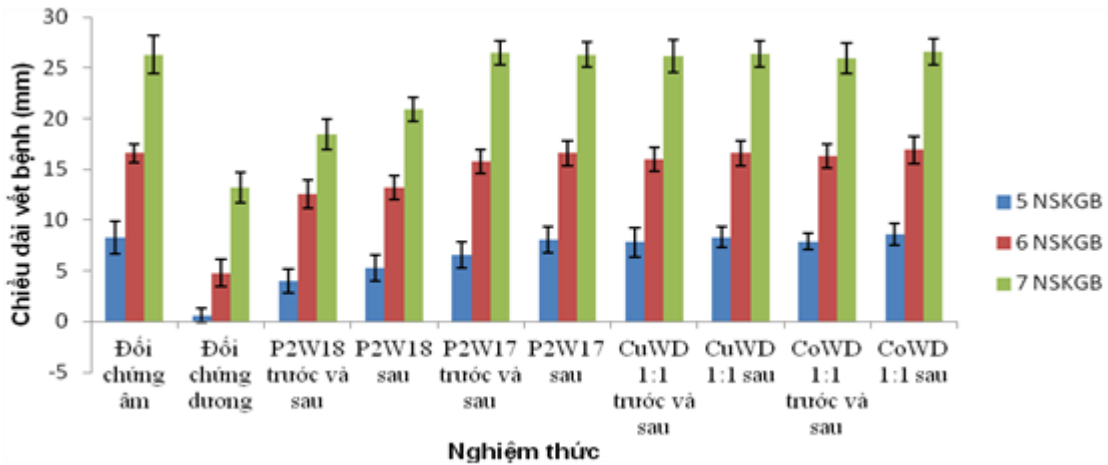
**3.3. Khảo sát khả năng phòng/ trị bệnh thán thư do nấm Colletotrichum sp. gây ra trên quả ớt của các hợp chất WD-POM**

Kết quả khảo sát khả năng phòng/trị bệnh thán thư của các hợp chất WD-POM được trình bày trong Bảng 2, Hình 4 và Hình 5.

**Bảng 2. Chiều dài vết bệnh thán thư do nấm Colletotrichum sp. gây ra trên quả ớt**

	Chiều dài vết bệnh (mm)		
	Sau 5 ngày gây bệnh	Sau 6 ngày gây bệnh	Sau 7 ngày gây bệnh
Đối chứng âm (NT1)	8,3±1,6 <sup>A</sup>	16,6±0,9 <sup>A</sup>	26,3±1,9 <sup>A</sup>
Đối chứng dương (NT2)	0,6±0,7 <sup>E</sup>	4,8±1,3 <sup>C</sup>	13,2±1,5 <sup>D</sup>
P <sub>2</sub> W <sub>18</sub> trước và sau (NT3)	4,0±1,2 <sup>D</sup>	12,6±1,4 <sup>B</sup>	18,4±1,5 <sup>C</sup>
P <sub>2</sub> W <sub>18</sub> sau (NT4)	5,3±1,3 <sup>C</sup>	13,2±1,2 <sup>B</sup>	20,9±1,2 <sup>B</sup>
P <sub>2</sub> W <sub>17</sub> trước và sau (NT5)	6,6±0,7 <sup>B</sup>	15,8±1,0 <sup>A</sup>	26,5±1,8 <sup>A</sup>
P <sub>2</sub> W <sub>17</sub> sau (NT6)	8,1±1,3 <sup>A</sup>	16,6±1,5 <sup>A</sup>	26,3±1,6 <sup>A</sup>
CuWD 1:1 trước và sau (NT7)	7,8±1,4 <sup>A</sup>	16,0±1,2 <sup>A</sup>	26,2±1,6 <sup>A</sup>
CuWD 1:1 sau (NT8)	8,3±1,0 <sup>A</sup>	16,6±1,2 <sup>A</sup>	26,4±1,3 <sup>A</sup>
CoWD 1:1 trước và sau (NT9)	7,9±0,8 <sup>A</sup>	16,3±1,2 <sup>A</sup>	25,9±1,5 <sup>A</sup>
CoWD 1:1 sau (NT10)	8,6±1,1 <sup>A</sup>	16,9±1,3 <sup>A</sup>	26,6±1,3 <sup>A</sup>

Ghi chú: các số liệu có cùng mẫu tự theo sau (tính theo cột) thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%



**Hình 4. Đồ thị biểu diễn quá trình phát triển bệnh thán thư trên quả ớt ở các nghiệm thức NT1 - NT10**

Kết quả từ Bảng 2, Hình 4 và Hình 5 cho thấy ở thời điểm 5 ngày sau khi gây bệnh (NSKGB), các nghiệm thức đều cho thấy sự khác biệt đáng kể. Đáng chú ý nhất là với NT3 và NT4 vì các nghiệm thức này đều có chiều dài vết bệnh là  $4,0 \pm 1,2$  mm và  $5,3 \pm 1,3$  mm tương ứng, kể đến là NT5 với chiều dài vết bệnh  $6,6 \pm 0,7$  mm đều khác biệt so với NT1

( $8,3 \pm 1,6$  mm). Các NT6, NT7, NT8, NT9 và NT10 mặc dù là các nghiệm thức được phun WD-POM trước và sau nhưng kết quả cho thấy chúng không có sự khác biệt về mặt thống kê so với NT1. Nghiệm thức đối chứng dương NT2 cho kết quả tốt nhất với chiều dài vết bệnh thấp nhất ( $0,6 \pm 0,7$  mm) và có sự khác biệt về mặt thống kê so với NT1.



**Hình 5. Các quả ớt sau 5 ngày gây bệnh. Từ trái qua phải và từ trên xuống dưới từ NT1 đến NT10**

Tại thời điểm 6 NSKGB (Bảng 2), NT5 bắt đầu có kết quả không có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê khi chiều dài vết bệnh tăng vọt đáng kể với giá trị là  $15,8 \pm 1,0$  mm. Trong khi đó NT3 ( $12,6 \pm 1,4$  mm) và NT4 ( $13,2 \pm 1,2$  mm) vẫn nhỏ nhất khi chiều dài vết bệnh tăng lên chậm hơn so với NT5 và vẫn còn sự khác biệt về mặt thống kê so với NT1 ( $16,6 \pm 0,9$  mm). Tại thời điểm này, NT2 có chiều dài vết bệnh chỉ đạt  $4,8 \pm 1,3$  mm. Các nghiệm thức còn lại (NT6-NT10) tạo chiều dài vết bệnh không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê so với NT1 khi chiều dài vết bệnh vào khoảng 16,0-16,9 mm.

Tại thời điểm 7 NSKGB (Bảng 2), chiều dài vết bệnh của tất cả các nghiệm thức đều tăng lên. Các nghiệm thức NT5 - NT10, bắt đầu có tốc độ phát triển bệnh hầu như tương đương so với NT1 ( $26,3 \pm 1,9$  mm), chứng tỏ trong các nghiệm thức này

các WD-POM đã không còn tác dụng ức chế nấm *Colletotrichum* Sp.. Trong khi đó, trong NT3 ( $18,4 \pm 1,5$  mm) và NT4 ( $20,9 \pm 1,2$  mm), P<sub>2</sub>W<sub>18</sub> vẫn còn phát huy được tác dụng ức chế nấm *Colletotrichum* sp. khi chiều dài vết bệnh vẫn có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê so với NT1. Trong NT2, Score vẫn còn thể hiện tốt vai trò của chất đối chứng dương khi giá trị chiều dài vết bệnh chỉ đạt  $13,2 \pm 1,5$  mm.

Như vậy, trong các hợp chất WD-POM đã dùng để khảo sát khả năng phòng/trị bệnh thán thư trên quả ớt chỉ có P<sub>2</sub>W<sub>18</sub> có khả năng phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh thán thư. Kết quả này cũng rất phù hợp với các kết quả khảo sát tính kháng nấm *Colletotrichum* sp. của P<sub>2</sub>W<sub>18</sub> đã trình bày ở trên bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch và phương pháp pha loãng liên tục hai lần. Các WD-POM bao gồm P<sub>2</sub>W<sub>17</sub>, CuWD 1:1 và CoWD 1:1 đều

thể hiện hoạt tính tốt ở thời điểm 5 NSKGB nhưng hiệu quả của chúng không duy trì tốt sau đó nên các WD-POM này không phải là lựa chọn tốt cho việc phòng/trị bệnh thán thư.

### 3.4. Khảo sát tính kháng khuẩn của các hợp chất WD-POM

Kết quả kháng khuẩn *V. parahaemoliticus* của các WD-POM bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch được ghi nhận sau 24 giờ cho thấy chỉ có P<sub>2</sub>W<sub>18</sub> tạo vùng ức chế khuẩn là 3,3 ± 0,6 mm ở nồng độ 6,0 mM trong khi tetracycline xuất hiện vùng ức chế khuẩn tương tự (3,0 ± 1,0 mm) ở 1,5 mM. Các WD-POM còn lại không tạo vùng ức chế khuẩn đối với *V. parahaemoliticus*.

Hoạt tính kháng khuẩn của các hợp chất WD-POM đối với khuẩn *A. hydrophila* được khảo sát bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch cho thấy ở cùng nồng độ 6,0 mM, P<sub>2</sub>W<sub>18</sub> tạo vùng ức chế khuẩn đạt 4,3 ± 0,6 mm, thấp hơn chỉ khoảng 3 lần so với tetracycline (11,7 ± 0,6 mm). CuWD 1:1 thể hiện hoạt tính kháng khuẩn nhưng không hoàn toàn với vùng làm giảm mật số vi khuẩn 11,3 ± 0,6 mm ở nồng độ 6,0 mM. Các WD-POM còn lại không tạo vùng ức chế khuẩn đối với *A. hydrophila*.

Kết quả thí nghiệm xác định giá trị MIC cho thấy P<sub>2</sub>W<sub>18</sub> thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất với cả 2 loài khuẩn *V. parahaemoliticus* và *A. hydrophila* và có giá trị MIC đều là 0,375 mM. Các WD-POM còn lại chưa xác định được giá trị MIC ở khoảng nồng độ khảo sát.

## 4. KẾT LUẬN

Trong số các hợp chất WD-POM được tổng hợp và nghiên cứu, P<sub>2</sub>W<sub>18</sub> thể hiện hoạt tính kháng nấm tốt nhất đối với cả ba loài nấm *F. oxysporum*, *P. oryzae* và *Colletotrichum* sp.. Kết quả nghiên cứu còn cho thấy P<sub>2</sub>W<sub>18</sub> có khả năng phòng/trị bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* sp. gây ra trên quả ớt tốt nhất trong khi P<sub>2</sub>W<sub>17</sub>, CuWD 1:1 và CoWD 1:1 không có tác dụng phòng/trị bệnh thán thư. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng P<sub>2</sub>W<sub>18</sub> thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất đối với cả 2 dòng khuẩn *V. parahaemoliticus* và *A. hydrophila*. Trong các thí nghiệm khảo sát hoạt tính kháng nấm và kháng khuẩn của các hợp chất WD-POM, phương pháp pha loãng liên tục hai lần luôn nhạy hơn phương pháp khuếch tán trên giếng thạch. Các kết quả nghiên cứu cho thấy P<sub>2</sub>W<sub>18</sub> là hợp chất WD-POM tiềm năng cần tiếp tục nghiên cứu sâu hơn để điều chế các chế phẩm kháng nấm và kháng khuẩn.

## LỜI CẢM ƠN

Các tác giả trân trọng cảm ơn Trường Đại học Cần Thơ đã tài trợ kinh phí thực hiện nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Barsukova-Stuckart, M., Piedra-Garza, L. F., Gautam, B., Alfaro-Espinoza, G., Izarova, N. V., Banerjee, A., . . . Kortz, U. (2012). Synthesis and Biological Activity of Organoantimony(III)-Containing Heteropolytungstates. *Inorganic Chemistry*, 51(21), 12015-12022. doi:10.1021/ic301892s
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4\_ts), 493-496. doi:10.1093/ajcp/45.4\_ts.493
- Bijelic, A., Aureliano, M., & Rompel, A. (2018). The antibacterial activity of polyoxometalates: structures, antibiotic effects and future perspectives. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 54(10), 1153-1169. doi:10.1039/c7cc07549a
- Freeman, S., Katan, T., & Shabi, E. (1998). Characterization of Colletotrichum species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant disease*, 82(6), 596-605.
- Ginsberg, A. P. (1990). *Inorganic syntheses*. In Vol. 27. (pp. 449).
- Grama, L., Man, A., Muntean, D.-L., Florea4, Ş. A. G., Boda, F., & Curticăpean, A. (2014). Antibacterial activity of some saturated polyoxotungstates. *Romanian Review of Laboratory Medicine, Volume* 22(1), 111-118. doi:10.2478/rrlm-2014-0007
- Hu, T., Li, Y.-H., Kuang, X.-F., & Lu, C.-Z. (2017). Synthesis and characterization of polyoxometalate-based silver(i) phenylethynide compounds with antibacterial and antifungal activities. *CrystEngComm*, 19(25), 3445-3454. doi:10.1039/C7CE00180K
- Lyon, D. K., Miller, W. K., Novet, T., Domaille, P. J., Evitt, E., Johnson, D. C., & Finke, R. G. (1991). Highly oxidation resistant inorganic-porphyrin analog polyoxometalate oxidation catalysts. 1. The synthesis and characterization of aqueous-soluble potassium salts of .alpha.2-P2W17O61(Mn+.cntdot.OH2)(n-10) and organic solvent soluble tetra-n-butylammonium salts of .alpha.2-P2W17O61(Mn+.cntdot.Br)(n-11) (M = Mn3+,Fe3+,Co2+,Ni2+,Cu2+). *Journal of the American Chemical Society*, 113(19), 7209-7221. doi:10.1021/ja00019a018



- Pachanawan, A., Phumkhachorn, P., & Rattanachaiakunsopon, P. (2008). Potential of Psidium guajava supplemented fish diets in controlling Aeromonas hydrophila infection in tilapia (Oreochromis niloticus). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(5), 419-424.
- Pham, T. T., Nguyen, T. H., Thi, T. V., Nguyen, T.-T., Le, T. D., Vo, D. M. H., . . . Bach, L. G. (2019). Investigation of Chitosan Nanoparticles Loaded with Protocatechuic Acid (PCA) for the Resistance of Pyricularia oryzae Fungus against Rice Blast. *Polymers*, 11(1).  
<https://europepmc.org/articles/PMC6401867?pdf=render&doi=10.3390/polym11010177>
- Praja, R. K. (2018). The infection of Vibrio parahaemolyticus in shrimp and human. *Oceana Biomedicina Journal*, 1(1), 44-58.
- Sharma, A., Rajendran, S., Srivastava, A., Sharma, S., & Kundu, B. (2017). Antifungal activities of selected essential oils against Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici 1322, with emphasis on Syzygium aromaticum essential oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(3), 308-313.  
 doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.09.011>
- Soto-Rodriguez, S. A., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt-Lozano, M., & Morales-Covarrubias, M. S. (2015). Field and experimental evidence of Vibrio parahaemolyticus as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (Litopenaeus vannamei) in Northwestern Mexico. *Applied and environmental microbiology*, 81(5), 1689-1699.
- Wikler MA, C. F., Bush K, Dudley MN, Eliopoulos GM, Hardy DJ, et al. (2009). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard - eighth edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
- Yang, P., Bassil, B. S., Lin, Z., Haider, A., Alfaro-Espinoza, G., Ullrich, M. S., . . . Kortz, U. (2015). Organoantimony(III)-Containing Tungstoarsenates(III): From Controlled Assembly to Biological Activity. *Chem. Eur. J.*, 21(44), 15600-15606.  
 doi:10.1002/chem.201502398
- Yang, P., Lin, Z., Alfaro-Espinoza, G., Ullrich, M. S., Raț, C. I., Silvestru, C., & Kortz, U. (2016). 19-Tungstodiarсенate(III) Functionalized by Organoantimony(III) Groups: Tuning the Structure–Bioactivity Relationship. *Inorg. Chem.*, 55(1), 251-258.  
 doi:10.1021/acs.inorgchem.5b02189