

TÁC ĐỘNG CỦA NANO BẠC LÊN KHẢ NĂNG TĂNG TRƯỞNG CỦA CÂY CÚC TRONG HỆ THỐNG VI THỦY CANH

Hoàng Thanh Tùng^{1,2}, Nguyễn Phúc Huy¹, Nguyễn Bá Nam¹, Vũ Quốc Luận¹, Vũ Thị Hiền¹, Trương Thị Bích Phượng², Dương Tấn Nhựt¹

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

Ngày nhận bài: 18.7.2016

Ngày nhận đăng: 20.9.2016

TÓM TẮT

Nano bạc được chứng minh là có hiệu quả trong lĩnh vực công nghệ sinh học. Trong lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật, hạt nano có ảnh hưởng tích cực và tiêu cực đến sự tăng trưởng của thực vật. Tác động của các hạt nano lên cây trồng phụ thuộc vào thành phần, hàm lượng, kích thước, tính chất hóa học và vật lý của hạt nano cũng như các loài thực vật. Nghiên cứu này đánh giá tác động của hạt nano bạc lên vấn đề nhiễm khuẩn trong quá trình nuôi cấy, sự tăng trưởng của cây nuôi cấy trong hệ thống vi thủy canh và thích nghi của cây trồng ở giai đoạn vườn ươm. Trong nghiên cứu này, bổ sung 7,5 ppm nano bạc vào môi trường nuôi cấy vi thủy canh cho thấy gia tăng sự tăng trưởng của cây Cúc là cao hơn so với các nồng độ khác sau 2 tuần nuôi cấy. Kết quả định danh và định lượng hàm lượng vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy vi thủy canh bằng 4 phương pháp thử, trong đó định lượng cho vi khuẩn là phương pháp Bergey, ISO 16266 và NHS-F15; định lượng cho nấm là phương pháp ISO 21527-1. Tất cả các phương pháp cho thấy ở nồng độ 7,5 ppm nano bạc thì làm giảm hàm lượng vi sinh vật của 8 loài vi khuẩn (*Corynebacterium* sp., *Enterobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Xanthomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Micrococcus* sp. và *Bacillus* sp.) và 3 loài nấm mốc (*Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. và *Alternaria* sp.). Khi chuyển ra giai đoạn vườn ươm sau 4 tuần, cây Cúc cho tỷ lệ sống sót cao (100%) và sự tăng trưởng tốt hơn so với các nghiệm thức khác thể hiện ở hầu hết các chỉ tiêu như chiều cao cây (13,3 cm), số lá/cây (14,67 lá), số rễ/cây (26,67 rễ), chiều dài lá (4,03 cm), chiều rộng lá (3,77 cm), khối lượng tươi (3816 mg) và khối lượng khô (216 mg).

Từ khóa: Cây Cúc, định danh, định lượng, nano bạc, vi sinh vật, vi thủy canh.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tác động kháng vi sinh vật của nano bạc đã được chú ý từ rất lâu và ngày nay nano bạc với kích thước dao động từ 1 – 100 nm đã được ứng dụng nhiều trong y dược. Đã có một vài nghiên cứu tác động của nano bạc lên thực vật. Gần đây, Krishnaraj và đồng tác giả (2012) nghiên cứu ảnh hưởng của nano bạc trên đối tượng *Bacopa monnieri* và nhận thấy rằng nano bạc tổng hợp sinh học có hiệu quả đáng kể trong nảy mầm; tổng hợp protein, carbohydrate; giảm hàm lượng phenol; hoạt động sát trùng và xúc tác. Nano bạc tổng hợp sinh học tăng cường sự nảy mầm của hạt giống và tăng trưởng cây *Boswellia ovalifoliolata* (Savithramma *et al.*, 2012). Nano bạc gia tăng sự sinh trưởng thực vật và các thuộc tính sinh hóa của *Brassica juncea*, đậu và ngô (Salama, 2012; Sharma *et al.*, 2012). Tuy nhiên, Gruyer và đồng tác giả (2013) báo cáo rằng nano bạc vừa có tác dụng tích cực và tiêu cực

lên sự kéo dài rễ tùy thuộc vào các loài thực vật. Ngoài ra, Yin và đồng tác giả (2012) đã nghiên cứu ảnh hưởng của nano bạc lên khả năng nảy mầm của một số loài thực vật (*Lolium multiflorum*, *Panicum virgatum*, *Carex lurida*, *C. scoparia*, *C. vulpinoidea*, *C. crinita*, *Phytolaca americana*, *Scirpus cyperinus* và *Lobelia cardinalis*) và nhận thấy nano bạc tăng cường tỷ lệ nảy mầm của một *E. fistulosum*. Nano bạc kích thích sự tăng trưởng của rễ bằng cách chặn tín hiệu ethylene trong cây *Crocus sativus* (Rezvani *et al.*, 2012). Tác động của nano bạc lên hình thái và sinh lý của cây phụ thuộc vào kích thước và hình dạng của nano bạc (Syu *et al.*, 2014).

Trên lĩnh vực nông nghiệp ở Việt Nam, hiện nay thị trường trong nước xuất hiện nhiều chế phẩm dung dịch nano bạc sử dụng trong nuôi trồng thủy sản phòng bệnh cho tôm, cá; hoặc trong trồng trọt phòng ngừa sâu bệnh cho cây trồng. Đối với công nghệ sinh học thực vật, chưa có nhiều báo cáo hoặc nghiên cứu

đi sâu về ảnh hưởng của nano kim loại lên cây trồng *in vitro*. Dương Tấn Nhựt và đồng tác giả (2014, 2015) đã nghiên cứu ảnh hưởng nano bạc lên sự tăng trưởng của cây Cúc, Dâu tây, Đồng tiền và hoa Hồng nuôi cấy *in vitro*.

Vi thủy canh là hệ thống nhân giống kết hợp giữa vi nhân giống và thủy canh. Phương pháp này có thể khắc phục một số hạn chế của phương pháp nhân giống truyền thống như: không thoáng khí, tiết kiệm nhân công, vật liệu, không sử dụng đường, agar trong môi trường nuôi cấy (Hoàng Thanh Tùng *et al.*, 2015). Tuy nhiên, vi thủy canh là một hệ thống mở, môi trường không cần hấp khử trùng và điều kiện nuôi cấy cũng không tiệt trùng như vi nhân giống, chính vì vậy việc kiểm soát khả năng nhiễm vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy vi thủy canh đang gặp phải khó khăn. Chính vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá tác động của nano bạc lên khả năng sinh trưởng và phát triển của cây Cúc nuôi cấy trong hệ thống vi thủy canh cũng như giảm được tỷ lệ vi sinh vật trong môi trường sau 2 tuần nuôi cấy cũng như gia tăng khả năng tăng trưởng ở giai đoạn vườn ươm.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguồn mẫu và vật liệu

Nguồn mẫu

Mẫu thí nghiệm là các chồi cây Cúc (*Chrysanthemum morifolium*) *in vitro* 45 ngày tuổi sạch bệnh có nguồn gốc từ Nhật Bản (hoa màu trắng), được cấy chuyển nhiều lần, có chiều cao từ 10 – 12 cm tại phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng – Viện Nghiên cứu khoa học Tây Nguyên.

Dung dịch nano bạc

Dung dịch nano bạc do Viện Công nghệ Môi trường cung cấp với các hạt nano bạc có kích thước trung bình ≤ 20 nm được thiết lập theo tỷ lệ: $[AgNO_3]$: 750 – 1000 ppm, $[\beta\text{-chitozan}]$: 250 – 300 ppm, $[NaBH_4]$: 200 ppm, tỷ lệ mol $[NaBH_4]/[AgNO_3]$: $\frac{1}{4}$ và với tốc độ nhỏ giọt của $NaBH_4$ là 10 – 12 giọt/phút (Chau *et al.*, 2008). Nồng độ của dung dịch nano bạc là 500 ppm.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường vi thủy canh: môi trường $\frac{1}{2}$ MS, không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng pH 5,8 (Tùng *et al.*, 2015), không khử trùng, bổ sung các nồng độ nano bạc khác nhau.

Hệ thống nuôi cấy

Hộp nhựa tròn (Đại Đồng Tiến, Việt Nam) có chiều cao 8,5 cm, đường kính miệng 12 cm và đường kính đáy 9 cm. Mỗi hộp nhựa tròn chứa 40 ml môi trường có 1 lỗ thoáng khí kích thước của lỗ màng 0,2 μ m, đường kính lỗ 1,8 cm (Hoàng Thanh Tùng *et al.*, 2015).

Thiết lập giá thể

Các film nylon có kích thước 20 cm \times 30 cm được quấn quanh ống nghiệm có đường kính ngoài 1,5 cm. Sau đó, chúng được hàn dính bằng que kim loại đốt nóng. Tiếp theo, ống nghiệm được lấy ra, phần túi thừa được cắt bỏ tạo thành các ống nhựa dài có đường kính 1,5 cm, các ống nhựa được cắt ngắn thành các đoạn ống túi nylon có chiều dài khoảng 2 cm và cho vào hộp nhựa tròn (Hoàng Thanh Tùng *et al.*, 2015).

Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí như hình 1. Các chồi Cúc *in vitro* dài 3 cm được cắt bỏ phần lá dưới góc (còn lại 2 cặp lá) và nhúng phần gốc vào dung dịch tiền xử lý IBA 500 ppm trong thời gian 20 phút và giữ cho phần ngọn không tiếp xúc với dung dịch tiền xử lý (Hoàng Thanh Tùng *et al.*, 2015). Sau đó, những chồi Cúc này được rửa lại bằng nước cất. Tiếp theo, các chồi Cúc được đưa vào hộp nhựa tròn có sẵn các giá thể được thiết lập ở trên và bổ sung 40 ml môi trường nuôi cấy vi thủy canh với các nồng độ nano bạc khác nhau. Số liệu được ghi nhận sau 2 tuần nuôi cấy.

Khảo sát ảnh hưởng của nano bạc đến khả năng tăng trưởng của cây Cúc trong hệ thống vi thủy canh

Các chồi Cúc (3 cm) được cắt bỏ phần lá dưới góc (còn 2 cặp lá), được xử lý với dung dịch IBA ở nồng độ 500 ppm trong 20 phút; sau đó, đặt những chồi Cúc này vào hệ thống vi thủy canh thiết kế sẵn ở trên với 40 ml/hộp môi trường $\frac{1}{2}$ MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng và bổ sung các nồng độ nano bạc khác nhau (0; 5; 10; 15; 20 ml/l). Các nồng độ này tương ứng với 0; 2,5; 5,0; 7,5 và 10 ppm. Môi trường được điều chỉnh về pH 5,8 và không hấp khử trùng.

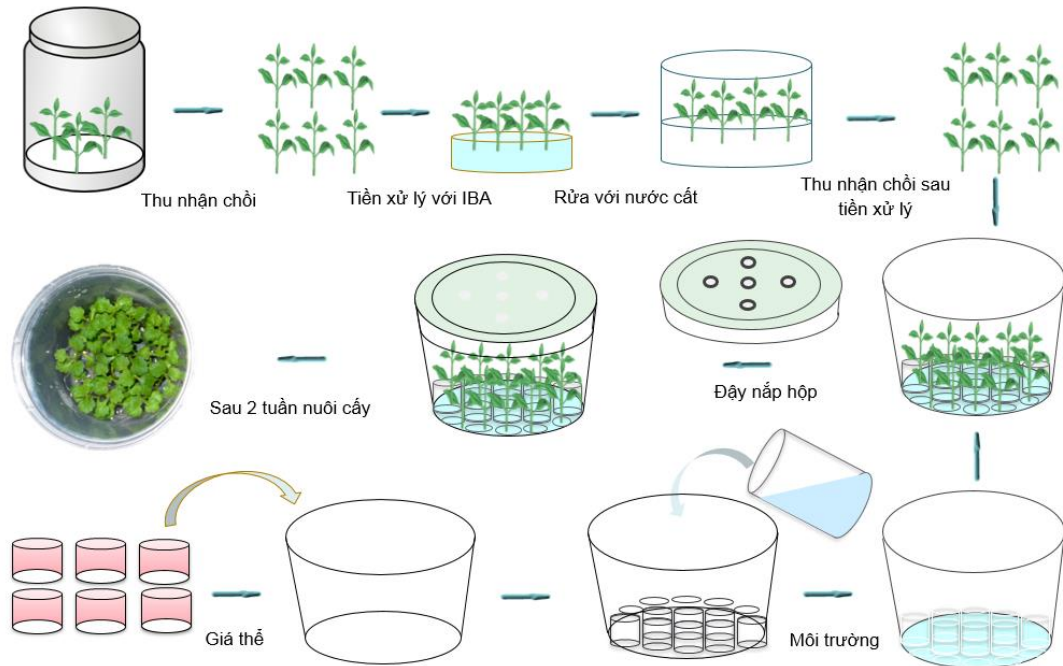
Định danh và định lượng vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy vi thủy canh cây Cúc

Sau 2 tuần nuôi cấy trong môi trường vi thủy canh có bổ sung các nồng độ nano bạc khác nhau,

dung dịch dinh dưỡng (100 ml/nồng độ) còn lại trong hệ thống vi thủy canh được thu nhận để tiến hành định danh và định lượng vi sinh vật có trong môi trường nuôi cấy bằng phương pháp thử định lượng Bergey, ISO 16266, NHS-F15 cho vi khuẩn và

ISO 21527-1 (Bảng phân loại nấm mốc) cho nấm.

Quá trình định danh và định lượng vi sinh vật được thực hiện tại Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học – Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Tp. Hồ Chí Minh.



Hình 1. Các bước bố trí thí nghiệm.

Khảo sát ảnh hưởng của nano bạc đến khả năng tăng trưởng của cây Cúc ở giai đoạn vườn ươm

Chọn các cây Cúc trong hệ thống vi thủy canh sau 2 tuần nuôi cấy trên môi trường có bổ sung nồng độ nano bạc khác nhau ở thí nghiệm trên và cây đối chứng (không bổ sung nano bạc vào môi trường nuôi cấy) chuyển ra trồng ở điều kiện vườn ươm của Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

Cây con được trồng ra vỉ xốp, thời gian đầu được để ở nơi ít ánh sáng để tránh ánh nắng trực tiếp chiếu vào cây, tưới phun sương 2 lần/ngày để giữ độ ẩm cho cây (khi tưới lưu ý không để nước đọng nhiều trên cây con, vì như thế cây dễ bị thối ngọn, thối rễ dẫn đến chết). Sau khi trồng trong vỉ xốp khoảng 1 tuần, cây được chuyển ra nơi có ánh sáng nhiều hơn lúc ban đầu (vẫn trong điều kiện vườn ươm có che chắn, che sáng 70%). Lúc này cây đã quen dần với điều kiện *ex vitro*, lượng nước trong mỗi lần tưới tăng lên. Sau 1 tuần ở

vườn có che chắn, chuyển cây từ vỉ xốp trồng vào trong các chậu nhựa; các chậu này thường có lỗ nhỏ ở đáy chậu để đảm bảo sự thoát nước tránh cho cây không bị úng. Tiếp tục chăm sóc, tưới nước, nhổ cỏ, bón phân, phun thuốc diệt nấm, bệnh cho cây mỗi tuần một lần. Theo dõi sự tăng trưởng của cây sau 4 tuần tại vườn ươm.

Điều kiện nuôi cấy

In vitro: Thí nghiệm được tiến hành trong phòng thí nghiệm với nhiệt độ phòng $25 \pm 2^\circ\text{C}$, chu kỳ chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ với ánh sáng huỳnh quang, độ ẩm trung bình 55 – 60%.

Ex vitro: Vườn ươm Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, nhiệt độ 17 – 25°C, độ ẩm 75 – 80%, điều kiện chiếu sáng 50% ánh sáng tự nhiên.

Chỉ tiêu theo dõi và xử lý số liệu

Tăng trưởng của cây cúc trong hệ thống vi thủy canh: Tiến hành ghi nhận các chỉ tiêu như chiều cao cây (cm), số lá/cây, chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm), số rễ/cây, chiều dài rễ (cm), khối lượng tươi (mg), khối lượng khô (mg) và SPAD (chỉ số chlorophyll) của cây Cúc sau 2 tuần nuôi cấy. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi thí nghiệm tiến hành trên 10 hộp nhựa tròn, mỗi hộp chứa 15 mẫu.

Định danh và định lượng vi sinh vật: Xác định được các loài vi khuẩn và nấm mốc cũng như hàm lượng của chúng có trong dung dịch dinh dưỡng vi thủy canh thu nhận sau 2 tuần nuôi cấy.

Đối với thí nghiệm ngoài vườn ươm: Tiến hành ghi nhận các chỉ tiêu: tỷ lệ sống sót (%), chiều cao cây (cm), số lá mới/cây, chiều dài lá (cm), chiều rộng lá (cm) của cây Cúc sau 4 tuần. Một trăm cây thí nghiệm (nồng độ nano bạc khác nhau) và đối chứng được trồng ra ngoài vườn ươm để đánh giá sự tăng trưởng của chúng.

Tất cả các số liệu sau khi thu thập ứng với từng chỉ tiêu theo dõi, được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel[®] 2010 và phần mềm phân tích thống kê SPSS 16.0 theo phương pháp Duncan test với $P < 0,05$ (Duncan, 1995).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của nồng độ nano bạc đến khả năng tăng trưởng của cây Cúc trong hệ thống vi thủy canh

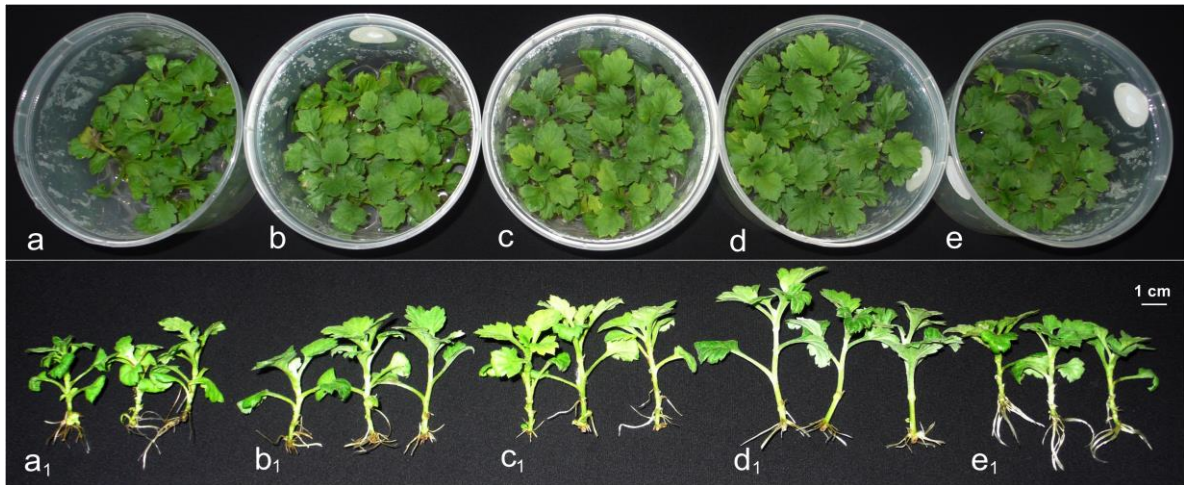
Sau 2 tuần nuôi cấy trong hệ thống vi thủy canh hộp nhựa tròn bổ sung các nồng độ khác nhau của nano bạc, kết quả được ghi nhận ở bảng 1 và hình 2.

Kết quả cho thấy rằng, khi bổ sung nồng độ

nano bạc khác nhau vào môi trường nuôi cấy thì cây vẫn tăng trưởng tốt. Các chỉ tiêu về tăng trưởng của cây như chiều cao cây, chiều dài rễ, chiều dài lá, chiều rộng lá, khối lượng tươi và khối lượng khô đều tăng tỷ lệ thuận với việc tăng nồng độ của nano bạc bổ sung vào môi trường nuôi cấy từ 0 – 7,5 ppm và đạt cao nhất khi bổ sung nano bạc với nồng độ 7,5 ppm (5,59 cm; 1,48 cm; 1,73 cm; 1,57 cm; 516 mg và 48,67 mg; tương ứng). Hầu như không có sự khác biệt về chỉ tiêu số lá/cây, số rễ/cây giữa các nghiệm thức này.

Tuy nhiên, khi tăng nồng độ nano bạc trong môi trường nuôi cấy lên 10 ppm, kết quả ghi nhận được lại cho thấy sự sinh trưởng của cây lại chậm lại, hầu hết các chỉ tiêu theo dõi của cây đều thấp hơn so với cây ở nồng độ nano bạc 7,5 ppm (trừ chỉ tiêu số lá/cây là tương đương) (Bảng 1). Bên cạnh đó, khi bổ sung 10 ppm nano bạc vào môi trường nuôi cấy vi thủy thủy canh, kết quả ghi nhận được cho thấy hình thái lá của một số cây bị biến dạng (Hình 3).

Khi quan sát dưới kính hiển vi soi nổi, hình thái rễ của cây Cúc cũng có sự khác biệt khi được nuôi cấy trong hệ thống vi thủy canh bổ sung các nồng độ khác nhau của nano bạc (Hình 4). Ở nghiệm thức đối chứng và bổ sung 7,5 ppm nano bạc, hình thái của rễ là tương đồng nhau, rễ bị thâm đen phần chóp rễ, điều này có thể là do rễ bị ngập trong nước nên gây ra hiện tượng này (Hình 4 a, b). Tuy nhiên, khi tăng nồng độ nano trong môi trường vi thủy canh lên 10 ppm thì hình thái rễ cho thấy sự khác biệt so với các nghiệm thức bổ sung nồng độ nano bạc thấp hơn (Hình 4 c). Ở nồng độ này, hầu hết các rễ bị hóa nâu, một số rễ bị chết; có thể nồng độ nano bạc quá cao đã gây nên hiện tượng này, điều này làm cho khả năng hấp thu chất dinh dưỡng và nước của rễ giảm dẫn đến cây sinh trưởng phát triển chậm hơn các nghiệm thức khác (Bảng 1).



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ nano bạc đến khả năng tăng trưởng của cây Cúc trong hệ thống vi thủy canh sau 2 tuần nuôi cấy. **a, a₁**: không bổ sung nano bạc; **b, b₁**: bổ sung 2,5 ppm nano bạc; **c, c₁**: bổ sung 5 ppm nano bạc; **d, d₁**: bổ sung 7,5 ppm nano bạc; **e, e₁**: bổ sung 10 ppm nano bạc.



Hình 3. Hình thái lá của một số cây Cúc trong hệ thống vi thủy canh bổ sung 10 ppm nano bạc sau 2 tuần nuôi cấy được quan sát dưới kính hiển vi soi nổi. **a**: lá bị chết hoàn toàn; **b**: lá bị chết ở phần ngọn; **c, d, e**: lá bị vàng một phần.

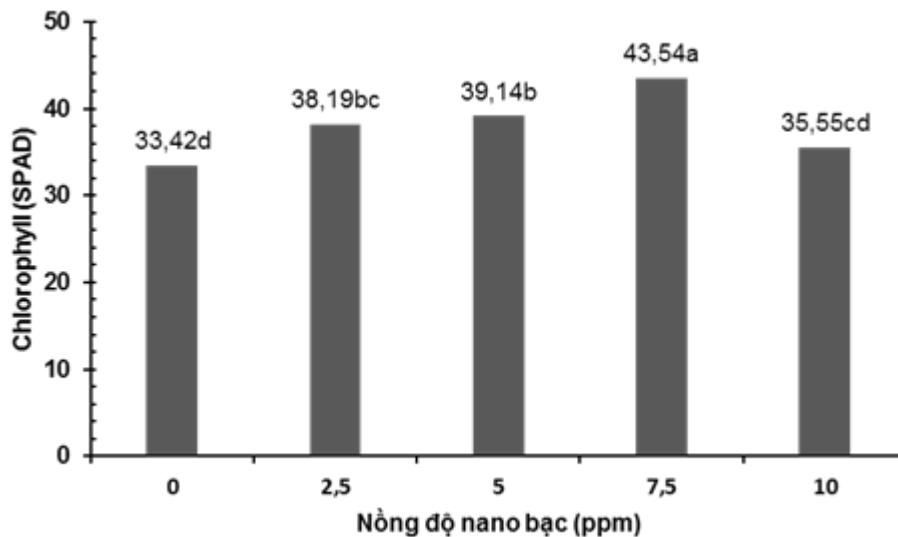


Hình 4. Hình thái rễ của cây Cúc trong hệ thống vi thủy canh bổ sung nồng độ nano bạc khác nhau sau 2 tuần nuôi cấy được quan sát dưới kính hiển vi soi nổi. **a**: không bổ sung nano bạc; **b**: bổ sung 7,5 ppm nano bạc; **c**: bổ sung 10 ppm nano bạc.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ nano bạc đến khả năng tăng trưởng của cây Cúc trong hệ thống vi thủy canh sau 2 tuần nuôi cấy.

Nồng độ nano bạc (ppm)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây	Số rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)
0	5,53b	7,33a	12,00a	1,22b	1,07cd	1,10b	289,67c	26,00d
2,5	4,96bc	7,00a	11,00a	0,84c	1,20bc	1,13b	320,67c	31,67c
5,0	5,59b	7,33a	12,33a	1,14b	1,30b	1,20b	405,33b	39,67b
7,5	6,98a	7,67a	13,00a	1,48a	1,73a	1,57a	516,00a	48,67a
10	4,72c	7,00a	7,33b	0,75c	1,00d	0,83c	270,00c	28,00cd

Ghi chú: *Các chữ cái a, b,... trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $P < 0,05$ trong phép thử Duncan.



Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ nano bạc đến khả năng tổng hợp chlorophyll của lá cây Cúc trong hệ thống vi thủy canh sau 2 tuần nuôi cấy.

Trong thí nghiệm này, chỉ tiêu hàm lượng chlorophyll của lá cũng được chúng tôi ghi nhận (Hình 5). Kết quả cho thấy, bổ sung 7,5 ppm nano vào môi trường nuôi cấy cho thấy khả năng tích lũy chlorophyll là cao nhất (43,54 SPAD).

Mặc dù ảnh hưởng của nano bạc đã được báo cáo trên rất nhiều đối tượng vi sinh vật và tế bào động vật; tuy nhiên, chỉ có một vài nghiên cứu hoàn thành trên đối tượng thực vật (Krishnaraj *et al.*, 2012; Savithramma *et al.*, 2012; Salama, 2012;

Sharma *et al.*, 2012; Monica, Cremonini, 2009). Trong nuôi cấy mô thực vật, nano bạc không chỉ có vai trò làm tăng cường khả năng sinh trưởng, phát triển (chiều dài chồi và rễ, diện tích lá), tăng cường các quá trình biến dưỡng trong cây (tổng hợp chlorophyll, tăng hàm lượng carbohydrate và protein và tổng hợp các enzyme oxy hóa) của cải *Brassica juncea*, Đậu và Ngô (Salama, 2012; Sharma *et al.*, 2012) mà còn tăng cường khả năng hình thành rễ, ức chế hình thành ethylene ở cây *Crocus sativus*

(Rezvani *et al.*, 2012). Nồng độ nano bạc tối ưu cho quá trình sinh trưởng phát triển trên cây Cúc (10 mg/l), Đồng tiền (5 mg/l) và Dâu tây (10 mg/l) cũng đã được khảo sát (Nhật *et al.*, 2014). Nghiên cứu gần đây của Nhật và đồng tác giả (2015) cho thấy nano bạc có hiệu quả lên khả năng nhân chồi, tăng trưởng của cây hoa Hồng (*Rosa sp.*) ở giai đoạn *in vitro*.

Định danh và định lượng vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy vi thủy canh cây Cúc

Sau khi ghi nhận số liệu của cây Cúc sau 2 tuần nuôi cấy trong hệ thống vi thủy canh bổ sung các nồng độ nano bạc khác nhau, dung dịch dinh dưỡng còn lại được chúng tôi thu nhận và đưa đi phân tích tại Trung tâm Khoa học và Công nghệ (Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Tp. Hồ Chí Minh) nhằm định danh và định lượng vi sinh vật có trong môi trường nuôi cấy vi thủy canh bổ sung các nồng độ nano bạc khác nhau. Kết quả chúng tôi đã định danh được 8 loài vi khuẩn và 3 loài nấm mốc cũng như định lượng được hàm lượng của chúng trong dung dịch dinh dưỡng còn lại của hệ thống vi thủy canh dựa trên 4 phương pháp thử định

lượng Bergey, ISO 16266, NHS-F15 cho vi khuẩn và ISO 21527-1 cho nấm (Bảng 2).

Ở nồng độ 2,5 ppm nano bạc bổ sung vào môi trường nuôi cấy, kết quả ghi nhận được cho thấy, hàm lượng các vi sinh vật giảm không đáng kể so với đối chứng là không bổ sung nano bạc. Chỉ có một số loài là bị tác động bởi nano bạc là *Enterobacter sp.* (5 CFU/ml), *Alterneria sp.* ($1,7 \times 10^2$ CFU/ml), còn những loài còn lại thì hàm lượng tương đương, thậm chí cao hơn đối chứng. Khi tăng nồng độ nano bạc trong môi trường nuôi cấy lên 5 ppm, hiệu quả làm giảm hàm lượng vi sinh vật bắt đầu có hiệu quả, hầu hết hàm lượng các loài vi sinh vật đều giảm như loài *Corynebacterium sp.* (giảm khoảng 5 lần); *Arthrobacter sp.* (giảm khoảng 8 lần); *Agrobacterium sp.*, *Bacillus sp.*, *Aspergillus sp.* (giảm khoảng 2 lần); *Xanthomonas sp.* (giảm khoảng 100 lần), *Pseudomonas sp.* (giảm khoảng 65 lần) so với nồng độ 5 ml/l. Tuy nhiên, vẫn còn một số loài cho hiệu quả thấp (*Fusarium sp.*, *Alterneria sp.*). Khi tăng nồng độ lên đến 7,5 ppm, hiệu quả làm giảm hàm lượng vi sinh vật của nano bạc tăng lên đáng kể (Bảng 2).

Bảng 2. Định danh và định lượng vi sinh vật trong môi trường vi thủy canh bổ sung các nồng độ nano bạc khác nhau sau 2 tuần nuôi cấy.

Loài (CFU/ml)	Phương pháp thử	Nồng độ / Phương pháp thử				
		Nồng độ nano bạc (ppm)				
		0	2,5	5,0	7,5	10
<i>Corynebacterium sp.</i>	BMDB	$7,3 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$	$9,6 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$	< 1
<i>Enterobacter sp.</i>	BMDB	$1,7 \times 10^4$	5	< 10	< 1	< 1
<i>Arthrobacter sp.</i>	BMDB	$2,1 \times 10^6$	$5,4 \times 10^7$	$7,2 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$	< 1
<i>Agrobacterium sp.</i>	BMDB	$4,5 \times 10^5$	$6,7 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$1,6 \times 10^5$	< 1
<i>Xanthomonas sp.</i>	BMDB	$8,1 \times 10^2$	$9,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	< 1	< 1
<i>Pseudomonas sp.</i>	ISO 16266	$7,5 \times 10^3$	$8,4 \times 10^3$	$1,3 \times 10^2$	< 1	< 1
<i>Bacillus sp.</i>	NHS-F15	$1,7 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	< 1	< 1
<i>Micrococcus sp.</i>	BMDB	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
<i>Aspergillus sp.</i>	ISO 21527-1	$3,2 \times 10^3$	$4,1 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$	$3,2 \times 10^2$	< 1
<i>Fusarium sp.</i>	ISO 21527-1	$2,2 \times 10^2$	$5,6 \times 10^2$	$6,4 \times 10^2$	$5,8 \times 10^3$	< 1
<i>Alterneria sp.</i>	ISO 21527-1	$4,7 \times 10^3$	$1,7 \times 10^2$	$2,5 \times 10^3$	10	< 1

BMDB: Phương pháp định lượng vi khuẩn Bergey.

Tại nồng độ này, nano bạc đã làm giảm hàm lượng được một số loài vi sinh vật như *Enterobacter sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* (< 1 CFU/ml) và có hiệu quả đáng kể đối với loài *Alterneria sp.* (giảm 2.500 lần so với nồng độ 5 ppm và 4.700 lần so với không bổ sung nano bạc). Một số

loài giảm nhiều lần so với đối chứng như *Asperillus* (10 lần); *Corynebacterium sp.*, *Agrobacterium sp.* (khoảng 3 lần). Tuy nhiên nano bạc chưa có tác động lên một số loài (*Arthrobacter sp.* và *Fusarium sp.*). Nồng độ nano bạc trong môi trường nuôi cấy tăng lên đến 10 ppm thì kết quả ghi nhận được cho thấy,

hàm lượng vi sinh vật thu nhận được không đáng kể. Mặc dù ở nồng độ 10 ppm nano bạc hiệu quả làm giảm hàm lượng vi sinh vật là tối đa nhưng sự sinh trưởng của cây Cúc sau 2 tuần nuôi cấy trong hệ thống vi thủy canh là không tối ưu. Có thể nồng độ 10 ppm là quá cao đã gây ức chế cho sự tăng trưởng của cây (Bảng 1), sự sinh trưởng của cây chậm lại, một số lá bị biến dạng và chết, rễ của một số cây bị hóa nâu và chết (Hình 4). Trong thí nghiệm này, loài *Micrococcus* sp. không ghi nhận được kết quả. Từ những kết quả ghi nhận được như trên, chúng tôi nhận thấy việc bổ sung 7,5 ppm nano bạc vào môi trường nuôi cấy cho thấy hiệu quả làm giảm hàm lượng vi sinh vật.

Trước đây, các hạt nano bạc được sử dụng để khử trùng mẫu trong nuôi cấy mô thực vật để ngăn chặn nhiễm vi sinh vật đã được báo cáo đầu tiên bởi Abdi và đồng tác giả (2008). Trong nghiên cứu này, nano bạc được bổ sung như là một chất khử trùng bề mặt để làm giảm khả năng nhiễm khuẩn của mẫu. Cho đến nay, việc bổ sung nano bạc trực tiếp vào môi trường nuôi cấy mô thực vật cũng như nuôi cấy vi thủy canh để nghiên cứu tác động của chúng đến khả năng làm giảm tỉ lệ nhiễm vi sinh vật vẫn còn đang rất hạn chế. Những kết quả của nghiên cứu này bước đầu đưa ra một phương thức bổ sung nano bạc trực tiếp vào môi trường nuôi cấy nhằm gia tăng khả năng sinh trưởng và phát triển của cây cũng như làm giảm tỉ lệ nhiễm vi sinh vật trong môi trường nuôi

cây vi thủy canh.

Ảnh hưởng của nano bạc đến khả năng tăng trưởng của cây Cúc ở giai đoạn vườn ươm

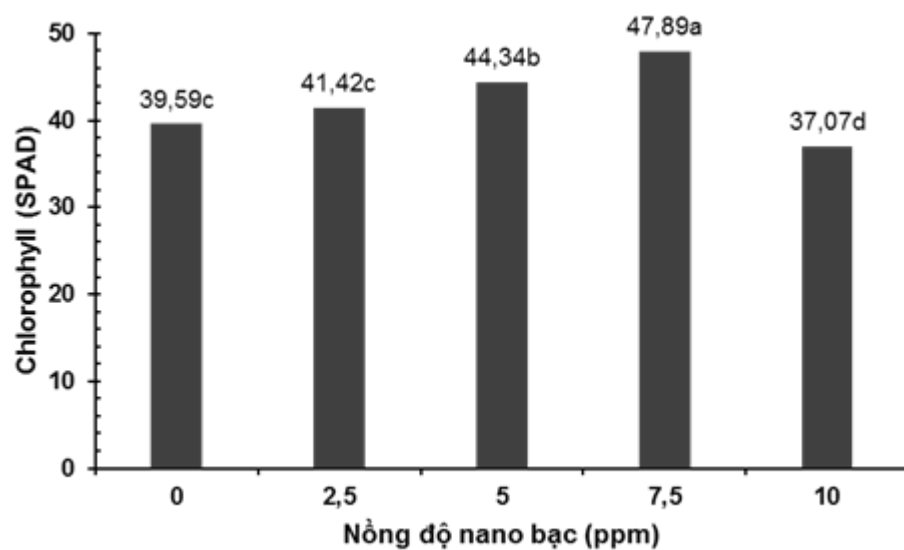
Để có sự đánh giá rõ ràng hơn của nano bạc đến cây Cúc trong hệ thống vi thủy canh, các cây Cúc được nuôi cấy trong hệ thống vi thủy canh bổ sung nồng độ nano bạc khác nhau được chuyển ra trồng tại vườn ươm để tiếp tục theo dõi và đánh giá khả năng tăng trưởng của chúng. Sau 4 tuần trồng tại vườn ươm, sự tăng trưởng của cây Cúc được ghi nhận ở bảng 3, hình 6 và 7. Kết quả ghi nhận được cho thấy, cây Cúc trong hệ thống vi thủy canh bổ sung 7,5 ppm nano bạc sau khi chuyển ra vườn ươm cho tỷ lệ sống sót cao (100%) và sự tăng trưởng tốt hơn so với các nghiệm thức khác thể hiện ở hầu hết các chỉ tiêu như chiều cao cây (13,3 cm), số lá/cây (14,67 lá), số rễ/cây (26,67 rễ), chiều dài lá (4,03 cm), chiều rộng lá (3,77 cm), khối lượng tươi (3816 mg) và khối lượng khô (216 mg) (Bảng 3).

Cây Cúc có nguồn gốc từ hệ thống vi thủy canh bổ sung 10 ppm nano bạc khi chuyển ra vườn ươm cho tỉ lệ sống sót thấp hơn các nghiệm thức khác và các chỉ tiêu theo dõi cũng thấp hơn so với cây Cúc ở nồng độ 7,5 ppm nano bạc. Hàm lượng chlorophyll trong lá của cây Cúc sau khi chuyển ra vườn ươm cho thấy sự thay đổi không đáng kể so với lúc ghi nhận số liệu sau 2 tuần nuôi cấy trong hệ thống vi thủy canh (Hình 6).

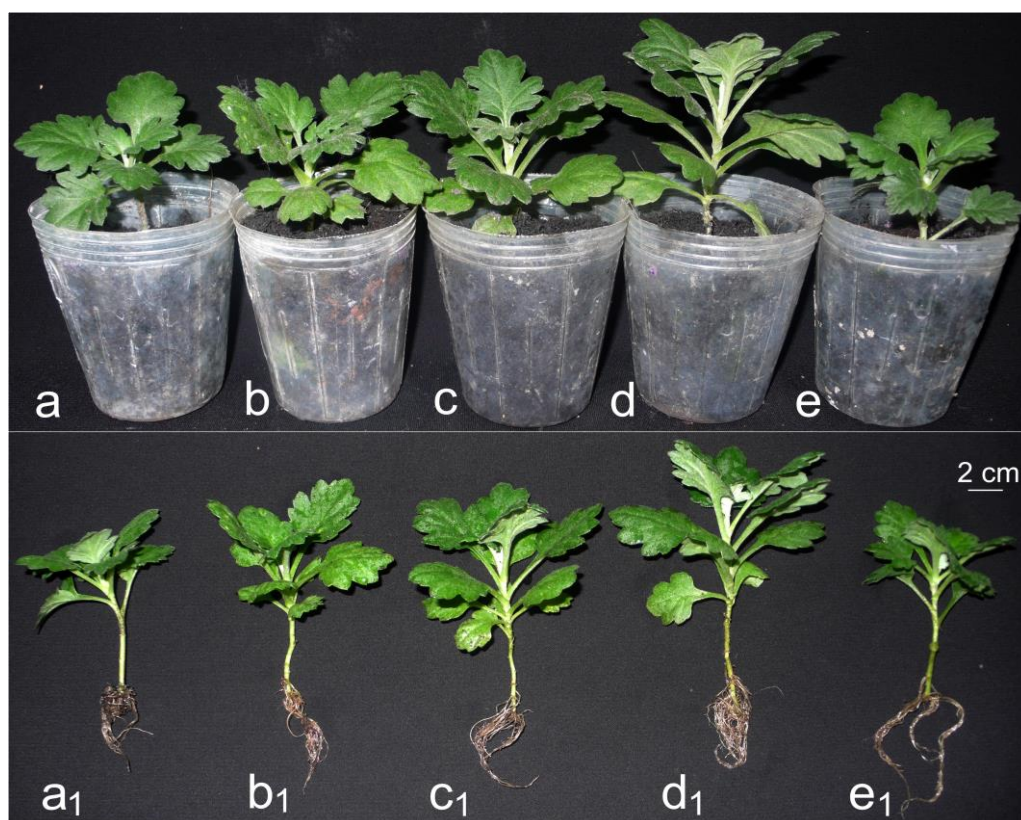
Bảng 3. Ảnh hưởng của nano bạc đến khả năng tăng trưởng của cây Cúc sau 4 tuần ở giai đoạn vườn ươm.

Nồng độ nano bạc (ppm)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây	Số rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)	Tỷ lệ sống sót (%)
0	9,33d	10,33d	17,33c	6,87a	3,27c	2,77d	1706d	106d	95
2,5	9,47d	11,33cd	15,67c	6,97a	3,37bc	3,20bc	2431c	136d	95
5,0	11,27b	13,67ab	17,33c	6,97a	3,57b	3,37b	3219b	300b	100
7,5	13,33a	14,67a	26,67a	7,33a	4,03a	3,77a	3816a	367a	100
10	10,43c	12,67bc	21,23b	7,27a	3,33bc	3,07c	2189c	216c	85

Ghi chú: *Các chữ cái a, b,... trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $P < 0,05$ trong phép thử Duncan.



Hình 6. Ảnh hưởng của nồng độ nano bạc đến khả năng tổng hợp chlorophyll của lá cây Cúc trong hệ thống vi thủy canh sau 4 tuần ở giai đoạn vườn ươm.



Hình 7. Ảnh hưởng của nồng độ nano bạc đến khả năng tăng trưởng của cây Cúc trong hệ thống vi thủy canh sau 4 tuần ở giai đoạn vườn ươm. a, a₁: không bổ sung nano bạc; b, b₁: bổ sung 2,5 ppm nano bạc; c, c₁: bổ sung 5 ppm nano bạc; d, d₁: bổ sung 7,5 ppm nano bạc; e, e₁: bổ sung 10 ppm nano bạc.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, việc bổ sung 7,5 ppm nano bạc vào môi trường nuôi cấy vi thủy canh cho thấy gia tăng sự tăng trưởng của cây cũng như có vai trò trong việc giảm hàm lượng một số loại vi sinh vật sau 2 tuần nuôi cấy. Khi chuyển ra giai đoạn vườn ươm 4 tuần, sự tăng trưởng của cây Cúc ở nồng độ nano bạc này tốt hơn so với các nồng độ khác.

Lời cảm ơn: Để hoàn thành nghiên cứu này, nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự tài trợ kinh phí của đề tài “Nghiên cứu tác động của hạt nano kim loại lên khả năng tái sinh, sinh trưởng, phát triển và tích lũy hoạt chất trong quá trình nhân giống vô tính một số cây trồng có giá trị kinh tế cao ở Việt Nam” thuộc Hợp phần IV: “Nghiên cứu cơ chế tác động và đánh giá an toàn sinh học của các chế phẩm nano được nghiên cứu trong dự án”, mã số: VAST.TĐ.NANO.04/15-18.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdi G, Salehi H, Khosh-khuri M (2008) Nano silver: Anovel nanomaterial for removal of bacterial contamination in *Valerian* (*V. officinalis*) tissue culture. *Acta Physiol Plant* 30: 709-714.
- Duncan DB (1995) Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11: 1-42.
- Dương Tấn Nhựt, Hồ Thanh Tâm, Nguyễn Thị Thanh Hiền, Lê Kim Cương, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Thị Hiền, Trịnh Thị Hương, Nguyễn Hồng Hoàng, Nguyễn Xuân Tuấn, Nguyễn Việt Cường, Đỗ Mạnh Cường, Nguyễn Hoài Châu và Ngô Quốc Bửu (2014). Khảo sát ảnh hưởng của nano bạc lên sự tăng trưởng của cây cúc, dâu tây, đồng tiền nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 12(1): 103-111.
- Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Xuân Tuấn, Nguyễn Thị Thùy Anh, Hồ Việt Long, Nguyễn Bá Nam, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Quốc Luận, Hoàng Thanh Tùng (2015) Đánh giá tác động của nano bạc trong việc cải tiến chất lượng cây hoa hồng (*Rosa* sp.) nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 13(2): 231-239.
- Gruyer N, Dorais M, Bastien C, Dassylva N, Triffault-Bouchet G (2013) Interaction between silver nanoparticles and plant growth. *Inter Symp New Technol Envir Con, Energy-saving Crop Prod in Greenh Plant Factory-greensys*, Jeju, Korea, 6-11.
- Hoàng Thanh Tùng, Trương Thị Bích Phượng, Dương Tấn Nhựt (2015) Hệ thống vi thủy canh trong nhân giống cây Cúc trắng (*Chrysanthemum morifolium*). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 13(4): 1127-1137.
- Krishnaraj C, Jagan EG, Ramachandran R, Abirami SM, Mohan N, Kalaichelvan PT (2012) Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. *Process Biochem* 47(4): 651-658.
- Monica RC, Cremonini R (2009) Nanoparticles and higher plants. *Caryol* 62(2): 161-165.
- Rezvani N, Sorooshzadeh A, Farhadi N (2012) Effect of nano-silver on growth of saffron in flooding stress. *World Acad Sci Eng Technol* 1: 517-522.
- Salama HMH (2012) Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). *Res J Biotechnol* 3(10): 190-197.
- Savithamma N, Ankanna S, Bhumi G (2012) Effect of nanoparticles on seed germination and seedling growth of *Boswellia ovalifoliolata* an endemic and endangered medicinal tree taxon. *Nano Vision* 2: 61-68.
- Sharma P, Bhatt D, Zaidi MG, Saradhi PP, Khanna PK., Arora S (2012) Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. *Appl Biochem Biotech* 167: 2225-2233.
- Syu YY, Hung JH, Chen JC, Chuang HW (2014) Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression. *Plant Physiol Bioch* 83: 57-64.
- Yin L, Colman BP, McGill BM, Wright JP, Bernhardt ES (2012) Effects of silver nanoparticle exposure on germination and early growth of eleven wetland plants. *PLOS One* 7: 1-7.

EFFECTS OF NANO SILVER ON GROWTH OF *CHRYSANTHEMUM MORIFOLIUM* IN MICROPONIC SYSTEM

Hoang Thanh Tung^{1,2}, Nguyen Phuc Huy¹, Nguyen Ba Nam¹, Vu Quoc Luan¹, Vu Thi Hien¹, Truong Thi Bich Phuong², Duong Tan Nhut^{1,✉}

¹Tay Nguyen Institute for Scientific Research, VAST

²Hue University of Sciences, Hue University

SUMMARY

Nano Silver has been proven to be effectively applied in the field of biotechnology. In the area of plant biotechnology, nanoparticles have positive and negative effect on the growth of plants. The impact of nanoparticles on plant depends on the composition, content, size, chemical and physical properties of nanoparticles as well as the plant species. The impact of silver nanoparticles on the problem of infection during culturing, the growth of plants in microponic systems and acclimatization of the plant in greenhouse were studied. In this work, the microponic medium supplemented with of 7.5 ppm silver nanoparticles showed the highest growth rate of *Chrysanthemum* after 2 weeks in culture. Results of qualitative and quantitative microbial content in microponic culture medium by 4 testing methods including Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, ISO 16266, ISO 21527-1 for bacteria and NHS-F15 for fungi also showed that concentration of 7.5 ppm nanoparticles reduces the microbial content of the 8 species of bacteria (*Corynebacterium* sp., *Enterobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Xanthomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. and *Micrococcus* sp.) and three species of fungi (*Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. and *Alternaria* sp.). The growth of *Chrysanthemum* plant in a concentration of nanoparticles is better than the other levels after 4 weeks in the greenhouse such as high survival rate (100%), plant height (13.3 cm), number of leaves per plant (14.67 leaves), number of roots per plant (26.67 roots), leaf length (4.03 cm), leaf width (3.77 cm), fresh weight (3816 mg) and dry weight (216 mg).

Keywords: *Chrysanthemum*, microbial, microponic, nanoparticles, qualitative, quantitative

✉ Author for correspondence: Tel: +84-63-3831056; Fax: +84-63-3831028; E-mail: duongtannhut@gmail.com