

DOI:10.22144/ctu.jvn.2021.074

HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM CỦA TINH DẦU *Citrus* TRÊN VI NẤM *Achlya* sp. GÂY BỆNH TRÊN CÁ LÓC

Đặng Thụy Mai Thy^{1*}, Trần Thị Tuyết Hoa¹ và Nguyễn Trọng Tuân²

¹Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

²Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Đặng Thụy Mai Thy (email: dmthy@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 22/02/2021

Ngày nhận bài sửa: 09/04/2021

Ngày duyệt đăng: 01/06/2021

Title:

Antifungal activity of *Citrus* essential oils against *Achlya* sp. snakehead pathogen

Từ khóa:

Achlya, *Citrus*, MFC, MIC, tinh dầu

Keywords:

Achlya, *Citrus*, essential oils, MFC, MIC

ABSTRACT

This study was carried out to determine the effects of essential oils *Citrus* as anti-fungal agents on *Achlya* sp. Essential oils were extracted from peels of *Citrus aurantifolia*, *Citrus limon* (L.) Burn.f.1768, *Citrus grandis* var. Da xanh, *Citrus grandis* var. Nam roi, *Citrus nonbillis* and *Citrus sinensis* by hydrodistillation method. The antifungal activity, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of essential oils were examined against snakehead pathogenic fungi *Achlya* sp. A.1910 and *Achlya* sp. A.1924 isolated from snakehead fish. The essential oils of *C. aurantifolia* and *C. sinensis* that was found to be the most active against *Achlya* sp. were 0.78 mg/mL after 24 h exposure. The MIC of essential oils of *C. grandis* var. Nam roi and *C. limon* was from 1.56 – 6.3 mg/mL. Antifungal activity of essential oils was *C. aurantifolia*, *C. sinensis*, *C. grandis* var. Nam roi, and *C. Limon* respectively. The hyphae of *Achlya* sp. was completely inhibited when they were exposed to 100, 50, 25 and 12.5 mg/mL of essential oils *Citrus*.

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm khảo sát hoạt tính kháng nấm của tinh dầu *Citrus* trên vi nấm *Achlya* sp. Tinh dầu từ vỏ của chanh giầy (*Citrus aurantifolia*), chanh nùm (*Citrus limon* (L.) Burn.f.1768), bưởi da xanh (*Citrus grandis* var. Da xanh), bưởi năm roi (*Citrus grandis* var. Nam roi), cam sành (*Citrus nonbillis*) và cam mật (*Citrus sinensis*) được trích ly bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước. Hoạt tính kháng nấm, nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), nồng độ kháng nấm tối thiểu (MFC) của tinh dầu được thực hiện với vi nấm *Achlya* sp. A.1910 và *Achlya* sp. A.1924 gây bệnh trên cá lóc. Tinh dầu vỏ chanh giầy và vỏ cam mật có hiệu quả kháng nấm *Achlya* sp. tốt nhất ở nồng độ 0,78 mg/mL sau 24 giờ. Nồng độ MIC của tinh dầu vỏ bưởi năm roi và vỏ chanh nùm từ 1,56 – 6,3 mg/mL. Khả năng kháng nấm của các chiết xuất tinh dầu lần lượt là vỏ chanh giầy, vỏ cam mật, vỏ bưởi năm roi và vỏ chanh nùm. Sợi nấm *Achlya* sp. không phát triển khi ngâm trong tinh dầu *Citrus* ở các nồng độ 100, 50, 25 và 12,5 mg/mL.

1. GIỚI THIỆU

Tinh dầu là một loại chất lỏng chứa các hợp chất thơm dễ bay hơi được chiết xuất bằng cách chưng cất hơi nước hoặc ép lạnh từ lá, thân, hoa, vỏ, rễ hoặc những bộ phận khác của thực vật. Giống *Citrus* như bưởi, cam và chanh được trồng phổ biến ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long. Những loại trái cây này có giá trị dinh dưỡng, cùng với hàm lượng cao các hợp chất hoạt tính sinh học, phenol, flavonoid, limonoids, tinh dầu (EO) và vitamin, đặc biệt là vitamin C và carotenoid, có nhiều lợi ích cho sức khỏe và phòng trị bệnh (Duarte et al., 2016). Các loại tinh dầu này chứa một số thành phần chủ yếu là terpenoid, perillaldehyde, limonene, α -pinene, β -caryophyllene, linalool và perilla alcohol,... Các hợp chất perillaldehyde, phenylpropanoid và α -caryophyllene,... trong tinh dầu tác dụng ức chế các loại vi khuẩn (Đỗ Huy Bích và ctv., 2004). Ngoài ra, tinh dầu *Citrus* có tính chống oxy hóa, diệt côn trùng, kháng nấm và kháng khuẩn có ứng dụng quan trọng trong ngành dược phẩm, vệ sinh, mỹ phẩm, nông nghiệp và thực phẩm (Palazzolo et al., 2013).

Trong những năm gần đây, các sản phẩm có nguồn gốc từ cây dược liệu ngày càng được quan tâm sử dụng trong nuôi trồng thủy sản. Sử dụng thảo dược và chất chiết thảo dược là phương pháp phòng trị bệnh do tác nhân vi nấm gây ra được đánh giá như liệu pháp mới và có hiệu quả (Abad et al., 2007). Nghiên cứu hoạt tính kháng nấm *Saccharomyces cerevisiae* M1 và *Aspergillus niger* L2 của các loại tinh dầu (quế, sả chanh, húng quế, bạc hà) và hỗn hợp của chúng được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch và phương pháp ức chế hệ sợi. Kết quả nghiên cứu cho thấy khi tác động riêng lẻ cả bốn loại tinh dầu các nồng độ 5, 10, 20, 50, 75 và 100 $\mu\text{g/mL}$ đều cho hiệu quả kháng nấm (Liêu Thùy Linh và ctv. 2017). Hơn nữa, vi nấm *Saprolegnia* là nguyên nhân chủ yếu gây bệnh trên nhiều loài động vật thủy sản trong và ngoài nước. Nghiên cứu tinh dầu từ rễ cây *Laureliopsis philippiana* với *Saprolegnia parasitica* và *Saprolegnia australis* cho thấy tinh dầu có khả năng ức chế sự phát triển vi nấm ở MIC 30 $\mu\text{g/mL}$ và MFC 50 $\mu\text{g/mL}$ (Madrid et al., 2015). Nồng độ ức chế tối thiểu của tinh dầu cây bạch đàn, cây sim *Myrtus communis*, cỏ xạ hương *Thymus daenensis*, cây cúc *Matricaria recutita*, cây bạc hà *Mentha longifolia* và cây húng cay *Satureja bachtiarica* với *S. parasitica* ở các nồng độ lần lượt là 2,5; 10; 5; 5; 10 và 5 mL. Hiệu quả kháng nấm tốt nhất của tinh dầu pennyroyal ở nồng độ 5 μL và tinh dầu *T.*

daenensis và *Myrtus* ở nồng độ 10 μL đối với *S. parasitica* (Salehi et al., 2015). Nhìn chung, sử dụng tinh dầu trong phòng trị bệnh do vi nấm ở động vật thủy sản là xu hướng được quan tâm trong những năm gần đây. Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định ảnh hưởng của tinh dầu lên vi nấm *Achlya* gây bệnh trên cá lóc từ đó bổ sung thêm thông tin khoa học về phòng và trị bệnh do vi nấm trên động vật thủy sản.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Mẫu cam mật (*Citrus sinensis*) được thu hái ở xã Tân Lược, huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long. Mẫu chanh giầy (*Citrus aurantifolia*), bưởi năm roi (*Citrus grandis* var. *Nam roi*), bưởi da xanh (*Citrus grandis* var. *Da xanh*) được thu hái ở xã Mỹ Hòa, huyện Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long. Mẫu cam sành (*Citrus nonbillis*), chanh nôm (*Citrus limon* (L.) Burn.f.1768) được thu hái ở xã Phú Hữu, Huyện Châu Thành, Hậu Giang. Nguyên liệu được thu hái lúc 9h sáng, sau đó mang về phòng thí nghiệm rửa sạch, gọt vỏ, xay nhuyễn và tiến hành chưng cất lôi cuốn hơi nước để thu tinh dầu.

2.2. Phương pháp trích ly tinh dầu

Tinh dầu cam, chanh và bưởi được trích ly theo phương pháp của Vekiari et al. (2002) có điều chỉnh, được tiến hành như sau: cân 150 g nguyên liệu vỏ xay nhuyễn, cho vào bình cầu đáy tròn 1.000 mL, rót 500 mL nước cất vào bình sao cho thể tích nước không vượt quá 2/3 thể tích bình cầu. Tiến hành trích ly bằng lôi cuốn hơi nước trong 120 phút. Thu lấy tinh dầu có lẫn nước. Làm khan bằng Na_2SO_4 thu được tinh dầu tinh khiết. Tinh dầu sau khi thu được cho vào chai nhỏ, đậy nắp kín và trữ trong tủ đông (-40°C) cho đến khi sử dụng.

2.3. Nguồn vi nấm

Các chủng vi nấm được lưu trữ tại Bộ môn Bệnh học thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. Vi nấm *Achlya* sp. A1910 và *Achlya* sp. A1924 được phục hồi trên môi trường Glucose Yeast-extract Agar – GYA (1% glucose, 0,25% Yeast-extract và 1,5% agar) ở 28°C trong 5 - 7 ngày để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo (Bảng 1).

2.4. Phương pháp xác định ảnh hưởng của tinh dầu đến sợi nấm

Cắt mẫu agar có nấm thuần (5x5 mm) cho vào các ống nghiệm có chứa 1 mL tinh dầu ở các nồng độ 100; 50; 25; 12,5 và 6,3 mg/mL. Các nồng độ tinh dầu được pha loãng trong dung dịch 10%

DMSO và được sử dụng làm đối chứng và mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Các ống nghiệm được ủ trong tủ ấm ở 28°C và đọc kết quả sau 2 ngày. Trong trường hợp không có sợi nấm phát triển, khối nấm được cấy trên môi trường GYA; sau 3 ngày quan sát và đo đường kính khuẩn lạc vi nấm. So sánh sự phát triển của sợi nấm ở các ống nghiệm ngâm tinh dầu và đối chứng để xác định ảnh hưởng của tinh dầu lên sự phát triển của sợi nấm theo Borisutpeth et al. (2009) có điều chỉnh.

2.5. Phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Tinh dầu có hoạt tính kháng nấm được chọn để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC). Nồng độ ức chế tối thiểu được thực hiện bằng phương pháp pha loãng với tỉ lệ 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64;... Mỗi nồng độ tinh dầu thí nghiệm được lặp lại 3 lần. MIC được xác định là nồng độ thấp nhất của tinh dầu không có vi nấm phát triển (Panchai et al., 2015).

2.6. Phương pháp xác định nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC)

Các nồng độ ức chế tối thiểu sự phát triển của sợi nấm được sử dụng để xác định nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC). Dùng ống cất nấm số 2 cất mẫu

agar có nấm thuần cho vào ống nghiệm ở các nồng độ tinh dầu khác nhau trong 12, 24 và 48 giờ. Sau đó, khối agar có vi nấm này được rửa sạch bằng nước cất tiệt trùng và cấy vào môi trường GYA. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. MFC được xác định là nồng độ thấp nhất của tinh dầu không có vi nấm phát triển (Panchai et al., 2015).

2.7. Phương pháp xử lí số liệu

Số liệu được nhập và tính trung bình bằng phần mềm Excel. So sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức qua phân tích ANOVA 1 nhân tố với phép thử Duncan ở mức ý nghĩa p = 0,05 bằng chương trình Statistica 10.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả ly trích tinh dầu

Sử dụng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước để ly trích tinh dầu các loài *Citrus* từ vỏ được trình bày ở Bảng 1. Đa số trong tinh dầu từ vỏ các loài *Citrus* là các hợp chất hydrocarbon nên tinh dầu thu được là loại tinh dầu nhẹ, có tỷ trọng nhỏ hơn nước nên khi chưng cất tinh dầu nổi trên mặt nước. Cụ thể, tinh dầu vỏ bưởi da xanh có tỷ trọng thấp nhất và tinh dầu vỏ chanh giầy có tỷ trọng cao nhất ở 25°C.

Bảng 1. Tính chất của tinh dầu *Citrus*

| | Cam sành | Cam mật | Bưởi năm roi | Bưởi da xanh | Chanh nùm | Chanh giầy |
|-----------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| Màu sắc | Vàng nhạt | Trắng | Vàng nhạt | Trắng | Vàng nhạt | Vàng nhạt |
| Tỷ trọng (25°C) | 0,820±0,002 | 0,821±0,001 | 0,811±0,001 | 0,806±0,001 | 0,813±0,001 | 0,823±0,001 |

Nguyễn Văn Lợi và ctv. (2014) nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của tinh dầu lá bưởi, cam và chanh cho thấy tinh dầu lá bưởi Yên Thế không có màu, trong suốt, có mùi thơm đặc trưng và vị hơi cay, có 28 thành phần hóa học. Tinh dầu lá cam sành Cao Phong thường không có màu, trong, vị hơi cay và có mùi thơm, có 21 thành phần hóa học. Tinh dầu vỏ quả chanh giầy Hàm Yên có màu vàng nhạt, trong suốt và có mùi thơm, có 26 thành phần hóa học. Theo Hojjati (2017), năng suất của tinh dầu thủy tinh chiết từ lá chanh là 0,41% (v/w) và được đặc trưng bởi màu vàng nhạt và hương thơm dễ chịu. Thành phần chính của tinh dầu lá chanh là linalool (30,62%), geraniol (15,91%), α terpineol (14,52%) và linalyl acetate (13,76%). Các hợp chất: linalool, limonene, perilla aldehyde, β-caryophyllene,...trong tinh dầu có tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm, chống viêm, chống nhiễm trùng rất hiệu quả (Bumblauskien et al., 2009). Nghiên cứu của Nguyễn Trọng Tuấn và ctv. (2017) cho thấy tinh dầu vỏ, lá của chi *Citrus* gồm: cam mật (*Citrus sinensis* (L) Osb), cam sành (*Citrus*

nonbillis Lour), chanh không hạt (*Citrus latifolia* (Yu.Tanaka).Tanaka) và chanh giầy (*Citrus aurantifolia* (Christm et Panzer) Swingle) được trích ly bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước. Hiệu suất trích ly tinh dầu lá (0,2 - 0,3%) thấp hơn hiệu suất trích ly tinh dầu vỏ (2,55 - 5,50%). Kết quả phân tích thành phần hóa học bằng phương pháp sắc kí khí ghép khối phổ (GC/MS) cho thấy tinh dầu vỏ và lá *Citrus* chứa các hợp chất terpenoit bao gồm monoterpen, sesquiterpen và dẫn xuất chứa oxy của chúng. Limonen chiếm hàm lượng lớn trong tinh dầu vỏ quả.

3.2. Ảnh hưởng của chất chiết tinh dầu đến sự phát triển của sợi nấm

Sáu tinh dầu chiết từ vỏ chi *Citrus* thí nghiệm ảnh hưởng đến sự phát triển của các chủng vi nấm *Achlya* sp. A.1910 và *Achlya* sp. A.1924 (Bảng 2). Cụ thể, ở nồng độ 6,3 mg/mL tinh dầu vỏ chanh giầy và vỏ cam mật ức chế hoàn toàn sự phát triển của hai chủng vi nấm *Achlya* sp. A.1910 và A.1924. Tinh dầu vỏ chanh nùm và vỏ bưởi năm roi ức chế

một phần sự phát triển của vi nấm *Achlya* sp. A.1924 nhưng ức chế hoàn toàn vi nấm *Achlya* sp. A.1910 ở cùng nồng độ 6,3 mg/mL. Tuy nhiên, chất chiết tinh dầu vỏ bưởi da xanh và vỏ cam sành không ức chế sự phát triển của vi nấm *Achlya* sp. A.1910 và

Achlya sp. A.1924 ở 6,3 mg/mL. Vi nấm *Achlya* sp. (A.1910 và A.1924) không phát triển ở các nồng độ 100; 50; 25 và 12,5 mg/mL khi ngâm trong sáu chất chiết tinh dầu.

Bảng 2. Ảnh hưởng của chất chiết tinh dầu đến sợi nấm

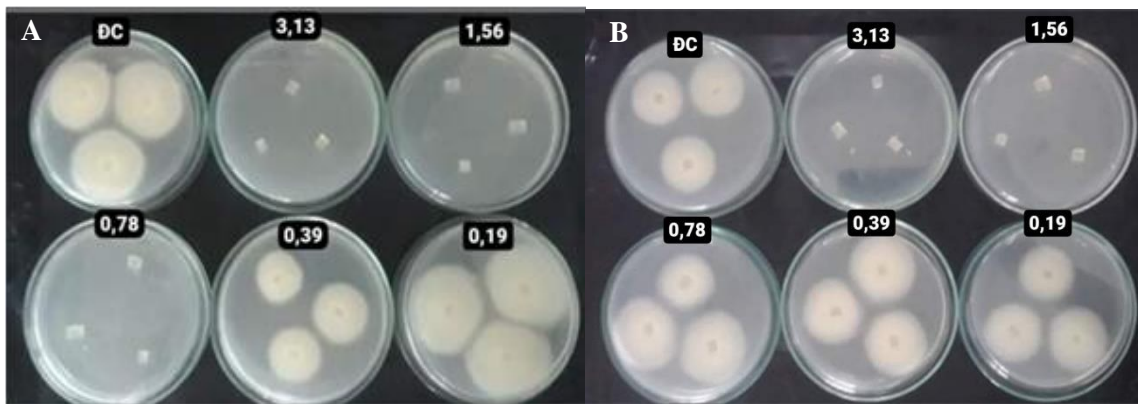
| Tinh dầu | Chủng vi nấm | Nồng độ mg/mL | | | | | | | | | |
|---|--------------|---------------|----|----|----|----|----|------|----|-----|----|
| | | 100 | | 50 | | 25 | | 12,5 | | 6,3 | |
| | | PT | SS | PT | SS | PT | SS | PT | SS | PT | SS |
| Vỏ chanh núp <i>C. limon</i> (L.) Burn.f.1768 | A1910 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | A1924 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| Vỏ chanh giấy <i>C. aurantifolia</i> | A1910 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | A1924 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Vỏ bưởi da xanh <i>C. grandis</i> var. <i>Da xanh</i> | A1910 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| | A1924 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| Vỏ bưởi năm roi <i>C. grandis</i> var. <i>Nam roi</i> | A1910 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | A1924 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| Vỏ cam sành <i>C. nonbillis</i> | A1910 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| | A1924 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| Vỏ cam mật <i>C. sinensis</i> | A1910 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | A1924 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Ghi chú: PT: sợi nấm phát triển sau 2 ngày; SS: trong trường hợp không có sợi nấm phát triển, khối nấm được cấy trên môi trường GYA và đọc kết quả sau 3 ngày; (+): sợi nấm phát triển; (-): sợi nấm không phát triển

3.3. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của chất chiết tinh dầu đến sự phát triển của *Achlya* sp.

Kết quả xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC của tinh dầu đến hai chủng vi nấm *Achlya* sp. (A.1910 và A.1924) cho thấy hoạt tính kháng nấm của tinh dầu vỏ chanh giấy tốt nhất ở nồng độ 0,78 mg/mL (Hình 1A). Tinh dầu vỏ cam mật cũng có nồng độ ức chế tối thiểu là 0,78 mg/mL với *Achlya* sp. A.1910 thấp hơn chủng A.1924 là 1,56 mg/mL (Hình 1B). Tinh dầu vỏ bưởi da xanh, vỏ bưởi năm roi và vỏ cam sành không ảnh hưởng đến sự phát

triển của sợi nấm *Achlya* sp. ở các nồng độ 0,39; 0,78; 1,56 và 3,13 mg/mL. Đường kính khuẩn lạc của hai chủng *Achlya* sp. (A.1910 và A.1924) từ 10,9 – 45,6 mm ở các nồng độ tinh dầu chi *Citrus* khác nhau và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Đường kính khuẩn lạc của vi nấm *Achlya* sp. càng giảm khi nồng độ của tinh dầu càng tăng và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Ở nghiệm thức đối chứng không ngâm chất chiết thảo dược, đường kính khuẩn lạc của chủng *Achlya* sp. A.1910 từ 43,5 – 37,8 mm và chủng *Achlya* sp. A.1924 từ 41,2 – 45,9 mm (Bảng 2).



Hình 1. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của tinh dầu đến sự phát triển của *Achlya* sp.

A: MIC của tinh dầu vỏ chanh giấy trên *Achlya* sp. A.1910;

B: MIC của tinh dầu vỏ cam mật trên *Achlya* sp. A.1924

Bảng 3. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của chất chiết tinh dầu đến sự phát triển của *Achlya* sp.

| Chất chiết | Chủng nấm | Nồng độ mg/mL | | | | |
|-----------------|-----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | ĐC | 0,39 | 0,78 | 1,56 | 3,13 |
| Vỏ chanh nùm | A.1910 | 43,6 ± 2,2 ^a | 43,0 ± 1,2 ^a | 43,1 ± 1,5 ^a | 39,5 ± 1,7 ^b | - |
| | A.1924 | 39,2 ± 2,0 ^a | 40,2 ± 0,3 ^a | 38,3 ± 2,5 ^a | 36,6 ± 1,5 ^b | 36,0 ± 1,3 ^b |
| Vỏ chanh giấy | A.1910 | 42,6 ± 2,2 ^a | 26,3 ± 2,3 ^b | - | - | - |
| | A.1924 | 44,0 ± 1,9 ^a | 30,1 ± 1,5 ^b | - | - | - |
| Vỏ bưởi da xanh | A.1910 | 43,6 ± 1,9 ^a | 43,0 ± 1,5 ^a | 42,5 ± 1,1 ^a | 32,0 ± 0,8 ^b | 30,0 ± 1,8 ^b |
| | A.1924 | 42,2 ± 1,8 ^a | 42,0 ± 0,7 ^a | 43,2 ± 0,6 ^a | 33,5 ± 1,0 ^b | 31,5 ± 2,6 ^b |
| Vỏ bưởi năm roi | A.1910 | 45,6 ± 2,2 ^a | 42,2 ± 1,8 ^a | 41,0 ± 3,2 ^c | - | - |
| | A.1924 | 40,0 ± 2,3 ^a | 40,4 ± 0,3 ^a | 38,8 ± 1,1 ^a | 38,0 ± 0,1 ^a | 35,3 ± 2,8 ^b |
| Vỏ cam sành | A.1910 | 45,0 ± 2,4 ^a | 44,2 ± 1,4 ^a | 44,1 ± 1,5 ^a | 41,4 ± 1,5 ^b | 40,5 ± 1,8 ^b |
| | A.1924 | 39,3 ± 2,2 ^a | 40,0 ± 1,5 ^a | 38,5 ± 1,2 ^a | 38,9 ± 0,5 ^a | 33,5 ± 1,2 ^b |
| Vỏ cam mật | A.1910 | 42,8 ± 0,7 ^a | 37,3 ± 1,2 ^c | - | - | - |
| | A.1924 | 44,0 ± 1,5 ^a | 37,6 ± 2,0 ^b | 12,1 ± 1,2 ^c | - | - |

Số liệu thể hiện là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. *: Đường kính khuẩn lạc (mm) được đo sau 72 giờ; (-) : nấm không phát triển; 0: không thực hiện thí nghiệm. Các số liệu trong cùng một hàng ngang có chữ cái giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.4. Nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) của chất chiết tinh dầu đến sự phát triển của *Achlya* sp.

Kết quả ghi nhận nồng độ tinh dầu ức chế sự phát triển của các chủng vi nấm ở thời gian ngâm khác nhau. Nồng độ diệt nấm tối thiểu MFC của tinh dầu vỏ chanh giấy thấp nhất là 0,78 mg/mL ở vi nấm *Achlya* sp. sau 24 giờ. Tương tự, tinh dầu vỏ cam mật cũng diệt vi nấm *Achlya* sp. A.1910 ở cùng nồng độ 0,78 mg/mL sau 24 giờ. Hiệu quả diệt nấm *Achlya* sp. A.1924 của tinh dầu vỏ bưởi năm roi tốt

nhất sau 24 giờ và *Achlya* sp. A.1910 của tinh dầu vỏ cam mật sau 48 giờ ở nồng độ 1,56 mg/mL. Nồng độ diệt nấm của tinh dầu vỏ chanh nùm là 3,13 mg/mL ở vi nấm *Achlya* sp. A.1910 sau 48 giờ thấp hơn ở vi nấm *Achlya* sp. A.1924 là 6,30 mg/mL sau 24 giờ. Tuy nhiên, nồng độ diệt nấm tối thiểu MFC của tinh dầu vỏ bưởi da xanh và vỏ cam sành với *Achlya* sp. là 6,30 mg/mL sau 24 - 48 giờ (Bảng 4). Khả năng diệt nấm của các chiết xuất tinh dầu lần lượt là vỏ chanh giấy, vỏ cam mật, vỏ bưởi năm roi và vỏ chanh nùm.

Bảng 4. Nồng độ diệt nấm tối thiểu (MFC) của chất chiết tinh dầu đến sự phát triển của *Achlya* sp.

| Tinh dầu | <i>Achlya</i> sp. A.1910 | <i>Achlya</i> sp. A.1924 |
|-----------------|--------------------------------|--------------------------|
| | Nồng độ (mg/L)/Thời gian (giờ) | |
| Vỏ chanh nùm | 3,13 / 48 | 6,30 / 24 |
| Vỏ chanh giấy | 0,78 / 24 | 0,78 / 24 |
| Vỏ bưởi da xanh | 6,30 / 48 | 6,30 / 48 |
| Vỏ bưởi năm roi | 1,56 / 48 | 6,30 / 24 |
| Vỏ cam sành | 6,30 / 24 | 6,30 / 48 |
| Vỏ cam mật | 0,78 / 24 | 1,56 / 24 |

Các loại cây trong nghiên cứu gồm chanh nùm (*Citrus limon* (L.) Burn.f.1768), chanh giấy (*Citrus aurantifolia*), bưởi da xanh (*Citrus grandis* var. *Da xanh*), bưởi năm roi (*Citrus grandis* var. *Nam roi*), cam sành (*Citrus nonbillis*) và cam mật (*Citrus sinensis*) là nguồn nguyên liệu được sử dụng chiết xuất tinh dầu phổ biến ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long. Tuy nhiên, sử dụng tinh dầu trong phòng và trị bệnh do vi nấm *Achlya* sp. gây bệnh trên cá lóc vẫn còn đang được nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu cho thấy các tinh dầu chiết xuất từ vỏ chi *Citrus* có khả năng ức chế sự phát triển của vi nấm *Achlya* sp. Hiệu quả kháng nấm của tinh dầu tốt nhất là vỏ

chanh giấy và vỏ cam mật. Tương tự, nghiên cứu của Nguyễn Trọng Tuấn và ctv. (2017) cho thấy tinh dầu vỏ và lá cam mật, cam sành, chanh không hạt và chanh giấy thể hiện hoạt tính kháng 3 chủng nấm bệnh *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum* sp. và *Achlya* sp. Tinh dầu chiết xuất từ lá ức chế nấm tốt hơn từ vỏ. Ngoài ra, các loại tinh dầu đều có khả năng ức chế nấm *Achlya* sp. tốt hơn nấm *Fusarium oxypotum*, *Colletotrichum* sp. Thành phần chính trong tinh dầu bao gồm phenol, terpen, aldehyde và xeton, hợp chất perillaldehyde, phenylpropanoid và âcaryophyllene,...có tác dụng kháng khuẩn và kháng nấm (Đỗ Huy Bích và ctv., 2004). Tinh dầu chủ yếu

tác động lên màng tế bào chất của vi sinh vật. Do sự khác biệt về số lượng và thành phần tinh dầu nên đặc tính kháng nấm của tinh dầu không phải do một cơ chế cụ thể mà tác động bởi nhiều cơ chế khác nhau ở mức độ tế bào (Burt, 2004). Ngoài ra, Xing et al. (2014) cho rằng hoạt tính kháng nấm chính của tinh dầu được cho là do cinnamaldehyde có tác dụng ức chế enzym tổng hợp tế bào (β -(1,3)-glucan synthase và synthase chitin do đó làm mất tế bào chất, vỡ màng tế bào, phá hủy ty thể và mất sự ổn định của thành tế bào nên ảnh hưởng đến hình thái và sự phát triển của nấm.

Tinh dầu có thể được sử dụng như một chất chống nấm tự nhiên để giảm thiểu sự phát triển và ô nhiễm của nấm và kéo dài thời hạn sử dụng của các loại thực phẩm khác nhau. Tinh dầu có hoạt tính diệt nấm trên diện rộng. Tinh dầu của cam mật *C. sinensis* được phát hiện có hoạt tính chống lại *Aspergillus niger*. Hoạt tính diệt nấm trong môi trường thạch được đánh giá với tinh dầu từ 0,1–3,0 $\mu\text{g/mL}$ (Sharma & Tripathi, 2008). Tinh dầu từ *C. reticulata* đã được thử nghiệm về hoạt tính kháng nấm đối với *Fusarium oxysporum* có nồng độ MIC là $> 0,2 \text{ mL}/100\text{mL}$. Sự hình thành bào tử cũng bị ức chế hoàn toàn ở $0,2 \text{ mL}/100\text{mL}$ (Chutia et al., 2009). Hơn nữa, các tinh dầu từ chanh giầy *C. aurantium*, chanh nùm *C. limon*, quýt hồng *C. reticulata* và cam mật *C. sinensis* đã được thử nghiệm kháng nấm *Candida albicans* và *Aspergillus flavus* bằng phương pháp khuếch tán đĩa cho kết quả hoạt tính kháng nấm cao nhất với tinh dầu của *C. reticulata* có nồng độ MIC là 1 mg/mL đối với *C. Albicans* và $0,25 \text{ mg/mL}$ đối với *A. flavus* (Lamine et al., 2019).

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Tinh dầu chiết xuất từ vỏ chanh giầy, vỏ chanh nùm, vỏ bưởi da xanh, vỏ bưởi năm roi, vỏ cam sành và vỏ cam mật có hoạt tính kháng nấm *Achlya* sp. Nồng độ ức chế tối thiểu MIC và nồng độ diệt nấm tối thiểu MFC của tinh dầu vỏ chanh giầy và vỏ cam mật là $0,78 \text{ mg/mL}$ sau 24 giờ. Tinh dầu vỏ bưởi năm roi và vỏ chanh nùm có nồng độ MIC từ $1,56 - 6,3 \text{ mg/mL}$. Khả năng diệt nấm của các chiết xuất tinh dầu lần lượt là vỏ chanh giầy, vỏ cam mật, vỏ bưởi năm roi và vỏ chanh nùm.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài này được tài trợ bởi Dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 bằng nguồn vốn vay ODA từ Chính phủ Nhật Bản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abad, M.J., Ansuategui, M. & Bermejo, P. (2007). Active antifungal substances from natural sources. *Arkivoc*, 7(11), 6-145.
- Borisutpeth, P., Kanbutra, P., Hanjavanit, C., Chukanhom, K., Funaki, D. & Hatai, K. (2009). Effects of Thai herbs on the control of fungal infection in tilapia eggs and the toxicity to the eggs. *Aquaculture Science*, 57(3), 475-482.
- Bumblauskien, L., Vandas, J., Valdimaras, J., Ramute, M. & Ona, R. (2009). Preliminary analysis on essential oil composition of *Perilla* L. cultivated in Lithuania. *Acta Poloniae Pharmaceutica, Drug Research*, 66(4), 409-413.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.
- Chutia, M., Bhuyan, P.D., Pathak, M.G., Sarma, T.C. & Boruah, P. (2009). Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT-Food Science Technology*, 42, 777–780.
- Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Trung, Bùi Xuân Chương, và ctv. (2004). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập 1*. Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật, Hà Nội, trang 274 – 405.
- Duarte A., Carvalho, C. & Miguel, G. (2016). Bioactive compounds of citrus as health promoters. In L. R. da Silva & B. Silva, *Natural Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables as Health Promoters: Part I* pp. 29–97. EBSCO.
- Hojjati, M. (2017). Chemical composition and biological activities of Lemon (*Citrus limon*) leaf essential oil. *Nutrition and Food Sciences Research*, 4(4), 15-24.
- Lamine, M., Rahali, F.Z., Hammami, M. & Mliki, A. (2019). Correlative metabolite profiling approach to understand antioxidant and antimicrobial activities from citrus essential oils. *International Journal Food Science Technology*, 54, 2615–2623.
- Liêu Thùy Linh, Ngô Nguyễn Nhật Hà, Phan Thị Kim Liên, Trần Thị Minh Hà Nguyễn Thủy Hương & Liêu Mỹ Đông (2017). Khảo sát ảnh hưởng của tinh dầu quế, sả chanh, húng quế, bạc hà và tác dụng kết hợp của chúng tới *Saccharomyces cerevisiae* và *Aspergillus niger*. *Kỷ yếu kỷ niệm 35 năm thành lập Trường Đại học Công nghiệp thực phẩm thành phố Hồ Chí Minh (1982 – 2017)*, trang 127-134.
- Madrid, A., Godoy, P., González, S., Zaror, L., Moller, A., Werner, E., ... & Montenegro, I. (2015). Chemical characterization and anti-oomycete activity of *Laureliopsis philippianna*

- essential oils against *Saprolegnia parasitica* and *S. australis*. *Molecules*, 20(5), 8033-8047.
- Nguyễn Trọng Tuấn, Do Kim Xuyen & Cao Văn Tính. (2017). Thành phần hóa học và hoạt tính kháng oxi hóa, kháng nấm bệnh của tinh dầu vỏ và lá một số loài cây thuộc chi *Citrus* (Họ Rutaceae). *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 20, 99-105.
- Nguyễn Văn Lợi, Nguyễn Thị Minh Tú & Hoàng Đình Hòa. (2014). Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của tinh dầu lá bưởi, cam và chanh. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 52(5A), 1- 6.
- Palazzolo, E., Laudicina, V. A., & Germanà, M. A. (2013). Current and potential use of citrus essential oils. *Current Organic Chemistry*, 17(24), 3042–3049.
- Panchai, K., Hanjavanit, C., Rujinanont, N., Wada, S., Kurata, O. & Hatai, K. (2015). Experimental pathogenicity of *Achlya* species from cultured Nile tilapia to Nile tilapia fry in Thailand. *AACL Bioflux*, 8(1), 70-81.
- Salehi, M., Soltani, M., & Islami, H. R. (2015). In vitro antifungal activity of some essential oils against some filamentous fungi of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *AACL Bioflux*, 8(3), 367-380.
- Sharma, N. & Tripathi, A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*, 163, 337–344.
- Vekiari, S. A., Protopapadakis, E. E., Papadopoulou, P., Papanicolaou, D., Christinapanou & Vamvakias, M. (2002). Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a cretan lemon variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 147 – 153.
- Xing, F., Hua, H., Selvaraj, J. N., Zhao, Y., Zhou, L., Liu, X., & Liu, Y. (2014). Growth inhibition and morphological alterations of *Fusarium verticillioides* by cinnamon oil and cinnamaldehyde. *Food Control*, 46, 43-350.