

CHẾ TẠO VÀ SỬ DỤNG CHẾ PHẨM SINH HỌC NHŨ TƯƠNG NANO BẠC-DẦU NEEM-POLYHEXAMETHYLENE BIGUANIDE PHÒNG TRỪ NẤM BỆNH TRÊN CÂY QUẤT CẢNH

Đến tòa soạn 29-11-2023

Đoàn Quang Hà*, Chu Thị Hảo, Trần Mạnh Hải, Nguyễn Tấn Thành

Viện Khoa học công nghệ Năng lượng và Môi trường,

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

*Email: hadoancnmt@gmail.com

SUMMARY

MANUFACTURE AND APPLY PROBIOTIC NANO-EMULSIONS SILVER-NEEM OIL-POLYHEXAMETHYLENE BIGUANIDE FOR KUMQUAT TREES TO PREVENT DISEASE

Kumquat is one of the popular ornamental plants every Tet holiday in Vietnam and some Asian countries. However, according to the surveys, in order to have beautiful products, the use of chemical plant protection chemicals is unavoidable. Excessive exposure to the above chemicals will affect the health of kumquat producers and consumers. To overcome and minimize the amount of pesticides, this study presented a safe biological nano-emulsions from silver, neem oil, polyhexamethylene biguanide (PHMB) with nanoparticle sizes ranging from 45-96 nm, inhibiting Phytophthora. sp fungi at a concentration of 7.5 ppm on a silver basis in an in vitro laboratory. At the same time, it had the ability to replace 30% of chemical pesticides (Redomil gold 68WG and Toplusa 450SC) and was effective in disease prevention of over 81%. Nano-emulsion applied in organic agricultural production was a new direction to initially help reduce the use of chemicals towards green agricultural production.

Từ khóa: *Azadirachta indica, Chế phẩm nhũ tương nano, Cây quất cảnh, Polyhexamethylene biguanide.*

1. TỔNG QUAN

Theo số liệu của tỉnh Hưng Yên, cây có múi (cam, quýt, bưởi), áp dụng kỹ thuật thâm canh và công nghệ bảo quản sau thu hoạch để nâng cao giá trị; tập trung phát triển theo hướng công nghệ cao ở các địa phương như: Văn Giang, Khoái Châu, Phù Cừ, Kim Động và thành phố Hưng Yên; đến năm 2025 diện tích đạt 820ha [1]. Một trong những huyện chủ lực là Khoái Châu hiện có 615ha cam, bưởi, quýt, tập trung nhiều ở các xã Đông Tảo, Bình Minh, Dạ Trạch, Tân Dân, Dân Tiến và Phùng Hưng. Trong đó, 55% diện tích là trồng cây ăn quả, còn lại 45% là trồng cây cảnh (bưởi, quýt cảnh) phục vụ thị

trường Tết [2]. Tuy nhiên việc thâm canh với mật độ cao cũng dẫn đến các yếu tố dịch bệnh cho cây trồng. Sử dụng quá nhiều thuốc bảo vệ thực vật hóa học sẽ dẫn đến việc ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng đến sức khỏe người trồng cũng như người sử dụng sản phẩm. Vì vậy trước hết rất cần những sản phẩm phòng trừ bệnh tốt có tính an toàn cao với người trồng và chăm sóc cây.

Công nghệ nano trong quản lý, phòng, trừ bệnh hại trên cây trồng đang được các nhà khoa học trong nước và quốc tế nghiên cứu và dần hoàn thiện [3]. Các nguyên tố như kẽm, đồng, bạc là những nguyên tố có tính kháng nấm, kháng khuẩn tốt. Khi

các hạt nano kim loại có kích thước nhỏ thì hiệu quả kháng khuẩn, kháng nấm tăng lên hàng ngàn lần so với nguyên tố ở dạng ion. Bên cạnh đó, độc tính của chúng có tính chọn lọc cao với vi khuẩn, vi nấm. Các nghiên cứu của các tác giả [4] đã chứng minh các hạt nano bạc có khả năng đối kháng mạnh đối với nhiều loài vi nấm gây bệnh như nấm *Puccinia spp.* gây bệnh mụn cóc ở cây hoa cúc, nấm *Plasmodiophora brassicae* gây bệnh sưng rễ ở cây bắp cải. Kết quả áp dụng nano bạc nồng độ thấp cho thấy hiệu quả kháng bệnh đốm nâu (*Alternaria passiflorae*), bệnh vàng lá (*Fusarium sp.*; *Phytophthora sp.*) Các kết quả nghiên cứu gần đây còn cho thấy, khi sử dụng phối hợp nano bạc với nano đồng sẽ cho hiệu ứng cộng hợp ức chế và phòng trừ hiệu quả nhiều loài nấm gây bệnh khác nhau [5]. Một số chế phẩm phòng trừ côn trùng chích hút (*pheromone*, *methyl eugenol*) sản xuất ở dạng nano gel tỏ ra hiệu quả, nhiều tiềm năng và an toàn sinh học cao đối với cây trồng. Tuy nhiên việc sử dụng các hạt nano kim loại còn hạn chế do chúng không bám dính hoặc tồn tại lâu ngoài môi trường ánh sáng mạnh.

Hiện nay các chế phẩm nhũ tương nano có nhiều ưu điểm vượt trội hơn so với các dạng nhũ đậm đặc truyền thống như: giảm độc tính đối với cây trồng do sử dụng ít dung môi hữu cơ; kiểm soát quá trình phóng thích thuốc, cải thiện hoạt tính sinh học của chế phẩm; giảm thiểu ô nhiễm môi trường và an toàn hơn đối với người sử dụng [6]. Nhũ tương nano (NTN) kháng khuẩn là những giọt dầu trong nước có đường kính từ 200 nanomet đến 600 nanomet. NTN có hiệu quả chống lại vi khuẩn (ví dụ: *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus*), vi-rút có vỏ bọc (ví dụ: *HIV*, *Herpes simplex*), nấm (ví dụ: *candida*, *dermatophytes*) và bào tử (ví dụ: *candida*, *dermatophytes*). Phương pháp đảo pha (Emulsion phase inversion– EPI) là một phương pháp tạo nhũ tương nano năng lượng thấp dựa trên sự đảo pha của hệ ở nhiệt độ cố định, thường là nhiệt độ phòng [7]. Sự đảo pha này được thực hiện nhờ sự thay đổi tỷ lệ thành phần pha dầu và nước trong hệ nhũ.

Dầu neem được chiết xuất từ các bộ phận khác nhau của cây Neem (*Azadirachta indica*), một loại cây bản địa từ các vùng khô hạn ở Châu Á và Châu Phi được coi là một cây rất quan trọng. Cho đến nay, hơn 300 hợp chất tự nhiên, đa dạng về mặt hóa

học và cấu trúc phức tạp, đã được chiết xuất và phân lập từ các bộ phận khác nhau như từ lá: azadirachtin, nimonol, nimocinol và nimocinolide; từ vỏ cây: axit gallic, galocatechin và epicatechin; từ hạt: azadirachtin, azadiradione, nimbin, salannin và epoxyazadiradione [8]. Các hợp chất hóa học này đã chứng tỏ có nhiều tác dụng đặc biệt chống lại nhiều loại sâu bệnh (côn trùng, nấm và vi rút) [10]. Các hạt nano bạc được tổng hợp bằng dịch chiết *Azadirachta indica* với kích thước hạt trong khoảng từ 10 đến 60 nm và có hiệu quả tốt diệt vi khuẩn và vi nấm [9, 10].

Tính kháng khuẩn của Polyhexamethylene Biguanide (PHMB) được cho là do tương tác giữa lớp lipid kép của màng tế bào vi khuẩn và các nhóm guanidine, làm cho lớp lipid kép mất tính linh động hoặc bị hòa tan, ức chế sự phát triển của tế bào và cuối cùng dẫn đến sự chết của vi khuẩn. Do là polyme hữu cơ dạng muối cao phân tử (Polyhexamethylene guanidine) mang điện tích dương, tồn tại ở dạng lỏng (dạng nhũ dầu) với thành phần chính là Polyhexamethylene guanidine hydrochlorid. PHMB có thể khuếch tán qua màng tế bào tạo thành phức với các phospholipid, làm mất ổn định trạng thái cân bằng thẩm thấu và phá hủy màng tế bào. Do khả năng hòa tan trong nước cao, hiệu quả diệt khuẩn tuyệt vời, độc tính thấp, không mùi, không ăn mòn, độ ổn định cao, PHMB có thể dùng làm chất khử trùng, đặc biệt trong chế tạo vải kháng khuẩn, vật liệu y tế, xử lý nước.... Nhiều nghiên cứu đã chế tạo chế phẩm nano bạc trong PHMB và đánh giá khả năng sử dụng chế phẩm để ức chế sự phát triển của *Staphylococcus aureus*. Kết quả thực nghiệm cho thấy chế phẩm nano bạc - PHMB thể hiện khả năng diệt khuẩn tốt hơn nhiều so với dung dịch nano Bạc và PHMB riêng biệt [11-13].

Mục tiêu sản xuất nông nghiệp hữu cơ là sử dụng các sản phẩm BVTV an toàn sinh học trong phòng trừ bệnh cây. Nghiên cứu sử dụng chế phẩm sinh học nhũ tương nano từ bạc, dầu neem và PHMB trong phòng trừ một số bệnh hại trên cây quýt cảnh là hướng rất mới cần định hướng nghiên cứu và phát triển.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Chế phẩm sinh học nhũ tương nano từ bạc và dầu Neem, PHMB được tổng hợp tại Viện Khoa học

công nghệ Năng lượng và Môi trường - Viện HL KH&CN Việt Nam.

Chung nấm gây bệnh nứt thân xì mù *Phytophthora* sp. được phân lập từ cây quất cảnh lưu trữ tại Phòng thí nghiệm Vi sinh vật Viện Khoa học công nghệ Năng lượng và Môi trường. Môi trường nuôi cấy PDA(Merck).

Cây quất cảnh được trồng với mật độ 360 chậu/360m² và chăm sóc tại hộ nông dân thôn Thiết Trụ, xã Bình Minh, huyện Khoái Châu, tỉnh Hưng Yên.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chế phẩm sinh học nhũ tương nano từ nano bạc, PHMB và dầu neem: (I) - Sử dụng muối tiền chất AgNO₃ hòa tan trong nước RO theo hàm lượng Ag⁺ 1,5g/L. (II) - Thêm chất hoạt tính bề mặt cation amoni bậc bốn Polyhexamethylene biguanide (PHMB) hàm lượng 30g/L khuấy mạnh (1500 vòng/phút). (III) - Dầu Neem với hàm lượng hoạt chất *Azadirachtin* thêm từ từ vào (II) và khuấy mạnh liên tục, quá trình khuấy phản ứng diễn ra trong 20 phút. Hỗn hợp thu được được ủ trong buồng tối 24h ở nhiệt độ phòng để ngăn chặn quá trình tự oxy hóa của bạc nitrat.

Chế phẩm nhũ tương nano tạo thành được đánh giá bằng Phương pháp quang phổ trên máy Hitachi UH-5300 UV-Vis; phân bố kích thước hạt nano và thế zeta của mẫu được đo trên máy SZ-100 tại Viện Công nghệ môi trường (VAST) sau các mốc thời gian sau 0 ngày, 30 ngày, 90 ngày và sau 180 ngày bảo quản.

Chế phẩm được đánh giá khả năng kháng nấm ở điều kiện phòng thí nghiệm invitro và lựa chọn liều lượng ức chế. Đối với Nấm bệnh sử dụng phương pháp xác định đường kính tán nấm [14].

Thử nghiệm chế phẩm trên cây quất cảnh với liều lượng đạt ở thí nghiệm invitro với hai công thức giảm 30% thuốc BVTV hóa học và 50% thuốc bảo vệ thực vật hóa học (thuốc BVTV trị nấm sử dụng Ridomil gold 68WG pha 1 gói vào 1 bình 20 lít và Toplusa 450SC gồm 2 thành phần là *Azoxystrobin* 250g/L + *Difenoconazole* 200 g/L pha 10mL vào 1 bình 20 lít) với 360m² sử dụng phun 3 bình.

2.3. Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Thí nghiệm 1: Thí nghiệm lựa chọn nồng độ trong phòng thí nghiệm invitro sử dụng 4 công thức 1ppm, 3ppm, 5ppm và 7,5 ppm tính theo bạc. Mỗi công thức lặp lại 3 lần để lấy số liệu trung bình. Hiệu quả ức chế được xác định theo công thức Abort như sau [14]:

$$HQ = 1 - \frac{T}{C} \times 100\%$$

HQ: Hiệu quả PTN invitro

T: Đường kính tán nấm ở công thức thí nghiệm

C: Đường kính tán nấm ở công thức đối chứng

Thí nghiệm 2: Thí nghiệm đồng ruộng trên cây quất cảnh được chia làm 3 công thức thử nghiệm (CT): CT0 - đối chứng không sử dụng; CT1 - đối chứng theo công thức BVTV nông dân sử dụng; CT2 - giảm 30 % thuốc BVTV hóa học thay thế bằng chế phẩm sinh học nhũ tương nano; CT3 giảm 50 % thuốc BVTV hóa học thay thế bằng chế phẩm sinh học nhũ tương nano; Bố trí thí nghiệm kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên (RCBD) gồm 3 công thức, mỗi công thức 3 ô, mỗi ô 20 cây. Thời gian thực hiện từ tháng 5/2022-12/2022. Số lần xử lý 24 lần, 10-15 ngày/lần. Thu thập số liệu sau 1 tháng sử dụng (2-3 lần phun). Chỉ tiêu theo dõi tỉ lệ bệnh, chỉ số bệnh, hiệu quả phòng trừ tính theo chỉ số bệnh [16]. Điều tra 10 cây/lần nhắc, 4 hướng/cây, mỗi hướng chọn 1 cành cấp 2 nằm giữa tầng của tán cây.

$$\text{Tỷ lệ bệnh (\%)} = \frac{\text{Số cây bệnh}}{\text{Tổng cây điều tra}} \times 100$$

$$\text{Chỉ số bệnh: CSB(\%)} = \frac{\sum (n_i \times v_i)}{k \times n} \times 100$$

Trong đó: $\sum (n_i \times v_i)$ là tổng tích số cây bị bệnh với trị số cấp bệnh tương ứng, k là trị số cấp bệnh cao nhất, n là tổng số cây theo dõi. Mức độ bệnh trên thân được phân thành 4 cấp (theo Anderson và Guest, 1990), cấp 0: không có vết bệnh, cấp 1 (nhẹ): vết bệnh có diện tích < 100 cm², cấp 2 (trung bình): vết bệnh có diện tích > 100 cm² và < 70 % chu vi thân chính, cấp 3 (nặng): vết bệnh > 70 % chu vi thân chính hoặc cây bị chết

Hiệu quả của chế phẩm theo công thức Henderson-Tilton

$$\text{Hiệu lực (\%)} = 1 - \frac{T_a \times C_b}{T_b \times C_a} \times 100\%$$

Trong đó:

T_a: CSB ở công thức chế phẩm sau xử lý

T_b: CSB ở công thức chế phẩm trước xử lý

C_a: CSB ở công thức đối chứng sau xử lý

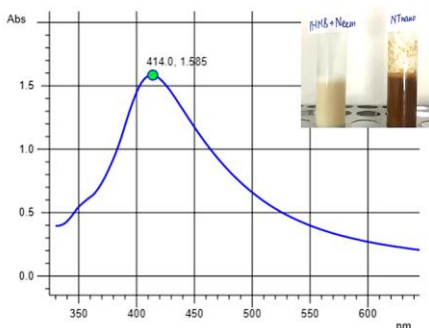
C_b: CSB ở công thức đối chứng trước xử lý

Số liệu được phân tích và tính toán bằng Excel 2016 và IRRISTAT 5.0.

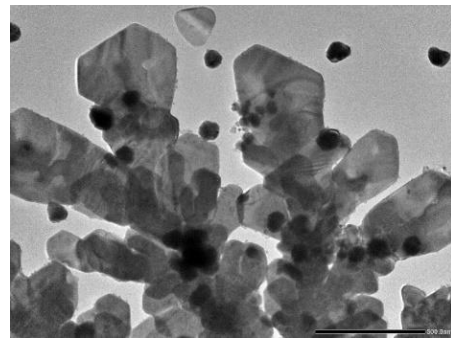
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tổng hợp chế phẩm bảo vệ thực vật nhũ tương nano

Sự hình thành nhũ tương chứa hạt nano bạc được đánh giá trực quan bằng sự thay đổi màu sắc. Việc bổ sung dịch chiết *Azadirachta indica* (Neem) vào dung dịch AgNO₃ dẫn đến sự thay đổi màu của hỗn hợp từ hơi vàng sang nâu đỏ, biểu thị sự hình thành Ag-NP (Hình 1). Sự cộng hưởng plasmon bề mặt của các hạt nano trong hỗn hợp phản ứng [9,16]. Điều này cũng được báo cáo bởi một số nghiên cứu khác quan sát thấy sự thay đổi màu sắc trong hỗn hợp phản ứng trong quá trình hình thành các hạt nano bạc được sinh tổng hợp từ các loài *Oscillatoria*, *Allium sativum*, *Zingiber officinale* và *Capsicum frutescens* [17]. Kết quả thu được từ phổ UV-Vis cho thấy sự xuất hiện các hạt nano bạc đã được hình thành. Trong nghiên cứu, đỉnh plasmon của Ag sinh tổng hợp được quan sát thấy ở bước sóng 414 nm giống như các nghiên cứu khác trên thế giới. Đỉnh hấp phụ sắc nét và có cường độ hấp phụ cao. Kết quả này cho thấy nano bạc có kích thước tương đối nhỏ và khá đồng đều.



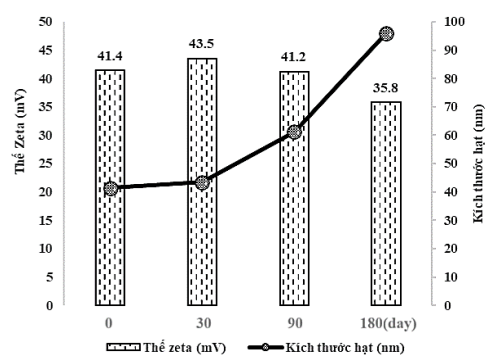
Hình 1. Hình ảnh đỉnh hấp thụ cực đại của chế phẩm nhũ tương nano chứa bạc



Hình 2. Hình ảnh TEM chế phẩm nhũ tương nano chứa bạc

Trên Hình 2 ảnh chụp TEM chế phẩm nhũ tương nano cho thấy các hạt nano bạc hình thành với kích thước 50nm. Kích thước hạt nhỏ có thể tăng theo thời gian thông qua phản ứng Ostwald-sự mất ổn định vật lý này gây tụ tập hợp thành các hạt có kích thước lớn hơn.

Phân bố kích thước hạt nano và thế zeta của chế phẩm nhũ tương được kiểm tra ngay sau khi tổng hợp và sau các thời gian bảo quản 30, 90 và 180 ngày trong Hình 3. Nhận thấy sự tăng dần phân bố kích thước hạt của chế phẩm từ 45nm lên đến 96nm sau 180 ngày, cho thấy hiện tượng các hạt nano có xu hướng tụ tập hợp lại. Điều này cũng được chứng minh bằng thế zeta đo được có sự giảm đáng kể từ 41,4mV giảm xuống còn 35,8mV cho thấy sự ổn định của chế phẩm có bị giảm tuy nhiên vẫn khá ổn định.



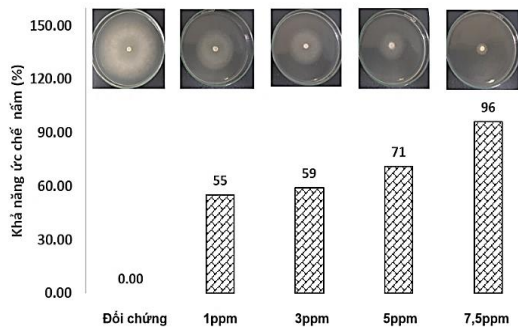
Hình 3. Phân bố kích thước hạt và thế zeta của chế phẩm nhũ tương nano

3.2. Nồng độ chế phẩm tối ưu ức chế nấm trong phòng thí nghiệm invitro

Trộn chế phẩm nhũ tương nano sau khi chế tạo với nồng độ xác định vào môi trường thạch PDA, tiến

hành đánh giá khả năng ức chế nấm bệnh bằng cách so sánh với môi trường PDA đối chứng (không chứa chế phẩm) sau 7 ngày.

Kết quả thực nghiệm được thể hiện trên Hình 4 cho thấy tất cả các mẫu chế phẩm nhũ tương nano ở các nồng độ từ 1 đến 7,5 ppm đều cho khả năng ức chế với nấm *Phytophthora* sp. Ở nồng độ thấp nhất (1 ppm), mẫu chế phẩm đã có khả năng ức chế nấm 55% sau 7 ngày. Khi tăng nồng độ chế phẩm từ 7,5 ppm, khả năng ức chế nấm đạt xấp xỉ 100% theo quan sát các sọc bào tử nấm hầu như không phát triển sau ngày thứ 3 trên môi trường thạch điều này cũng giống với nghiên cứu của tác giả [17] sử dụng nano bạc với liều lượng



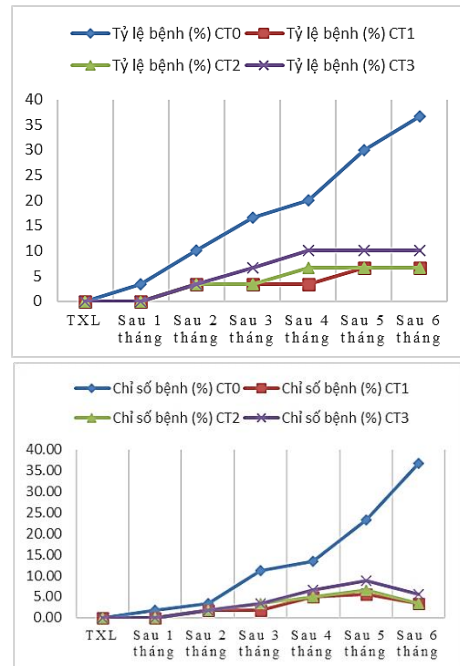
Hình 4. Hiệu quả ức chế nấm *Phytophthora* sp. của chế phẩm nano trong phòng thí nghiệm trên môi trường thạch

Như vậy có thể sử dụng hàm lượng pha loãng 200 lần (7,5ppm trở lên) để sử dụng ngoài đồng ruộng thay thế một phần thuốc bảo vệ thực vật hóa học.

3.3. Hiệu quả giảm thuốc bảo vệ thực vật hóa học của chế phẩm nhũ tương nano trên cây quýt cảnh

Khi bị bệnh, triệu chứng thường thấy nhất là cây bị chảy nhựa (xỉ mù) ở trên thân chính ở vị trí sát gốc. Tuy nhiên, bệnh cũng xuất hiện trên các vị trí khác ở thân và cành. Tác nhân gây bệnh nứt thân xì mù quýt do nấm *Phytophthora* sp. gây ra nó là một loài nấm đất, nấm thủy sinh nên khả năng lây lan bệnh rất nhanh và phụ thuộc vào độ ẩm cao, mưa. Nấm *Phytophthora* sp. có thể nảy mầm xâm nhập trực tiếp qua lớp biểu bì còn nguyên vẹn của cây nhờ cơ chế cơ học (giác bám) và cơ chế sinh hóa (các enzym thủy phân). Trong điều kiện trồng mật độ cao như quýt, bệnh nứt thân xì mù tập trung chủ

yếu ở phần gốc quýt và thường ủ bệnh và biểu hiện vào tháng 6 hàng năm trở đi vì lúc này cây được bổ sung thừa dinh dưỡng, xum xuê.



Hình 5. Tỷ lệ bệnh, chỉ số bệnh trước và sau khi xử lý giữa các công thức thí nghiệm

Từ số liệu ở Hình 5, tính toán hiệu quả phòng trừ bệnh nứt thân xì mù của các công thức thí nghiệm đều tốt, đặc biệt ở công thức 1 và 2 hiệu quả đạt trên 81%. Trong nghiên cứu [19] sử dụng chế phẩm nano bạc đồng ở liều lượng 25ppm đạt hiệu quả phòng trừ nấm *Phytophthora* sp. đạt 67%. Công thức 3 hiệu quả chỉ dừng ở mức 70% cho thấy việc thay thế 50% thuốc bảo vệ thực vật hóa học đem lại hiệu quả phòng trừ chưa đạt vì cây quýt cảnh là cây có giá trị kinh tế khá cao (dao động từ 400.000đ - 1.000.000đ/chậu. Nếu bệnh tấn công số lượng cây bị hỏng lớn sẽ dẫn đến việc mất năng suất thực thu.

4. KẾT LUẬN

Nhũ tương nano ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp hữu cơ là hướng đi mới khi có thể kết hợp các hoạt chất sinh học chiết tách với kim loại có tính sát khuẩn cao như bạc và tăng hiệu quả phòng trừ bệnh. Chế phẩm nhũ tương nano được tạo thành có kích thước nano sau 6 tháng bảo quản vẫn ổn định ở 96nm và có hiệu quả ở 7,5ppm tính theo bạc ức chế 100% nấm gây bệnh nứt thân xì mù *Phytophthora* sp. trong phòng thí nghiệm. Hiệu quả phòng trừ bệnh đạt 81% khi kết hợp giảm 30%

thuốc bảo vệ thực vật hóa học tương đương với việc sử dụng 100% thuốc hóa học Ridomilgold 68WG và Toplusa 450SC.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được hỗ trợ từ đề tài KH&CN cấp tỉnh: “Nghiên cứu ứng dụng các chế phẩm nano và chế phẩm sinh học trong canh tác quýt cảnh tại tỉnh Hưng Yên”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đào Ban, Bài 2: Đánh thức tiềm năng, 15/07/2021. <https://baohungyen.vn/bai-2-danh-thuc-tiem-nang> 15/07/2021.
- [2] Bá Phước, Cam quýt cảnh Khoái Châu được giá, 25/01/2018. <https://dangcongsan.vn/hung-yen-tin-tuc-su-kien/hien-tai-va-tuong-lai/quat-cam-canhh-khoai-chau-duoc-gia-471382.html>.
- [3] Nguyễn Duy Hạng, Nguyễn Tấn Mân, Nguyễn Minh Hiệp, Nguyễn Trọng Hoàng Phong, (2018). Ứng dụng công nghệ nano trong nông nghiệp. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, **7**, 43-35.
- [4] Saurabh Singh, Bijendra Kumar Singh, S.M. Yadav, A.K. Gupta, (2015). Application of nanotechnology in agricultural and their role in disease management. *Malaysia Res. J. Nanosci. Nanotech*, **5(1)**, 1-5.
- [5] Setyowati, R. D., & Suresh, K, (2019). Nanopesticide: Future Application of Nanomaterials in Plant Protection. *Plant conversion and management*, **48(1)**, 184-188.
- [6] Najan A., (2023). Review on Nano-Emulsion. *American Journal of Advanced Drug Delivery*, **11**, 011.
- [7] L. T. M. Hien, T. D. Khoa, D. T. A. Dao, (2022). Characterization of black pepper essential oil nanoemulsion fabricated by emulsion phase inversion method. *Journal of Food Processing and Preservation*, vol. **46**, 16207.
- [8] Rodrigues MP, Astoreca AL, Oliveira ÁAd, Salvato LA, Biscoto GL, Keller LAM, Rosa CADR, Cavaglieri LR, Azevedo MID, Keller KM, (2019). In Vitro Activity of Neem (*Azadirachta indica*) Oil on Growth and Ochratoxin A Production by *Aspergillus carbonarius* Isolates. *Toxins*, **11(10)**, 579.
- [9] Kumari SA, Patlolla AK, Madhusudhanachary P., (2022). Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Azadirachta indica* and Their Antioxidant and Anticancer Effects in Cell Lines. *Micromachines (Basel)*, **13(9)**, 1416.
- [10] Shakeel Ahmed, Saifullah, Mudasir Ahmad, Babu Lal Swami, Saiqa Ikram, (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, **9(1)**, 1-7.
- [11] Rodrigues MP, Astoreca AL, Oliveira ÁA, Salvato LA, Biscoto GL, Keller LAM, Rosa CADR, Cavaglieri LR, Azevedo MI, Keller KM, (2019). In Vitro Activity of Neem (*Azadirachta indica*) Oil on Growth and Ochratoxin A Production by *Aspergillus carbonarius* Isolates. *Toxins (Basel)*, **11(10)**, 579.
- [12] Ashraf S, Akhtar N, Ghauri MA, Rajoka MI, Khalid ZM, Hussain I, (2012). Polyhexamethylene biguanide functionalized cationic silver nanoparticles for enhanced antimicrobial activity. *Nanoscale Res Lett*, **7(1)**, 267.
- [13] Siadat, Seyedeh Ameneh and Javad Mokhtari, (2016). The Role of Polyhexamethylene Biguanide and Silver Nanoparticle Interaction in the Fabrication of Novel Antibacterial Bio-Fibers Using Silk Wastage. *Journal of Nano Research*, **43**, 63 - 72.
- [14] Yi J, Zhang Y, Lin W, Niu B, Chen Q, (2019). Effect of polyhexamethylene biguanide functionalized silver nanoparticles on the growth of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*; **366(4)**, fnz036.
- [15] Ouda SM, (2014). Antifungal activity of silver and copper nanoparticles on two plant pathogens, *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. *Research Journal of Microbiology*, **9**, 34-42.
- [16] QCVN 01 - 119: 2012/BNNPTNT. Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia về phương pháp điều tra phát hiện sinh vật hại trên cây có múi.
- [17] Otunola GA, Afolayan AJ, Ajayi EO,

Odeyemi SW, (2017). Characterization, Antibacterial and Antioxidant Properties of Silver Nanoparticles Synthesized from Aqueous Extracts of *Allium sativum*, *Zingiber officinale*, and *Capsicum frutescens*. *Pharmacogn Mag*, **13(Suppl 2)**, S201-S208.

[18] Nguyễn Thị Bích Ngọc, Nguyễn Hoài Châu, Hà Minh Thanh, Lê Thị Phương Thảo, Đỗ Duy Hưng, Phạm, Thị Dung, Nguyễn Nam Dương, Nguyễn Đức Huy, Ngô Thị Thanh Hương, (2018). Thử nghiệm hiệu lực của chế phẩm nano đồng và

nano bạc với nấm *Phytophthora* sp. và *Colletotrichum* sp. gây rụng quả trên cây cam sành. *Bảo vệ Thực vật*, **4**, 3-9.

[19] Nguyễn Thị Bích Ngọc, Nguyễn Hoài Châu, Nguyễn Thị Tường Vân, Phạm Thị Dung, Ngô Thị Thanh Hương, Đỗ Duy Hưng, Vũ Duy Minh, Nguyễn Nam Dương, (2019). Hiệu lực phòng chống của nano hợp kim bạc đồng đối với bệnh rụng quả do nấm *C. Gloeosporioides* & *Phytophthora* spp. trên cam ở quy mô diện hẹp. *Bảo vệ Thực vật*, **6**, 51-59.