

COMPARISON THE ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST *FUSARIUM OXYSPORUM* OF 12 DIFFERENT ESSENTIAL OIL ENCAPSULATED IN NANOEMULSION AND THEIR COMBINATION

Nguyen Minh Hiep*, Tran Thi Ngoc Mai

Center of Radiation Technology and Biotechnology - Nuclear Research Institute

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 04/11/2022	The study aims to evaluate the <i>in vitro</i> antifungal activity against <i>Fusarium oxysporum</i> of 12 plant essential oils encapsulated nanoemulsion (EO-LNs) and their binary and ternary combined formulations of the 4 EOs having the highest <i>in vitro</i> antifungal activity. Firstly, 12 EO-LNs were prepared by a combining method of homogenization and sonication. Their binary and ternary combined formulations were also prepared by mixing with an equal volume ratio of each EO-LNs. <i>In vitro</i> antifungal activity of 12 EO-LNs and their combined formulations was evaluated using petri dish assay. The results indicated that 12 EO-LNs and their combined formulations were successfully prepared with the mean particle size at the nanoscale and the zeta potential greater than -42 mV. The results also showed that the combined formulations of EO-LNs had better antifungal activity against <i>F. oxysporum</i> compared to the corresponding individual EO-LNs. Specially, naTS exhibited the highest <i>in vitro</i> antifungal effect with the growth inhibition value of 88.14% at 500 times dilution. Therefore, naTS has a great potential application as an effective biofungicide against <i>F. oxysporum</i> .
Revised: 20/12/2022	
Published: 27/12/2022	
KEYWORDS	
Essential oil	
Nanoemulsion	
<i>Fusarium oxysporum</i>	
Antifungal	
Combination	

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤM *FUSARIUM OXYSPORUM* CỦA 12 LOẠI NANO TINH DẦU THỰC VẬT KHÁC NHAU VÀ CÁC CÔNG THỨC KẾT HỢP CỦA CHÚNG

Nguyễn Minh Hiệp*, Trần Thị Ngọc Mai

Trung tâm Công nghệ bức xạ và Công nghệ sinh học - Viện Nghiên cứu Hạt nhân

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 04/11/2022	Nghiên cứu nhằm mục đích đánh giá hiệu quả ức chế nấm <i>Fusarium oxysporum</i> trong điều kiện <i>in vitro</i> của 12 loại tinh dầu thực vật ở dạng nano (EO-LNs) và hệ kết hợp hai và ba của 4 loại tinh dầu tốt nhất. Đầu tiên, 12 EO-LNs đã được chuẩn bị bằng phương pháp đồng hóa tốc độ cao kết hợp với giảm kích thước bằng sóng siêu âm. Hệ tinh dầu kết hợp hai và kết hợp ba được tạo thành khi trộn các EO-LNs với tỉ lệ bằng nhau. Hiệu quả kháng nấm <i>in vitro</i> của 12 EO-LNs và dạng kết hợp của chúng được đánh giá bằng phương pháp đĩa thạch. Kết quả chỉ ra rằng, 12 EO-LNs đã được tổng hợp thành công với kích thước hạt trung bình ở mức nano và thế zeta lớn hơn -42 mV. Kết quả cũng cho thấy, dạng kết hợp của EO-LNs cho hiệu quả ức chế nấm <i>F. oxysporum</i> tốt hơn so với dạng đơn lẻ tương ứng. Đặc biệt, naTS cho thấy hiệu quả kháng nấm tốt nhất trong điều kiện <i>in vitro</i> với hiệu quả ức chế nấm đạt 88,14% ở độ pha loãng 500 lần. Do đó, naTS có tiềm năng ứng dụng như là thuốc trị nấm sinh học chống lại nấm <i>F. oxysporum</i> .
Ngày hoàn thiện: 20/12/2022	
Ngày đăng: 27/12/2022	
TỪ KHÓA	
Tinh dầu thực vật	
Hệ mang nano	
<i>Fusarium oxysporum</i>	
Kháng nấm	
Kết hợp	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6871>

* Corresponding author. Email: jackminhhiep@yahoo.com

1. Đặt vấn đề

Nấm *Fusarium oxysporum* thuộc họ Ascomycota, là loài nấm hoại sinh, tồn tại trong cả đất, nước và không khí. *F. oxysporum* phân bố trên toàn thế giới và được coi là tác nhân gây bệnh thực vật quan trọng, thường gây thối rữa, cháy lá, héo mạch [1], [2]. Tuy nhiên, không phải chủng *F. oxysporum* nào cũng gây bệnh thực vật, phần lớn các chủng gây bệnh thường có tính đặc hiệu với một số kí chủ chuyên biệt [3]. Các bệnh do nấm *F. oxysporum* rất khó phòng trừ vì bào tử tồn tại qua thời gian dài trong đất. Nhiều phương pháp phòng trừ nấm đã được thực hiện như: luân canh, sử dụng giống kháng bệnh, thuốc trừ nấm hóa học, sử dụng vi sinh vật đối kháng, chiết xuất thực vật, ... [4], [5]. Trong những năm gần đây, tinh dầu đã có nhiều nghiên cứu ứng dụng trong kiểm soát nấm gây bệnh cây trồng. Điều này là do tinh dầu thường thân thiện với môi trường, có thời gian phân hủy nhanh, an toàn cho người sử dụng và có đa cơ chế tác dụng nên hạn chế sự kháng thuốc của các sinh vật gây hại. Tuy nhiên, hiện nay, việc sử dụng các tinh dầu thực vật trong điều kiện thực tế còn rất thấp vì các loại tinh dầu thường có độ phân tán trong nước thấp, tính thấm kém và kém bền dưới tác động của điều kiện môi trường (pH, nhiệt độ, độ ẩm, hàm lượng chất hữu cơ, v.v.) nên hiệu quả sử dụng thực tế thường không cao [6], [7]. Bên cạnh đó, việc sử dụng tinh dầu ở dạng thô (dạng dầu) có chi phí cao, vì vậy việc sử dụng tinh dầu trong thực tiễn sản xuất còn rất ít. Do đó, để tăng hiệu quả sử dụng, hệ nhũ nano bản chất lipid đã được sử dụng bởi giá thành rẻ, bảo vệ hoạt chất khỏi các điều kiện bất lợi của môi trường và có khả năng làm tăng hiệu quả sử dụng lên từ 3-5 lần [8].

Trong nghiên cứu này, với mục tiêu bước đầu đánh giá hiệu quả kháng nấm *F. oxysporum* của 12 loại tinh dầu thực vật ở dạng nano và sự kết hợp của 4 loại tinh dầu tốt nhất trong điều kiện *in vitro*, đầu tiên, hệ nhũ nano bản chất lipid chứa tinh dầu được tổng hợp bằng phương pháp đồng hóa tốc độ cao kết hợp với sóng siêu âm để giảm kích thước. Sau đó, hiệu quả ức chế nấm *in vitro* đã được thực hiện bằng phương pháp đĩa thạch.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và hóa chất

Tinh dầu thực vật gồm: ớt, mù tạt, bạc hà, sả chanh, đinh hương, bạch đàn, tỏi, vỏ quế, húng quế, oải hương, sả java, gừng (Công ty TNHH tinh dầu thảo dược Dalosa, Việt Nam cung cấp); Chủng nấm *F. oxysporum* phân lập từ cây chanh dây (Viện nghiên cứu hạt nhân Đà Lạt cung cấp).

2.2. Tổng hợp hệ nhũ nano bản chất lipid chứa tinh dầu thực vật (EO-LNs)

EO-LNs được tổng hợp bằng phương pháp đồng hóa tốc độ cao kết hợp với sử dụng sóng siêu âm của Nguyễn Minh Hiệp và cộng sự (2022) có sửa đổi [8]. Cụ thể, 3 g tinh dầu (ớt, mù tạt, bạc hà, sả chanh, đinh hương, bạch đàn, tỏi, vỏ quế, húng quế, oải hương, sả java, gừng) được cho vào hỗn hợp chứa 3 g chất hoạt động bề mặt gồm lecithin và tween 80 (1:1, w/w) đã được khuấy tan trong nước nóng ở 100°C. Sau đó, hỗn hợp dung dịch được đồng hóa ở 24000 vòng/phút trong 4 phút và được giảm kích thước bằng sóng siêu âm sử dụng thiết bị Ultrasonic Liquid Processor trong 4 phút, công suất 25%, để thu được dịch phân tán LNs chứa tinh dầu ớt (naO), mù tạt (naM), bạc hà (naB), sả chanh (naS), đinh hương (naĐ), vỏ quế (naQ), bạch đàn (naD), tỏi (naT), húng quế (naH), oải hương (naA), sả java (naJ), gừng (naG). Các công thức kết hợp hai và kết hợp ba giữa các loại nano tinh dầu lần lượt được phối trộn theo tỉ lệ 1:1 (v/v) và 1:1:1 (v/v/v).

2.3. Phân tích đặc điểm của các hệ nano chứa tinh dầu thực vật

Kích thước hạt, chỉ số phân tán, thế zeta, độ bền của hệ nano chứa tinh dầu được xác định bằng thiết bị Zetasizer Nano ZS. Cụ thể, dịch phân tán nano được pha loãng 100 lần với nước cất 2 lần, sau đó trộn đều dung dịch bằng máy Vortex. Phép đo được thực hiện ở 25°C với góc đo 173°. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần (n=3) cho mỗi mẫu nano tinh dầu.

2.4. Khảo sát hiệu quả ức chế nấm *F. oxysporum* của các hệ nano chứa tinh dầu thực vật trong điều kiện *in vitro*

Hiệu quả ức chế nấm *F. oxysporum* của các chế phẩm hệ nano chứa tinh dầu thực vật ở dạng riêng lẻ và kết hợp được thực hiện bằng phương pháp đĩa thạch [8]. Cụ thể, thí nghiệm được thực hiện trên môi trường PDA, sau khi hấp khử trùng, để nguội môi trường khoảng 50°C, bổ sung dịch phân tán (hoặc hỗn hợp dịch phân tán) nano tinh dầu thực vật với độ pha loãng khác nhau lần lượt là 250 lần (tương ứng nồng độ tinh dầu là 12 µl/mL), 500 lần (tương ứng nồng độ tinh dầu là 6 µl/mL), 600 lần (tương ứng nồng độ tinh dầu là 5 µl/mL). Với mẫu đối chứng là mẫu không có bổ sung dịch phân tán nano. Cây tản nấm với đường kính 6 mm lên giữa đĩa môi trường đã được chuẩn bị. Các đĩa sau đó được nuôi cấy trong tủ ẩm có nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, theo dõi sự phát triển của tản nấm thông qua đường kính tản nấm sau khi cấy 5 ngày. Thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần. Hiệu quả ức chế nấm được tính theo công thức (1):

$$\text{Hiệu quả ức chế nấm (\%)} = \frac{D_c - D_t}{D_c} \times 100 \quad (1)$$

Trong đó:

- D_c là đường kính tản nấm trên môi trường đối chứng
- D_t là đường kính tản nấm trên môi trường có bổ sung tinh dầu.

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

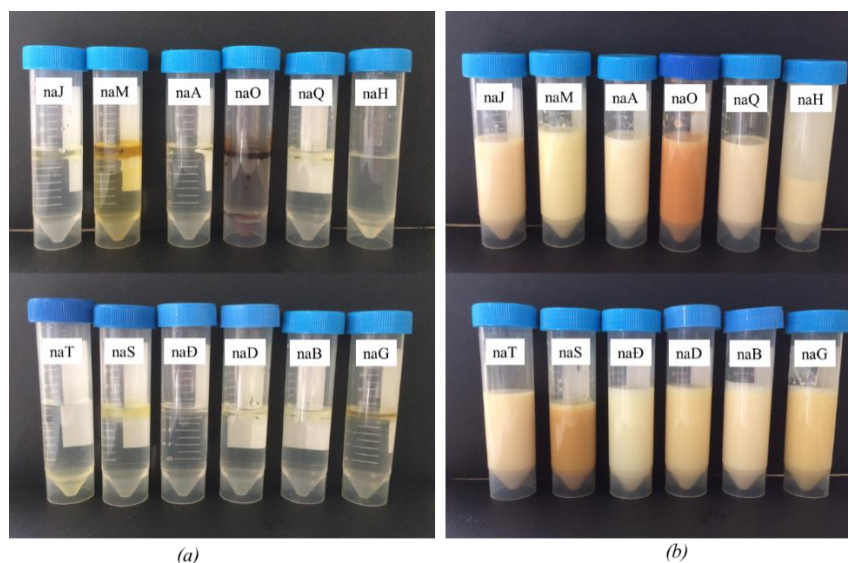
Số liệu được tính toán bằng phần mềm Microsoft excel. Số liệu được trình bày ở dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn ($n = 3$). Ở thí nghiệm *in vitro*, kết quả Bảng 2, Bảng 4 đánh giá độ tin cậy thông qua phân tích thống kê SPSS, phương pháp One-way anova, phép thử Duncan (độ tin cậy $p < 0,05$).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tổng hợp hệ nano chứa tinh dầu thực vật

Hệ nano của 12 loại tinh dầu thực vật (naO, naM, naB, naS, naĐ, naQ, naG, naJ, naT, naH, naA, naD) đã được tổng hợp thành công bằng phương pháp đồng hóa tốc độ cao kết hợp với sóng siêu âm. Như được trình bày ở Bảng 1, hệ nano của 12 loại tinh dầu thực vật được tổng hợp đều có kích thước trung bình ở cấp độ nano (nhỏ hơn 211 nm). Trong đó, hệ nano tinh dầu mù tạt (naM) có kích thước hạt lớn nhất (210,1 nm) và hệ nano tinh dầu gừng (naG) có kích thước hạt nhỏ nhất (82,68 nm). Điều này là do các hệ mang nano được tổng hợp với cùng tỉ lệ chất hoạt động bề mặt giữa tween và lecithin (1:1, w/w) nên có giá trị HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) là như nhau; trong khi các tinh dầu sử dụng thì mỗi loại có giá trị RHLB (Required Hydrophilic Lipophilic Balance) khác nhau [8]. Bên cạnh đó, với kích thước hạt nhỏ thì tất cả các hệ mang nano trên đều có thể dễ dàng tiếp xúc, thẩm và tác dụng lên nấm gây hại.

Thêm vào đó, Hình 1 cho thấy, tinh dầu được đóng gói trong hệ mang nano có độ phân tán tốt hơn tinh dầu ở dạng thông thường. Cụ thể, ban đầu, tinh dầu mù tạt có màu vàng đậm và nổi lên bề mặt nước nhưng sau khi được đóng gói vào trong hệ mang nano, dịch phân tán nano tinh dầu mù tạt có màu vàng nhạt, phân tán đồng đều trong nước. Tương tự, các loại tinh dầu còn lại sau khi tổng hợp đều có khả năng phân tán tốt trong môi trường nước. Từ đó cho thấy, 12 loại tinh dầu đều được đóng gói thành công vào hệ mang nano bản chất lipid.



Hình 1. Độ phân tán của một số loại tinh dầu thực vật trong nước (a) dạng thông thường; (b) dạng nano

Bảng 1. Thông số đặc điểm của các hệ nano chứa tinh dầu thực vật ($n = 3$)

Hệ EO-LNs	Kích thước hạt trung bình (nm)	Chỉ số phân tán (PDI)	Thế zeta (mV)	Kích thước hạt trung bình sau 3 tháng (nm)	Thế zeta sau 3 tháng (mV)
naO	$185,13 \pm 0,71$	$0,366 \pm 0,004$	$-42,73 \pm 0,47$	$186,33 \pm 3,51$	$-40,76 \pm 1,21$
naM	$210,10 \pm 1,00$	$0,382 \pm 0,003$	$-53,70 \pm 1,26$	$211,77 \pm 2,51$	$-51,50 \pm 1,20$
naB	$89,93 \pm 0,56$	$0,214 \pm 0,006$	$-52,73 \pm 1,32$	$92,53 \pm 1,10$	$-50,60 \pm 0,26$
naS	$113,20 \pm 0,79$	$0,204 \pm 0,002$	$-44,13 \pm 0,52$	$120,54 \pm 0,41$	$-43,63 \pm 0,78$
naĐ	$181,86 \pm 1,15$	$0,171 \pm 0,003$	$-42,77 \pm 0,82$	$184,40 \pm 2,36$	$-40,83 \pm 0,38$
naQ	$127,84 \pm 1,72$	$0,294 \pm 0,004$	$-46,87 \pm 0,45$	$128,35 \pm 1,24$	$-45,46 \pm 0,25$
naD	$106,23 \pm 1,78$	$0,372 \pm 0,025$	$-50,10 \pm 1,02$	$107,45 \pm 1,36$	$-48,36 \pm 0,51$
naT	$121,86 \pm 1,79$	$0,363 \pm 0,002$	$-50,37 \pm 0,75$	$129,83 \pm 1,56$	$-47,83 \pm 0,73$
naH	$92,03 \pm 0,63$	$0,212 \pm 0,010$	$-43,60 \pm 0,53$	$93,15 \pm 1,03$	$-42,63 \pm 0,50$
naA	$159,40 \pm 1,92$	$0,266 \pm 0,002$	$-52,73 \pm 0,59$	$160,10 \pm 1,62$	$-50,46 \pm 0,40$
naJ	$92,43 \pm 0,52$	$0,203 \pm 0,002$	$-53,27 \pm 1,21$	$93,98 \pm 0,58$	$-51,80 \pm 0,36$
naG	$82,68 \pm 0,40$	$0,233 \pm 0,003$	$-47,53 \pm 0,75$	$84,57 \pm 0,51$	$-45,46 \pm 0,40$

Hơn nữa, chỉ số phân tán (PDI) của các hệ mang nano đều không chênh lệch đáng kể và có giá trị khoảng 0,2-0,4. Điều này cho thấy sự đồng đều về mặt kích thước giữa các hạt trong các dịch phân tán nano. Ngoài ra, giá trị tuyệt đối thế zeta của EO-LNs của các hệ này cũng đều lớn hơn 40 mV, từ đó cho thấy hệ có độ ổn định cao. Theo nghiên cứu của Mehnert và cộng sự khi thế zeta của các hệ nano có giá trị tuyệt đối lớn hơn 20 mV sẽ tạo lực đẩy tĩnh điện đủ lớn để giúp ngăn cản các hạt kết hợp lại với nhau để tạo ra hạt có kích thước lớn hơn, từ đó giúp cho hệ nano có độ ổn định cao [8], [9]. Kết quả Bảng 1 cũng đã khẳng định được 12 hệ EO-LNs có độ bền cao thể hiện qua sự thay đổi không đáng kể của kích thước hạt và thế zeta. Cụ thể, sau 3 tháng, kích thước hạt của các hệ nano chỉ dao động từ 84,57-211,77 nm và giá trị tuyệt đối của thế zeta vẫn lớn hơn 40 mV.

3.2. Hiệu quả ức chế nấm trong điều kiện *in vitro*

3.2.1. Hiệu quả ức chế nấm *F. oxysporum* của các chế phẩm hệ nano chứa tinh dầu thực vật ở dạng riêng lẻ

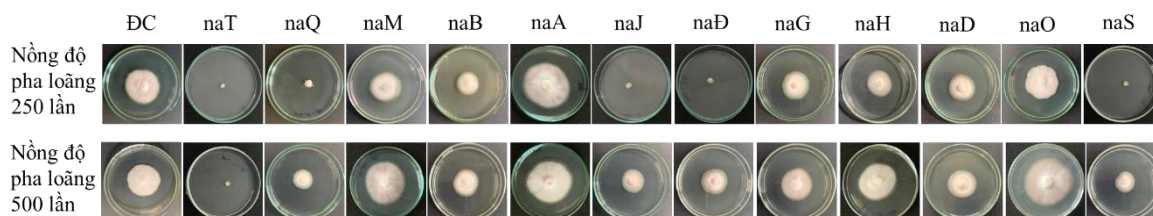
Hiệu quả ức chế nấm trong điều kiện *in vitro* đã được thực hiện bằng phương pháp đĩa thạch. Từ kết quả ở Hình 2 cho thấy, sau 5 ngày nuôi cấy, ở mẫu đối chứng sợi nấm có màu trắng ngà,

phát triển mạnh. Trong khi đó, ở các mẫu có bổ sung EO-LNs đều cho hiệu quả ức chế nấm. Cụ thể, ở nồng độ pha loãng 250 lần (tương ứng với nồng độ tinh dầu là 12 $\mu\text{g/mL}$), naT, naS, naQ, naĐ và naJ cho hiệu quả ức chế hoàn toàn đạt 100%. Trong khi đó, hiệu quả ức chế nấm của các hệ mang nano còn lại đều thấp hơn 63%. Khi tăng nồng độ pha loãng lên 500 lần (tương ứng với nồng độ tinh dầu là 6 $\mu\text{g/mL}$), hiệu quả ức chế nấm của các loại tinh dầu khác đều giảm đáng kể, chỉ có naT, naS, naQ, naĐ vẫn cho hiệu quả cao trên 65% lần lượt là 78,81%, 66,10%, 68,64% và 69,49% (Bảng 2). Từ các kết quả trên cho thấy, hiệu quả ức chế nấm *F. oxysporum* của hệ nano tinh dầu tỏi, quế, sả chanh và đinh hương tốt hơn so với các hệ nano tinh dầu còn lại. Do đó, hệ nano tinh dầu của tỏi, quế, sả chanh và đinh hương được chọn cho các công thức kết hợp hai và kết hợp ba.

Bảng 2. Hiệu quả ức chế nấm *F. oxysporum* ($n = 3$)

Hệ EO-LNs	Nồng độ pha loãng 250 lần	Nồng độ pha loãng 500 lần
naT	100,00 $\pm$ 0,00 ^a	78,81 $\pm$ 1,65 ^a
naS	100,00 $\pm$ 0,00 ^a	66,10 $\pm$ 4,26 ^b
naQ	100,00 $\pm$ 0,00 ^a	68,64 $\pm$ 1,75 ^b
naM	13,91 $\pm$ 1,68 ^f	-11,02 $\pm$ 5,41 ^h
naB	48,70 $\pm$ 3,50 ^c	38,14 $\pm$ 2,07 ^d
naA	3,48 $\pm$ 2,97 ^g	-9,32 $\pm$ 3,78 ^g
naJ	100,00 $\pm$ 0,00 ^a	44,92 $\pm$ 2,11 ^c
naĐ	100,00 $\pm$ 0,00 ^a	69,49 $\pm$ 2,92 ^b
naG	25,22 $\pm$ 1,01 ^e	14,41 $\pm$ 2,70 ^e
naH	37,39 $\pm$ 2,17 ^d	0,85 $\pm$ 1,48 ^f
naD	62,61 $\pm$ 0,51 ^b	37,29 $\pm$ 1,30 ^d
naO	-1,74 $\pm$ 3,12 ^h	-5,93 $\pm$ 1,52 ^g

Ghi chú: Các chữ cái a, b, c, d, e, f, g, h chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các dòng trong 1 cột, với $p < 0,05$ qua phép thử Duncan.



Hình 2. Hiệu quả ức chế nấm của 12 hệ nano tinh dầu thực vật

3.2.2. Hiệu quả ức chế nấm *F. oxysporum* của các chế phẩm hệ nano chứa tinh dầu thực vật ở dạng kết hợp

Kết quả Bảng 3 cho thấy, khi kết hợp các hệ nano tinh dầu thực vật với nhau (kết hợp hai: naQS, naQT, naTS, naTĐ, naSĐ, naQĐ và kết hợp ba: naQTS, naQSĐ, naĐQT, naĐTS), thì các dịch phân tán nano tạo thành không có sự khác biệt đáng kể về kích thước hạt, chỉ số phân tán và thế zeta. Cụ thể, kích thước hạt của các hệ không vượt quá 231 nm với hệ kết hợp hai và 217 nm với hệ kết hợp ba. Thêm vào đó, dung dịch phân tán nano này không có hiện tượng gì bất thường như kết tủa, tách lớp hay tạo thành phản ứng hóa học với nhau. Điều này cho thấy khả năng kết hợp của các loại nano tinh dầu bằng cách phối trộn chúng với nhau. Hơn nữa, kết quả cũng cho thấy kích thước hạt và giá trị tuyệt đối thế zeta của các công thức kết hợp này không có sự thay đổi đáng kể sau 3 tháng. Cụ thể, kích thước hạt có sự tăng nhẹ nhưng vẫn nhỏ hơn 235 nm và giá trị tuyệt đối thế zeta của các hệ tuy có giảm nhưng vẫn lớn hơn 39 mV. Từ đó cho thấy, các hệ kết hợp vẫn giữ được tính chất của các hệ nano tinh dầu đơn lẻ và duy trì độ ổn định trong thời gian dài.

Bảng 3. Thông số đặc điểm của các hệ EO-LNs kết hợp ($n = 3$)

EO-LNs	Kích thước hạt (nm)	Chỉ số phân tán (PDI)	Thế zeta (mV)	Kích thước hạt sau 3 tháng (nm)	Thế zeta sau 3 tháng (mV)
naQT	127,68 ± 0,55	0,296 ± 0,001	-40,03 ± 2,40	128,61 ± 1,25	-39,37 ± 1,03
naĐT	230,91 ± 1,45	0,365 ± 0,004	-42,63 ± 0,50	233,71 ± 1,20	-41,64 ± 0,51
naQS	210,10 ± 0,83	0,205 ± 0,003	-45,80 ± 0,36	212,70 ± 0,55	-43,71 ± 0,62
naTS	86,61 ± 0,56	0,217 ± 0,006	-46,90 ± 0,50	88,55 ± 1,24	-45,73 ± 0,48
naĐQ	133,80 ± 1,14	0,223 ± 0,004	-43,07 ± 0,55	138,54 ± 1,50	-40,27 ± 0,73
naĐS	186,61 ± 1,36	0,172 ± 0,003	-47,23 ± 0,57	187,63 ± 2,11	-46,03 ± 0,44
naQTS	216,68 ± 0,93	0,295 ± 0,003	-45,77 ± 0,61	217,61 ± 1,36	-44,59 ± 0,50
naĐQT	135,91 ± 1,17	0,209 ± 0,007	-44,57 ± 0,65	138,31 ± 2,07	-41,13 ± 0,77
naĐQS	117,81 ± 1,20	0,380 ± 0,009	-44,90 ± 1,36	118,45 ± 1,28	-43,60 ± 0,87
naĐTS	166,84 ± 0,11	0,386 ± 0,005	-46,23 ± 0,76	168,07 ± 1,59	-42,67 ± 0,55

Bên cạnh đó, khi kết hợp hai hệ nano tinh dầu đã cho thấy hiệu quả ức chế nấm tốt hơn. Cụ thể, ở nồng độ pha loãng 500 lần (tương ứng với nồng độ tinh dầu trong công thức là 6 µg/mL), khi sử dụng kết hợp hệ nano tinh dầu đinh hương và hệ nano tinh dầu sả chanh tạo thành hệ NaĐS cho hiệu quả ức chế nấm là 75,42%. Trong khi đó, ở cùng nồng độ pha loãng (tương ứng với nồng độ tinh dầu là 6 µg/mL), hệ naĐ và NaS đơn lẻ chỉ cho hiệu quả ức chế nấm thấp hơn 70%, lần lượt là 69,49 và 66,10%. Tương tự với hệ naTS, ở nồng độ pha loãng 500 lần, hiệu quả của hệ kết hợp là 88,14% cao hơn hệ naT 9,33% và cao hơn hệ NaS 22,04%. Kết quả này cho thấy, khi kết hợp các hệ nano tinh dầu đơn lẻ với nhau thì hiệu quả ức chế nấm cao hơn. Tuy nhiên, cũng có trường hợp cho hiệu quả ức chế nấm kém hơn như naQT hay naĐT.

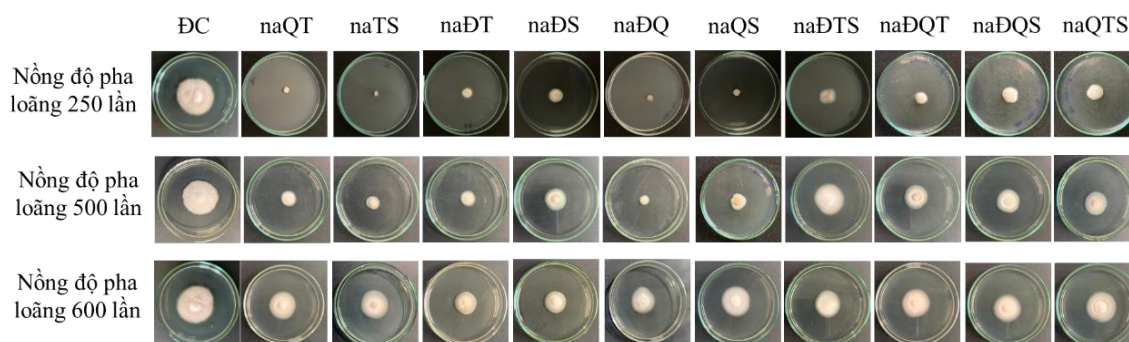
Thêm vào đó, khi kết hợp ba hệ nano tinh dầu tạo thành hệ NaQTS, NaQSĐ, NaĐQT, NaĐTS cũng cho thấy hiệu quả ức chế nấm tốt hơn hệ tinh dầu đơn lẻ nhưng kém hơn hệ tinh dầu kết hợp hai. Cụ thể, ở nồng độ pha loãng 250 lần (tương ứng với nồng độ tinh dầu là 12 µg/mL) hệ kết hợp ba chỉ cho hiệu quả ức chế nấm đạt từ 85,59 đến 88,14%, trong khi đó, tất cả các hệ kết hợp hai đều cho hiệu quả đạt từ 91,53% đến 100% (Bảng 4).

Kết quả này cho thấy, đối với chủng nấm *F. oxysporum* hiệu quả ức chế nấm của các hệ kết hợp có hiệu quả hơn hệ đơn lẻ và hệ kết hợp ba loại nano tinh dầu cho hiệu quả kém hơn hệ kết hợp hai loại nano tinh dầu. Điều này cũng phù hợp với một số nghiên cứu trước đây của Nguyễn Minh Hiệp và cộng sự (2022), Trần Thị Ngọc Mai và cộng sự (2020). Cụ thể, các nghiên cứu này đã cho thấy việc kết hợp các hệ nano tinh dầu vào trong một chế phẩm sẽ cho hiệu quả ức chế nấm tốt hơn, tuy nhiên không phải lúc nào kết hợp ba cũng cho hiệu quả cao hơn kết hợp hai, điều này phụ thuộc vào chủng nấm và loại tinh dầu [8], [10].

Bảng 4. Hiệu quả ức chế nấm của hệ nano tinh dầu kết hợp

Hệ EO-LNs	Nồng độ pha loãng 250 lần	Nồng độ pha loãng 500 lần	Nồng độ pha loãng 600 lần
naQT (naQ+naT)	100,00 ± 0,00 ^a	75,59 ± 1,67 ^c	49,17 ± 1,74 ^c
naTS (naT+naS)	100,00 ± 0,00 ^a	88,14 ± 3,04 ^a	63,33 ± 3,75 ^a
naĐT (naĐ+naT)	91,53 ± 3,05 ^b	73,73 ± 2,78 ^c	47,83 ± 0,72 ^c
naĐS (naĐ+naS)	92,37 ± 2,37 ^b	75,42 ± 3,14 ^c	53,33 ± 1,88 ^b
naĐQ (naĐ+naQ)	100,00 ± 0,00 ^a	86,44 ± 3,67 ^{ab}	63,33 ± 0,80 ^a
naQS (naQ+naS)	100,00 ± 0,00 ^a	82,20 ± 2,31 ^b	61,67 ± 1,71 ^a
naĐTS (naĐ+naT+naS)	85,59 ± 1,06 ^c	58,47 ± 1,85 ^d	39,17 ± 0,78 ^d
naĐQT (naĐ+naQ+naT)	85,59 ± 1,72 ^c	48,31 ± 3,16 ^e	28,33 ± 2,33 ^e
naĐQS (naĐ+naQ+naS)	88,14 ± 2,75 ^c	57,63 ± 2,07 ^d	38,33 ± 2,14 ^d
naQTS (naQ+naT+naS)	87,29 ± 2,24 ^c	50,00 ± 2,18 ^e	24,17 ± 3,25 ^f

Ghi chú: Các chữ cái a, b, c, d, e, f chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các dòng trong 1 cột, với $p < 0,05$ qua phép thử Duncan



Hình 3. Hiệu quả ức chế nấm của hệ nano tinh dầu kết hợp. Hệ kết hợp hai: naQT, naTS, naDT, naDS, naDQ, naQS; hệ kết hợp ba: naDTS, naDQT, naDQS, naQTS

4. Kết luận

Bằng phương pháp đồng hóa tốc độ cao kết hợp với sóng siêu âm để giảm kích thước hạt, hệ EO-LNs của 12 loại tinh dầu thực vật đã được tổng hợp thành công với kích thước hạt trung bình nhỏ hơn 250 nm, thế zeta có giá trị tuyệt đối lớn hơn 42 mV. Kết quả cho thấy các hệ nano này có độ bền cao và có thể bảo quản trong thời gian dài (trên 3 tháng). Thí nghiệm *in vitro* đã chứng minh sự kết hợp giữa các loại tinh dầu ở dạng nano cho hiệu quả ức chế nấm *F. oxysporum* tốt hơn so với dạng riêng lẻ, trong đó công thức kết hợp hai cho hiệu quả tốt hơn công thức kết hợp ba. Kết quả cũng đã chỉ ra công thức naTS cho hiệu quả ức chế nấm *F. oxysporum* tốt nhất đạt 88,14% ở nồng độ pha loãng 500 lần (tương ứng nồng độ tinh dầu là 6 µg/mL). Từ đó cho thấy tiềm năng ứng dụng của hệ kết hợp hai loại nano tinh dầu tỏi, sả trong việc ức chế nấm *F. oxysporum* gây bệnh trên cây trồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] D. Miller, "Factors that affect the occurrence of fumonisin environmental health perspectives," *Mycology*, vol. 109, pp. 321-324, 2001.
- [2] T. Arie, "Fusarium diseases of cultivated plants, control, diagnosis, and molecular and genetic studies," *Journal of Pesticide Science*, vol. 44, no. 4, pp. 275-281, 2019.
- [3] J. F. Leslie and B. A. Summerell (Eds), *The Fusarium Laboratory Manual*. USA: Blackwell Publishing, 2006.
- [4] C. Xiao and R. Li, "Detection and Control of *Fusarium oxysporum* from soft rot in dendrobium officinale by loop-mediated isothermal amplification assays," *Biology (basel)*, vol. 10, no. 11, pp. 2-4, 2021.
- [5] F. J. de Lamo and F. L. W. Takken, "Biocontrol by *Fusarium oxysporum* using endophyte-mediated resistance," *Frontiers in Plant Science*, no. 11, pp. 2-5, 2020.
- [6] A. E. Asbahani, K. Miladi, W. Badri, M. Sala, E. H. A. Addi, H. Casabianca, A. El Mousadik, D. Hartmann, A. Jilale, F. N. R. Renaud, and A. Elaissari, "Essential oils: From extraction to encapsulation," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 483, no. 1-2, pp. 220-243, 2015.
- [7] R. Raveau, J. Fontaine, and A. L. Sahraoui, "Essential oils as potential alternative biocontrol products against plant pathogens and weeds: A Review," *Foods*, vol. 9, no. 3, pp. 1-31, 2020.
- [8] M. H. Nguyen, T. N. M. Tran, and N. B. D. Vu, "Antifungal activity of essential oil-encapsulated lipid nanoemulsions formulations against leaf spot disease on tomato caused by *Alternaria alternata*," *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, vol. 55, no. 2, pp. 235-257, 2022.
- [9] W. Mehnert and K. Mäder, "Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications," *Advanced Drug Delivery Reviews*, no. 47, pp. 165-196, 2001.
- [10] T. N. M. Tran, N. B. D. Vu, N. T. T. Nguyen, T. H. N. Nguyen, M. H. Nguyen, "Investigation of inhibitory effect of mixture of nanocarriers encapsulating chili, garlic and lemongrass oil on *Alternaria* sp. causing leaf spot disease," (in Vietnamese), *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 7, no. 166, pp. 141-145, 2020.