

Evaluation of combining ability of 5 inbred sweet corn lines

Nguyen Phuong, Le Thi Kim Quynh

Abstract

Ten hybrid sweet corn combinations were evaluated to identified combining ability of 5 inbred sweet corn lines (K60, N3, N5, N7 và R11) of S_6 generation. The result showed that the fresh ear yield ranged from 15.5 to 21.3 tons/ha. Among them, in that, the N7 \times R11 combination had the highest yield (21.3 tons/ha), followed by N7 \times K60 (19.8 tons/ha), the brix degree was 13.8% and 14.2%, respectively and higher than that of the control Sugar 75 (with the yield of 19.7 tons/ha and brix of 13.5%). The evaluation of combining ability for fresh ear yield and for brix among 5 sweet corn lines showed that K60 line had higher general combining ability than the remaining ones for both traits. The inbred lines (N7 and R11) had good special combining ability (SCA) for yield (Sij: 1.812') and brix degree (Sij: 0.759').

Keywords: Sweet corn, hybrid combination, combining ability

Ngày nhận bài: 2/12/2017

Người phản biện: TS. Nguyễn Xuân Thắng

Ngày phản biện: 12/12/2017

Ngày duyệt đăng: 19/1/2018

NGHIÊN CỨU SINH TỔNG HỢP BẠC NANO TỪ DỊCH NỘI BÀO VI KHUẨN *Bacillus subtilis* ỨNG DỤNG TRONG NÔNG NGHIỆP

Lê Thị An Nhiên,^{1,2} Trần Đức Trọng³, Lê Thị Thủy Tiên², Nguyễn Đức Lượng², Lê Quang Luân³

TÓM TẮT

Bạc nano được biết đến như là một sản phẩm an toàn với người sử dụng và là vật liệu có hoạt lực kháng vi khuẩn và nấm bệnh cho thực vật rất cao. Trong nghiên cứu này, dung dịch keo bạc nano được tổng hợp từ dung dịch bạc nitrat sử dụng dịch nội bào vi khuẩn *Bacillus subtilis* làm chất khử. Các điều kiện liên quan đến quá trình sinh tổng hợp bạc nano như pH và nhiệt độ phản ứng cũng được khảo sát. Đặc trưng và kích thước hạt trung bình của sản phẩm keo bạc nano sau khi tổng hợp được đánh giá thông qua phổ UV- vis và phân tích hình chụp dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Kết quả cho thấy, bạc nano được tổng hợp từ dịch nội bào vi khuẩn *B. subtilis* có xuất hiện đỉnh hấp thụ với bước sóng cực đại nằm trong khoảng 412 đến 440 nm và kích thước hạt trung bình từ 7 đến 12 nm. Hiệu quả kháng nấm *in vitro* của dung dịch keo bạc nano sau khi tổng hợp cũng được đánh giá thông qua phương pháp gây độc môi trường, kết quả cho thấy dung dịch bạc nano có khả năng kháng nấm *Corynespora cassiicola* gây bệnh rụng lá trên cây cao su cao, đạt 59,46% sau 10 ngày nuôi cấy.

Từ khóa: Bạc nano, dịch nội bào, *Bacillus subtilis*, *Corynespora cassiicola*, kháng nấm

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bạc nano là những hạt bạc kích thước trong khoảng 0,1 đến 100 nm. Khi ở kích thước nano, bạc có những đặc tính độc đáo giúp nó có thể ứng dụng trong chuẩn đoán phân tử, điều trị và là chất kháng khuẩn được sử dụng trong y tế, cũng như trong nhiều lĩnh vực khác (Prabhu and Poulouse, 2012). Đáng chú ý hơn cả, bạc nano có khả năng ức chế mạnh và phổ kháng khá rộng đối với vi khuẩn, nấm và cả virus (Nasrollahi *et al.*, 2011). Cơ chế kháng vi sinh vật của bạc nano cho đến nay vẫn chưa rõ ràng, tuy nhiên có một số giả thuyết cho rằng bạc

nano có khả năng liên kết mạnh với thành phần peptidoglycan trong thành vi sinh vật và gây hạn chế khả năng vận chuyển oxy vào bên trong tế bào. Bên cạnh đó, bạc nano còn có khả năng tương tác trực tiếp với các protein trên thành tế bào của vi sinh vật và từ đó làm thay đổi cấu trúc cũng như tính chất của thành tế bào (Prabhu and Poulouse, 2012). Ngoài ra, các ion Ag^+ còn có khả năng tương tác với nhóm thiol, phosphate, hydroxyl, imidazol và indole của acid nucleic nhân tế bào vi sinh vật. Bên cạnh đó, khi bạc nano tương tác với các thành phần của tế bào vi khuẩn thì sinh ra các gốc oxi hóa mạnh

¹ Ban quản lý Khu Công nghệ cao - Công nghệ Sinh học tỉnh Đồng Nai

² Đại học Bách Khoa, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh

³ Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh

(ROS) tiêu diệt ngược lại vi khuẩn (Verma, 2015). Cho đến nay, có nhiều phương pháp để tổng hợp bạc nano có thể kể đến như: phương pháp khử sử dụng tác nhân vật lý bao gồm phương pháp chiếu xạ (Chen *et al.*, 2007), phương pháp cắt nhỏ khối bằng tia laser (El-Nour *et al.*, 2010) hoặc các phương pháp khử sử dụng chất khử hóa học như hydrazine hydrat (Zhang *et al.*, 1996). Tuy nhiên, các phương pháp này thường tiêu tốn nhiều năng lượng làm tăng giá thành sản phẩm, sử dụng hóa chất khử mạnh gây ô nhiễm môi trường. Phương pháp tổng hợp bạc nano từ nguồn sinh học như vi sinh vật, nấm và thực vật được đánh giá là phương pháp thân thiện môi trường (green technology) trong các phương pháp tạo bạc nano, phương pháp này không gây ô nhiễm môi trường, hiệu quả cao và chi phí thấp.

Cây cao su là loại cây trồng chiến lược, góp một lượng lớn trong nhóm ngành nông nghiệp xuất khẩu của nước ta hiện nay. Tuy nhiên, loại cây trồng này đang gặp nhiều vấn đề hết sức khó khăn trong công tác phòng và chống các bệnh do nấm gây ra. Điển hình là bệnh rụng lá do nấm *Corynespora cassiicola*. Mục đích của cứu này là sử dụng dịch nội bào vi khuẩn *B. subtilis* chế tạo bạc nano có hiệu lực kháng cao đối với kháng nấm *C. cassiicola* là bệnh rụng lá ở cây cao su.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* và nấm *Corynespora cassiicola* do phòng Công nghệ Sinh học Vật liệu và Nano, Trung tâm Công nghệ Sinh học Tp. Hồ Chí Minh cung cấp.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Chế tạo bạc nano từ dịch nội bào của vi khuẩn *B. subtilis*

Vi khuẩn *B. subtilis* được tăng sinh trong các bình tam giác có chứa 150 ml môi trường TSB ở điều kiện pH ~ 6,5 và đặt trên máy lắc (150 vòng/phút) trong vòng 16 giờ. Sau đó tiến hành ly tâm dịch vi khuẩn *B. subtilis* 2 lần ở điều kiện 4000 vòng/phút trong 15 phút để thu sinh khối. Sinh khối vi khuẩn sau đó được rửa lại nhiều lần bằng nước cất trước khi tiến hành phá màng bằng cách để dịch huyền phù ở nhiệt độ phòng trong 3 ngày. Dịch huyền phù sau khi phá vỡ màng được ly tâm lần 2 (4000 vòng/phút, trong 15 phút), thu dịch nội bào vi khuẩn (phần dịch lỏng) và phần sinh khối bã vi khuẩn (phần cặn). Cho 1 ml dịch nội bào vi khuẩn đã pha loãng 25 lần vào 19 ml dung dịch AgNO₃ (1 mM), quá trình sinh tổng hợp

bạc nano xảy ra tại Ph ~ 9 và nhiệt độ phản ứng là 80°C trong vòng 2 giờ. Đo phổ UV- vis của dung dịch sau khi phản ứng để xác định sự hình thành của bạc nano.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của pH và nhiệt độ lên quá trình tổng hợp bạc nano từ dịch nội bào vi khuẩn *B. subtilis*

Để khảo sát ảnh hưởng của pH lên khả năng hình thành bạc nano dịch nội bào của vi khuẩn *B. subtilis*, các phản ứng tổng hợp tạo bạc nano được tiến hành ở các điều kiện pH khác nhau: 7, 8, 9, 10, 11, 12 và 13. Sau khi xác định được pH thích hợp thì giữ ổn định và các điều kiện nhiệt độ khác nhau bao gồm: 60, 70, 80, 90 và 100°C được được khảo sát để tối ưu hóa quy trình sinh tổng hợp bạc nano từ dịch nội bào vi khuẩn *B. subtilis*.

2.2.3. Xác định đặc trưng và kích thước hạt của dung dịch keo bạc nano

Các đặc trưng và kích thước hạt của dung dịch bạc nano được xác định lần lượt bằng cách đo phổ UV- vis và chụp ảnh bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Phổ UV-vis của dung dịch bạc nano được đo bằng cách pha loãng dung dịch trong nước cất sao cho nồng độ bạc đạt 0,1 mM, sử dụng máy quang phổ UV-2401PC (Shimadzu, Nhật Bản) với bước sóng từ 200 - 800 nm. Hình ảnh TEM của các hạt bạc nano được chụp sử dụng kính hiển vi điện tử truyền qua (JEM 1010, JEOL, Nhật Bản).

2.2.4. Khảo sát độ ổn định của dung dịch bạc nano theo thời gian

Dung dịch bạc nano được tổng hợp từ nguồn dịch nội bào của vi khuẩn *B. subtilis* ở điều kiện tối ưu về nhiệt độ và pH được tiến hành lưu trữ ở nhiệt độ phòng. Tiến hành đo phổ UV - vis của dung dịch trong các khoảng thời gian 5, 10 và 20 ngày sau khi tổng hợp nhằm xác định độ ổn định của sản phẩm.

2.2.5. Khảo sát khả năng kháng nấm *C. cassiicola* của chế phẩm bạc nano

Phương pháp gây độc môi trường được sử dụng để khảo sát khả năng kháng nấm của chế phẩm bạc nano. Cách tiến hành như sau: các khoan nấm *C. cassiicola* khoảng 4 ngày tuổi có đường kính khoảng 6 mm được cấy vào trung tâm các đĩa petri (có đường kính 80 mm) có chứa 25 ml môi trường thạch lá cao su và bổ sung bạc nano ở các nồng độ khác nhau (0, 20, 40, 60 và 80 ppm). Các đĩa petri sau khi cấy nấm được ủ tối ở nhiệt độ phòng. Tiến hành đo đường kính tán nấm theo thời gian cho đến khi tán nấm ở đĩa đối chứng (không bổ sung bạc nano) chạm thành đĩa.

Đánh giá độ hữu hiệu (ĐHH) của dung dịch bạc nano theo công thức:

$$\text{ĐHH (\%)} = ((D - d)/D) \times 100$$

Trong đó: *D*, *d* (mm) lần lượt là đường kính tán nằm trên môi trường thạch lá cao su không bổ sung (đối chứng) và có bổ sung dung dịch bạc nano ở các nồng độ bạc khác nhau (Lê Quang Luân và ctv., 2014).

2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Các nghiệm thức được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, một yếu tố, 3 lần lặp lại. Các số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Excel 2013 và SPSS 16.0 với phép thử Duncan với $p \leq 0.05$ (Duncan, 1995).

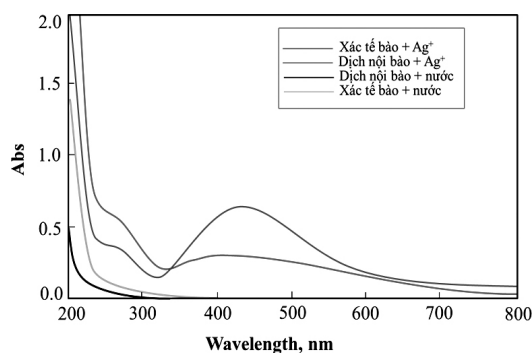
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành trong thời gian từ tháng 5 đến tháng 12/2017 tại Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát khả năng hình thành bạc nano từ dịch nội bào vi khuẩn *B. subtilis*

Dịch enzyme (nội bào) của vi khuẩn *B. subtilis* có thể được sử dụng để hoạt hóa quá trình sinh tổng hợp bạc nano, dung dịch bạc nano này thường cho kết quả kháng lại các vi sinh vật một cách có hiệu quả (Deljou and Goudarzi, 2016; Sarangadharan and Nallusamy, 2015). Do đó, trong thí nghiệm này, dung dịch nội bào từ *B. subtilis* được sử dụng để khảo sát quá trình sinh tổng hợp bạc nano và so sánh với phần xác sinh khối của vi khuẩn sau khi phá màng.

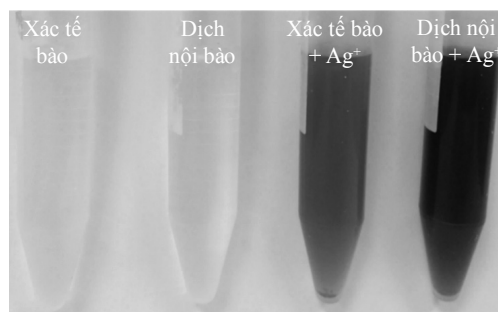


Hình 1. Phổ UV- vis của dịch nội bào và xác sinh khối vi khuẩn *B. subtilis* sau quá trình sinh tổng hợp tạo bạc nano

Kết quả từ hình 1 cho thấy có xuất hiện các đỉnh đặc trưng của bạc nano trong dung dịch được tạo thành từ dịch nội bào của vi khuẩn *B. subtilis* và phần xác tế bào của vi khuẩn. Cụ thể, ở nghiệm thức sử dụng dịch sau phá màng vi khuẩn (có chứa enzyme nội bào) và phần xác tế bào sau phá màng *B. subtilis*

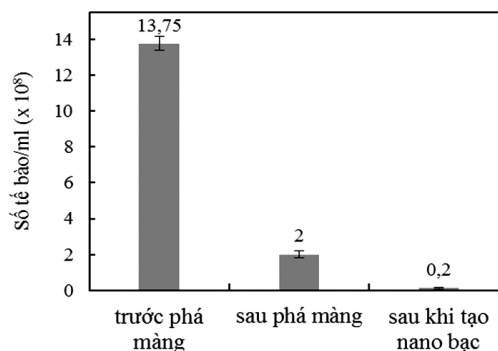
đều xuất hiện phổ hấp thụ đặc trưng của bạc nano với đỉnh tại 415 nm. Tuy nhiên giá trị mật độ quang của nghiệm thức sử dụng dịch nội bào vi khuẩn đạt 0,65 và cao hơn 2,5 lần so với nghiệm thức sử dụng xác tế bào. Điều này chứng tỏ hiệu quả của quá trình sinh tổng hợp từ dịch nội bào vi khuẩn *B. subtilis* sau khi phá màng của vi khuẩn.

Hơn nữa kết quả hình thành của bạc nano từ dịch nội bào vi khuẩn và xác tế bào được khẳng định thông qua hình 2. Kết quả cho thấy có sự thay đổi màu sắc của dung dịch tạo thành sau khi ủ. Màu của dung dịch bạc tạo thành từ dịch nội bào và xác tế bào thay đổi từ trong suốt sang màu nâu và nâu đỏ. Sự thay đổi màu này là do hiệu ứng plasmon. Kết quả nghiên cứu này là tương đồng với các kết quả khác trong quá trình sinh tổng hợp bạc nano từ nguồn vi khuẩn (Minaeian *et al.*, 2008; Natarajan *et al.*, 2010; Sarangadharan and Nallusamy, 2015). Kết quả những nghiên cứu nói trên cũng cho thấy dung dịch bạc nano tạo thành từ dịch nội bào và từ các nguồn vi khuẩn có peak UV-vis đặc trưng nằm trong khoảng 410 nm đến 450 nm và có sự thay đổi màu sắc từ nâu vàng đến nâu đỏ đồng thời có khả năng kháng khuẩn và kháng nấm cao.



Hình 2. Màu sắc của dịch vi khuẩn sau phá màng và bã vi khuẩn

Bên cạnh đó, số lượng tế bào vi khuẩn còn lại trong dịch bạc nano được kiểm tra và kết quả thu được thể hiện ở hình 3.

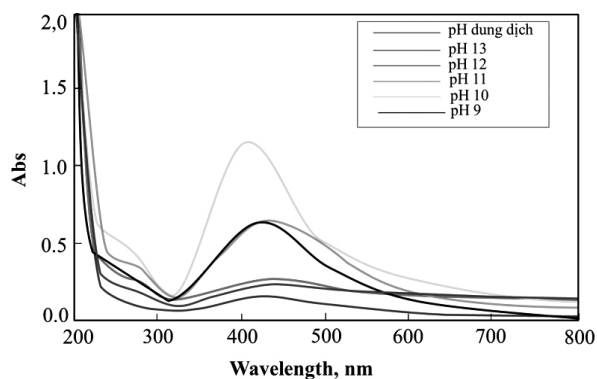


Hình 3. Số lượng tế bào sống của *B. subtilis* trong các quá trình sinh tổng hợp bạc nano

Kết quả cho thấy sau quá trình phá màng vi khuẩn vẫn còn tồn tại tế bào vi khuẩn sống với mật độ khoảng 2×10^8 tế bào. Điều này giải thích lý do mà phần xác tế bào có thể sinh tổng hợp được bạc nano. Sau quá trình ly tâm thu dịch tế bào, quá trình phá màng vẫn tiếp diễn ở phần xác tế bào, cung cấp enzyme nội bào cho quá trình sinh tổng hợp bạc nano. Ngoài ra, bạc nano tạo thành lại có tác dụng diệt khuẩn do đó đã làm giảm mật độ khuẩn xuống còn $0,12 \times 10^8$ tế bào/ml sau quá trình tổng hợp bạc nano.

3.2. Ảnh hưởng của pH lên sự hình thành bạc nano từ vi khuẩn *B. subtilis*

Đối với một phản ứng oxi hóa khử, pH của hệ phản ứng đóng vai trò hết sức quan trọng. Do đó, điều kiện pH khác nhau đã được khảo sát đầu tiên. Kết quả trình bày ở hình 4 cho thấy có sự ảnh hưởng khá lớn của các điều kiện pH khác nhau đến hiệu suất của quá trình sinh tổng hợp bạc nano. Dung dịch bạc nano tạo thành từ điều kiện pH dung dịch (~ 7) có bước sóng hấp thụ cực đại tại 440 nm, trong khi đó tại điều kiện có pH cao (12 và 13) tuy dung dịch có bước sóng hấp thụ cực đại tại các đỉnh lần lượt là 429 và 433 nm nhưng giá trị mật độ quang của dung dịch khá thấp, dung dịch bị tủa và ảnh hưởng đến quá trình hình thành bạc nano. Ở điều kiện pH từ 9 đến 11, dung dịch bạc nano tạo thành có bước sóng hấp thụ cực đại lần lượt ở 423, 412 và 425, tương ứng. Kết quả đo OD tại 420 nm cũng cho thấy tại pH ~ 10 là tối ưu cho quá trình sinh tổng hợp bạc nano từ *B. subtilis* khi mật độ quang dung dịch đạt 0,78 và cao trong tất cả các nghiệm thức. Đặc biệt ở pH ~ 9, màu của dung dịch tạo thành có màu nâu vàng và chuyển dần sang màu nâu đỏ ở pH ~ 10. Nhưng màu của dung dịch bạc nano hình thành tại pH ~ 11, màu dung dịch lại dần chuyển sang màu xanh đen.



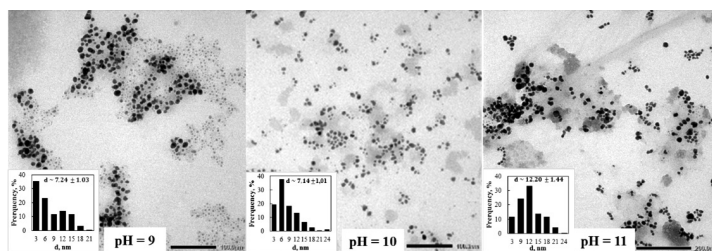
Hình 4. Phổ UV-vis của dung dịch bạc nano hình thành ở các điều kiện pH khác nhau

Bảng 1. Giá trị OD tại bước sóng 420 nm của các dung dịch bạc hình thành ở các điều kiện pH khác nhau

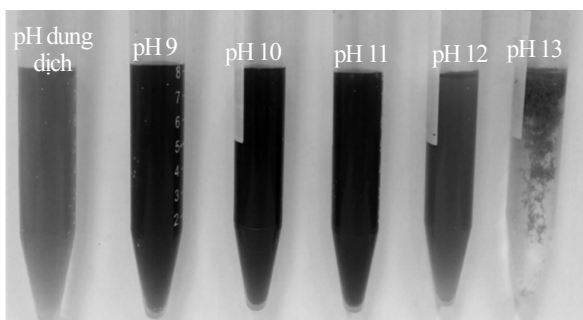
pH	Giá trị OD
Dung dịch (~ 7)	0,15
9	0,58
10	1,18
11	0,60
12	0,30
13	0,11

Song song với việc đo OD của dung dịch bạc nano được sinh tổng hợp từ vi khuẩn *B. subtilis*. Các dung dịch bạc nano được sinh tổng hợp từ pH~9, 10 và 11 còn được chụp ảnh TEM để xác định kích thước hạt bạc tạo thành và phân tích độ phân bố kích thước hạt của các hạt bạc nano trong dung dịch. Kết quả được trình bày tại hình 5. Kết quả cho thấy, ở các khoảng pH khác nhau, các hạt bạc hình thành với kích thước trong khoảng từ 7 nm cho đến 12 nm. Các hạt bạc hình thành có phân bố không đều trong dung dịch. Nguyên nhân có thể là do sau quá trình hình thành, các hạt bạc nano được cố định trong các protein có trong dung dịch, tuy nhiên các protein này lại có khối lượng phân tử và cấu trúc khác nhau, do đó có phân bố khác nhau trong dung dịch. Mặt khác, bạc nano hình thành trong dung dịch có các điều kiện pH khác nhau thì khác nhau về kích thước hạt bạc tạo thành. Cụ thể, ở điều kiện pH ~ 11, các hạt bạc hình thành có kích thước 12,2 nm, các hạt này có kích thước lớn nhất trong các nghiệm thức, độ phân bố về kích thước hạt không đồng đều, trải dài trong khoảng từ 3 đến 24 nm. Trong khi đó, các hạt bạc nano tạo thành từ điều kiện pH thấp hơn (pH ~ 9 và 10) có kích thước hạt bạc nhỏ hơn và tương đương nhau (7,24 và 7,14 nm, tương ứng).

Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của Gurunathan và cộng tác viên (2009). Quá trình sinh tổng hợp bạc nano từ dịch nuôi cấy của chủng *E. coli* DH5α với dung dịch bạc 5 mM tại điều kiện pH 10 có giá trị mật độ quang tại bước sóng 420 nm là cao nhất (4,2) và kích thước hạt bạc nano là nhỏ nhất (10 nm). Kết quả này cho thấy phản ứng khử của các kim loại yêu cầu sự có mặt của nhóm OH⁻; sự có mặt của nhóm OH⁻ làm giảm thời gian của quá trình khử ion kim loại và tăng hiệu suất phản ứng. Tuy vậy, khi pH dung dịch quá cao, các protein có xu hướng bị tủa và ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp nano. Do đó, pH ~ 10 là điều kiện tối ưu để sinh tổng hợp bạc nano từ nguồn *B. subtilis* trong nghiên cứu này.



Hình 5. Ảnh TEM và phân bố kích thước của các hạt bạc nano hình thành ở các điều kiện pH khác nhau.

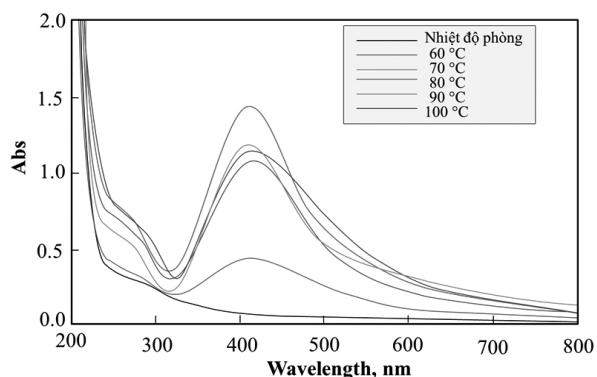


Hình 6. Dung dịch bạc nano hình thành tại các điều kiện pH khác nhau

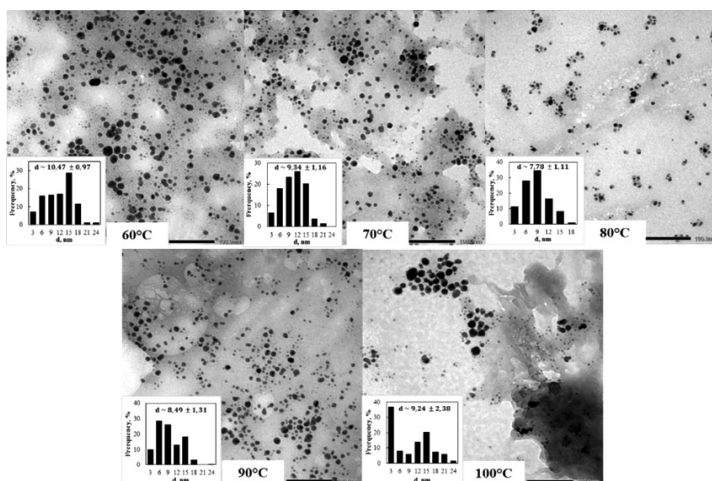
3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự hình thành bạc nano từ vi khuẩn *B. subtilis*

Nhiệt độ của một phản ứng oxi hóa khử sẽ đóng vai trò quyết định tốc độ của phản ứng đó. Do đó, quá trình sinh tổng hợp bạc nano được thực hiện tại các điều kiện nhiệt độ là: nhiệt độ phòng, 60, 70, 80, 90 và 100°C. Kết quả cho thấy (Hình 7), ở tất cả các nhiệt độ khác nhau đều xuất hiện các bước sóng hấp thụ cực đại đặc trưng cho sự hiện diện của bạc nano trong dung dịch. Cụ thể, bước sóng hấp thụ cực đại lần lượt là 429, 423, 415, 425 và 426 nm tương ứng với các khoảng nhiệt độ là 60, 70, 80, 90 và 100°C. Trong đó, ở nhiệt độ 80°C, giá trị OD đạt giá trị cực

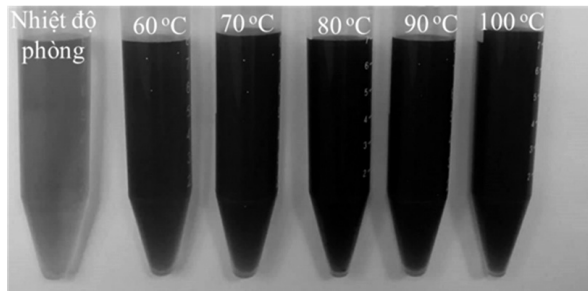
đại (1,452) và bước sóng hấp thụ cực đại là thấp nhất. Nhiệt độ có ảnh hưởng khá lớn đến quá trình sinh tổng hợp bạc nano từ nguồn vi khuẩn. Điều này có thể giải thích là do khi ở nhiệt độ cao, protein trong dung dịch bị biến tính, gây đứt gãy các liên kết peptide tạo điều kiện cho các nhóm enzyme nitrate reductase tiếp xúc nhiều với cơ chất là bạc nitrate làm tăng tốc độ và hiệu suất hình thành bạc nano và do đó làm tăng giá trị OD đo được. Tuy nhiên, khi tăng nhiệt độ lên quá cao, các protein bị biến tính làm hư hại các nhóm đóng vai trò xúc tác phản ứng dẫn đến hiệu suất xúc tác giảm.



Hình 7. Quang phổ hấp thụ của dịch sau phản ứng ở các nhiệt độ



Hình 8. Ảnh TEM và phân bố kích thước của các hạt bạc nano hình thành ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau.

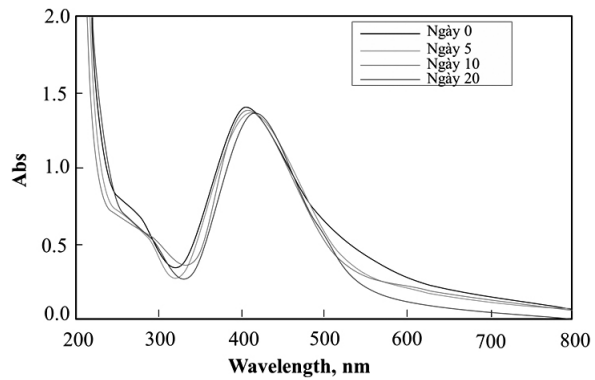


Hình 9. Dung dịch bạc nano hình thành tại các điều kiện nhiệt độ khác nhau

Ở thí nghiệm này, hình TEM cũng được sử dụng để phân tích kích thước và độ phân bố kích thước hạt của các hạt bạc nano hình thành từ phản ứng sinh tổng hợp bạc nano ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau. Kết quả được thể hiện ở Hình 8. Kết quả cho thấy các hạt bạc nano hình thành có kích thước 10,47; 9,34; 7,78; 8,94 và 9,24 nm tương ứng với các nhiệt độ phản ứng là 60, 70, 80, 90 và 100°C. Trong đó hạt bạc nano hình thành với nhiệt độ phản ứng là 80°C có kích thước nhỏ nhất. Do đó, có thể kết luận nhiệt độ 80°C là tối ưu cho phản ứng sinh tổng hợp bạc nano từ nguồn *B. subtilis*.

3.4. Thời gian ổn định của dung dịch bạc nano

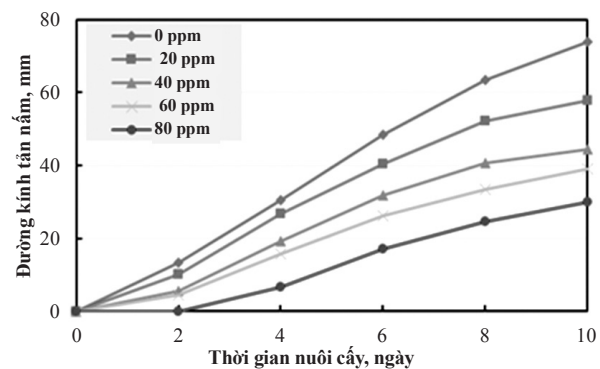
Dung dịch bạc nano tạo thành từ quá trình sinh tổng hợp bạc nano thường có độ ổn định thấp theo thời gian. Do đó trong thí nghiệm này, độ ổn định của dung dịch bạc nano hình thành từ *B. subtilis* chỉ được khảo sát trong 20 ngày sau khi tổng hợp và để ở nhiệt độ phòng. Kết quả do UV-vis (Hình 10) cho thấy, dịch keo bạc nano có bước sóng hấp thụ cực đại có sự thay đổi theo thời gian. Cụ thể, bước sóng hấp thụ cực đại lần lượt là 412, 415, 419 và 422 nm tại thời điểm 0, 5, 10 và 20 ngày sau khi bảo quản. Mật độ quang của dung dịch cũng không thay đổi nhiều theo thời gian, chỉ giảm từ 1,452 ngày đầu tiên xuống còn 1,230 ở ngày thứ 20. Như vậy, dung dịch bạc nano được tổng hợp bởi *B. subtilis* có độ ổn định cao trong vòng 20 ngày ở điều kiện phòng. Điều này có thể giải thích là do một phần bạc nano được hình thành trong quá trình tổng hợp bạc nano được cố định trong các protein nội bào của vi khuẩn *B. subtilis* và có thể giữ ổn định trong thời gian dài, tuy vậy phần còn lại lại phân tán tự do trong dung dịch mà không có chất ổn định nên chúng kết tụ lại với nhau làm tăng kích thước hạt bạc dẫn đến bước sóng hấp thụ tối đa tăng theo thời gian và làm giảm khả năng ổn định của dung dịch bạc nano này theo thời gian (Nohi, 2007).



Hình 10. Quang phổ hấp thụ của dung dịch bạc nano theo thời gian

3.5. Khả năng kháng nấm *C. cassiicola* của dung dịch bạc nano tổng hợp từ nội bào vi khuẩn *B. subtilis*

Nhằm xác định hiệu quả ức chế *C. cassiicola* của dung dịch bạc nano được chế tạo từ dịch nội bào của vi khuẩn *B. subtilis*. Các nồng độ khác nhau của dung dịch bạc nano: 0, 20, 40, 60 và 80 ppm được bổ sung vào môi trường nuôi cấy của nấm *C. cassiicola*. Kết quả được trình bày tại hình 11, bảng 2 và hình 12 cho thấy sau 11 ngày nuôi cấy, ở đĩa đối chứng, tản nấm đạt kích thước đối đa (74 mm) trong khi đó tại các nghiệm thức bổ sung nồng độ thấp của bạc nano (20 và 40 ppm) tản nấm *C. cassiicola* phát triển vẫn khá mạnh đạt 57,9 và 44,6 mm. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ bạc nano bổ sung vào môi trường nuôi cấy lên đến 60 và 80 ppm, nấm *C. cassiicola* phát triển khá chậm chỉ đạt 39,0 và 30,0 mm sau 10 ngày nuôi cấy.

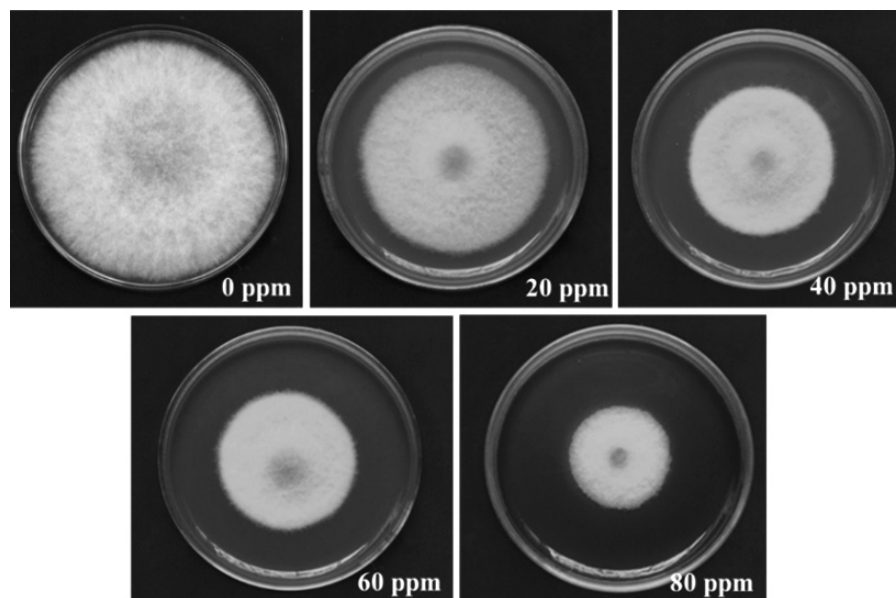


Hình 11. Đường kính tản nấm *C. cassiicola* qua các ngày nuôi cấy khi bổ sung các nồng độ khác nhau của bạc nano

Tại tất cả các nghiệm thức bổ sung bạc nano sinh tổng hợp từ dịch nội bào vi khuẩn *B. subtilis* đều có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *C. cassiicola*. Độ hữu hiệu của bạc nano tăng từ 21,8% đến 59,5%

khi nồng độ bạc nano tăng từ 20 ppm lên đến 80 ppm (Bảng 2). Mặt khác tơ nấm lan rất chậm và mỏng, đường kính tản nấm nhỏ, quan sát hình thái cho thấy các tơ nấm hầu như chỉ lan sát mặt thạch, không thể phát triển mạnh lên như nghiệm thức đối chứng (Hình 12). Theo nghiên cứu của Gajbhiye và cộng tác viên (2009) cho thấy rằng khi

được bổ sung bạc nano sẽ có thể làm tăng cường khả năng kháng một số chủng nấm như *Phoma glomerata*, *Phoma herbarum*, *Fusarium semitectum*, *Tricoderma*. Gopinath và Velusamy (2013) cũng đã chứng minh rằng sử dụng bạc nano được tạo thành từ *B. subtilis* GP-23 có khả năng kháng lại chủng nấm *Fusarium oxysporum*.



Hình 12. Sự phát triển của tản nấm *C. cassiicola* sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường bổ sung bạc nano ở các nồng độ khác nhau

Bảng 2. Sự phát triển của tản nấm *C. cassiicola* sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường bổ sung bạc nano ở các nồng độ khác nhau

Nồng độ AgNPs/CTS, ppm	Đường kính tản nấm, mm	ĐHH, %
0 (ĐC)	74,0 ^a ± 0,0	0,0 ^e ± 0,0
20	57,9 ^b ± 1,4	21,8 ^d ± 1,9
40	44,6 ^d ± 1,3	39,8 ^b ± 1,7
60	39,0 ^e ± 0,9	47,3 ^a ± 1,2
80	30,0 ^c ± 1,7	59,5 ^c ± 2,3

Ghi chú: Những số trong cùng một cột có chữ theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan

IV. KẾT LUẬN

Đã chế tạo thành công bạc nano có kích thước hạt khoảng 7 nm từ dịch nội bào vi khuẩn *B. subtilis* ở điều kiện pH ~ 10 và nhiệt độ phản ứng là 80 °C trong 2 giờ. Dung dịch bạc nano tổng hợp được có độ ổn định tốt sau 20 ngày ở nhiệt độ phòng và có khả năng kháng nấm *C. cassiicola* cao. Dung dịch bạc nano được chế tạo bằng phương pháp sinh học,

không sử dụng hóa chất độc hại và hứa hẹn sẽ là một chế phẩm bảo vệ thực vật an toàn và hiệu quả có thể ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp công nghệ cao và bền vững.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Lê Quang Luân, Nguyễn Huỳnh Phương Uyên và Phan Hồ Giang, 2014. Nghiên cứu hiệu ứng kháng nấm *Phytophthora capsici* gây bệnh chết nhanh ở cây hồ tiêu của chế phẩm nano bạc-chitosan chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ. *Tạp chí Sinh học*, 36(1se): 152-157.
- Chen, P., L. Song., Y. Liu and Y. Fang, 2007. Synthesis of silver nanoparticles by γ -ray irradiation in acetic water solution containing chitosan. *Radiation Physics and Chemistry*, 76(7): 1165-1168.
- Deljou, A. and S. Goudarzi, 2016. Green Extracellular Synthesis of the Silver Nanoparticles Using Thermophilic *Bacillus* Sp. AZ1 and its Antimicrobial Activity Against Several Human Pathogenetic Bacteria. *Iran J Biotechnol*, 14(2): 25-32.
- Duncan D. B., 1995. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, 11: 1-42.

- El-Nour, K.M.M.A., A. A. Eftaiha., A. Al-Warthan and R.A.A. Ammar, (2010), Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*, 3, 135-140.
- Gajbhiye, M., J. Kesharwani, A. Ingle., A. Gade, and M. Rai, 2009. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomedicine*, 5(4): 382-388.
- Gopinath, V. and P. Velusamy, 2013. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus* sp. GP-23 and evaluation of their antifungal activity towards *Fusarium oxysporum*. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 106: 170-174.
- Gurunathan, S., K. Kalishwaralal., R. Vaidyanathan., D. Venkataraman., S. Pandian., J. Muniyandi., N. Hariharan and S. Eom, 2009. Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 74(1): 328-363.
- Minaeian, S., A. R. Shahverdi and A. S. H. R. Shahverdi, 2008. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by some bacteria. *Scientia Iranica*, 17(66): 1631-1635.
- Nasrollahi, A., K. Pourshamsian and P. Mansourkiaee, 2011. Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi. *International Journal of Nano Dimension*, 1(3): 233-239.
- Natarajan K., j S. Selvara and V. R. Murty, 2010. Microbial production of silver nanoparticles. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5(1): 135-140.
- Nohi A. A., 2007. Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria: A novel biological approach. *Process Biochemistry*, 42: 919-923.
- Prabhu Prabhu, S. and E.K. Poulose, 2012. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, 2(1).
- Sarangadharan S. and S. Nallusamy, 2015. biosynthesis and characterization of silver nanoparticles produced by *Bacillus licheniformis*. *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences*, 4(4): 136-239.
- Verma P., 2015. A review on synthesis and their antibacterial activity of silver and selenium nanoparticles against biofilm forming *staphylococcus aureus*. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, (4)4: 652-677.
- Zhang, Z., B. Zhao and L. Hu, 1996. pvp protective mechanism of ultrafine silver powder synthesized by chemical reduction processes. *Journal of solid state chemistry*, 121(1): 105-110.

Study on biosynthesis of silver nanoparticles from intracellular solution of *Bacillus subtilis* applied in agriculture

Le Thi An Nhien, Tran Duc Trong, Le Thi Thuy Tien,
Nguyen Duc Luong, Le Quang Luan

Abstract

Silver nanoparticles (AgNPs) have been known as a safe product for the users and an effective antibacterial and antifungal material. In this study, AgNPs solution were synthesized from silver nitrate solution using the intracellular extracted from *Bacillus subtilis* as the reductant. The optimum conditions for this biosynthesis process including pH and reaction temperature were investigated. Characteristic and the average particle size of the synthesized AgNPs colloidal solution were assessed by UV-vis spectroscopy and TEM images. The obtained results indicated that AgNPs synthesized from intracellular *B. subtilis* had absorption peaks with λ_{max} from 412 to 440 nm and average particle sizes were determined from 7 to 12 nm. The *in vitro* antifungal efficiency of the AgNPs colloidal solution was also investigated using cultural medium toxicity method and the results showed that the antifungal effect against *C. cassicola* which causes corynespora leaf fall disease of the synthesized AgNPs colloidal product achieved 59.46% at the concentration of 80 ppm after 10 days of culture.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Corynespora cassicola*, intracellular solution, fungal inhibition, silver nanoparticles

Ngày nhận bài: 10/1/2018
Ngày phản biện: 17/1/2018

Người phản biện: TS. Trần Thị Lệ Minh
Ngày duyệt đăng: 12/2/2018

HIỆU QUẢ CỦA XỬ LÝ NẤM ĐỐI KHÁNG *Trichoderma* spp. VÀ KẼM ĐẾN ĐẶC TÍNH SINH TRƯỞNG, NĂNG SUẤT VÀ PHẨM CHẤT CỦA BA GIỐNG KHOAI LANG TÍM

Phạm Thị Phương Thảo¹, Lê Văn Hòa¹, Phan Hữu Nghĩa¹,
Lê Thị Hoàng Yến¹, La Thị Thùy Như², Cam Mỹ Yến²

TÓM TẮT

Đề tài được thực hiện nhằm xác định hiệu quả của việc xử lý nấm *Trichoderma* spp. kết hợp với bổ sung kẽm nồng độ từ 0 - 40 ppm qua lá vào thời điểm 35 ngày và 70 ngày sau khi trồng đến đặc tính sinh trưởng, năng suất và chất lượng ba giống khoai lang tím [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. Kết quả cho thấy giống khoai lang tím Lord và khoai lang tím Malaysia có tổng số củ, số củ thương phẩm, năng suất và hàm lượng tinh bột cao hơn so với giống khoai lang tím HL491, nhưng có hàm lượng anthocyanin thấp hơn. Xử lý nấm *Trichoderma* spp. trước khi trồng kết hợp với kẽm nồng độ 20 hoặc 40 mg/L có tổng số củ thương phẩm, năng suất và hàm lượng tinh bột cao hơn so với không bổ sung kẽm. Xử lý nấm *Trichoderma* spp. trước khi trồng kết hợp với kẽm nồng độ 20 hoặc 40 mg/L đã giúp gia tăng diện tích lá, chỉ số diệp lục tố và gia tăng năng suất thương phẩm của các giống đạt trên 30 tấn/ha, đặc biệt giống Malaysia đạt trên 60 tấn/ha.

Từ khóa: Khoai lang tím, nấm *Trichoderma* spp., kẽm, chất lượng củ, năng suất củ

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Khoai lang [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] được đánh giá là một loại cây có giá trị dinh dưỡng và giá trị kinh tế. Tại Đồng bằng sông Cửu Long, bên cạnh giống khoai lang tím Nhật HL491, một số giống khoai lang tím (KLT) như Lord và Malaysia đã cho thấy sự thích nghi với điều kiện đất đai của huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long (Phạm Thị Phương Thảo và *ctv.*, 2016). Phân bón là một trong những yếu tố quan trọng nhất để gia tăng năng suất khoai lang, ngoài việc cung cấp các loại phân đa lượng như N, P, K, thì việc bổ sung các loại phân trung và vi lượng như Ca, Mg, Si, Zn,... đã góp phần cải thiện được năng suất cây và kẽm là một trong số các nguyên tố vi lượng giúp tăng năng suất và cải thiện phẩm chất khoai tây và một số loại cây có củ (Mousavi *et al.*, 2007; Salam *et al.*, 2010; Broadley *et al.*, 2012). Bên cạnh đó, chất lượng dây giống cũng đóng vai trò quan trọng trong việc gia tăng năng suất và chất lượng củ khoai lang. Hiện nay, có hơn 10 bệnh ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và năng suất khoai lang; trong đó bệnh héo dây do nấm *Fusarium* sp. gây chết dây và hư hỏng củ (Ames *et al.*, 1996). Việc xử lý nấm đối kháng *Trichoderma* để hạn chế ảnh hưởng của nấm bệnh trên cây giống (Dương Minh và *ctv.*, 2010), được sử dụng hiệu quả trên khoai tây (Mousavi *et al.*, 2007). Ngoài ra, xử lý nấm đối kháng *Trichoderma* trên cây con giúp cải thiện khả năng hấp thu dinh dưỡng và tăng khả năng sinh trưởng của nhiều cây trồng (Hoitink *et al.*, 2006). Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu trên khoai lang vẫn chưa có nhiều công bố. Vì vậy, nghiên cứu được thực hiện

nhằm xác định hiệu quả của việc xử lý dây giống khoai lang bằng nấm đối kháng *Trichoderma* spp. và liều lượng bổ sung kẽm thích hợp đến đặc tính sinh trưởng, năng suất và chất lượng của 3 giống khoai lang tím trồng ở Bình Tân, Vĩnh Long.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Đối tượng khảo sát: Giống khoai lang tím Nhật HL491 (do Trung tâm Nghiên cứu thực nghiệm Nông nghiệp Hưng Lộc nhập nội từ Nhật Bản năm 1994), 02 giống khoai tím nhập nội vào năm 2014 có nguồn gốc từ Nhật Bản (Lord) và Malaysia (Malaysia). Các giống khoai lang tím có thời gian xuống củ khoảng 35 - 45 ngày sau khi trồng (NSKT); thời gian thu hoạch đạt năng suất trên 15 tấn/ha khoảng 140 ngày sau khi trồng (NSKT).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Đặc tính đất ruộng thí nghiệm trước khi trồng: pH: 6,32; chất hữu cơ 2,95%; 0,165% N; 0,106% P₂O₅; 0,222 meq/100 g kali trao đổi và 8,21 meq/100 g calcium trao đổi. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức khối hoàn toàn ngẫu nhiên thừa số hai nhân tố. Nhân tố (A): 3 giống khoai lang tím. Nhân tố (B): 6 mức độ kết hợp giữa có hoặc không xử lý nấm đối kháng *Trichoderma* spp. (Tricô nấm Hồng ĐHCT) với 3 liều lượng bổ sung kẽm (ZnSO₄) gồm không bổ sung (đối chứng), bổ sung kẽm với nồng độ 20 mg/L và 40 mg/L trước khi trồng. Nấm được xử lý với nồng độ 0,5% ướt đều dây giống, để qua đêm trước khi trồng. Việc xử lý bổ sung kẽm được thực

¹ Bộ môn Sinh lý Sinh hóa, Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

² Sinh viên lớp Công nghệ Rau Hoa Quả và Cảnh quan K40, Trường Đại học Cần Thơ