

LỰA CHỌN PHƯƠNG PHÁP KHỬ TRÙNG THÍCH HỢP TRONG NUÔI CẤY MÔ RONG SỤN *Kappaphycus alvarezii*

Phạm Thị Mát*, Lê Thanh Tùng, Nguyễn Thị Duyệt, Nguyễn Văn Nguyên

Viện Nghiên cứu Hải sản

*Tác giả liên hệ: ptmat.rimf@gmail.com

Ngày nhận bài: 27.08.2024

Ngày chấp nhận đăng: 27.12.2024

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm lựa chọn phương pháp khử trùng thích hợp để tạo vật liệu sạch cho nuôi cấy mô rong sụn *Kappaphycus alvarezii*. Thí nghiệm được tiến hành với 3 loại chất gồm (1) dung dịch natri hypochlorite 0,25% trong thời gian 5 giây, (2) hỗn hợp kháng sinh hãng Sigma ở nồng độ 0,5%; 1% và 1,5% trong thời gian 48 giờ, (3) dung dịch nano bạc ở các nồng độ từ 100 đến 1.000ppm trong thời gian 5 phút. Kết quả nghiên cứu cho thấy phương pháp khử trùng mẫu cấy tốt nhất là sử dụng dung dịch natri hypochlorite 0,25% trong thời gian 5 giây cho hiệu quả cao nhất với tỷ lệ mẫu sạch 86,67%, tỷ lệ mô sẹo đạt 94,44% và chất lượng mô sẹo tốt. Việc khử trùng bằng hỗn hợp kháng sinh và nano bạc đều có xu hướng chung khi nồng độ càng tăng thì tỷ lệ mẫu sạch càng cao nhưng tỷ lệ mẫu sống và tỷ lệ tạo mô sẹo lại càng giảm. Hỗn hợp kháng sinh với nồng độ 1,5% cho tỷ lệ mô sẹo đạt thấp nhất (41,11%) và đạt cao nhất (54,44%) ở nồng độ 0,5%. Với dung dịch nano bạc, nồng độ 1.000ppm cho tỷ lệ mô sẹo thấp nhất (45,56%), trong khi đó, công thức 100ppm có tỷ lệ mô sẹo cao nhất, đạt 71,11% nhưng tỷ lệ mẫu sạch thấp nhất, chỉ đạt 12,22%.

Từ khóa: *Kappaphycus alvarezii*, kháng sinh, mô sẹo, nano bạc, natri hypochlorite.

Selecting Suitable Disinfection Method for Tissue Culture of Seaweed (*Kappaphycus alvarezii*)

ABSTRACT

This study evaluated the effective method of disinfecting the sample surfaces at varying concentrations of bactericidal agents to produce axenic materials for *Kappaphycus alvarezii* micropropagation. The experiment was conducted with 3 types of bactericidal agents including (1) sodium hypochlorite solution at concentration of 0.25% for 5 seconds, (2) pure Sigma antibiotics at concentrations of 0.5%, 1% and 1.5% for 48 hours, (3) nano silver solution at concentrations from 100 to 1000 ppm for 5 minutes. The research results showed that using sodium hypochlorite solution to prevent bacterial contamination in *K. alvarezii* was the best disinfection method. The samples treated by sodium hypochlorite solution produced high rate of axenic explants (86.67%), highest rate of callus induction (94.44%) and good callus quality. For treatment of pure antibiotics and nano silver solution, when the concentration was higher, the axenic sample rate was higher but the survival rate and the callus induction rate were lower. The antibiotics with a concentration of 1.5% gave lowest callus rate (41.11%) and highest (54.44%) at a concentration of 0.5%. The concentration of nano silver solution at 1000 ppm gave the lowest callus rate (45.56%), while the 100 ppm formula had the highest callus rate (71.11%) but the lowest clean sample rate (only 12.22%).

Keywords: *Kappaphycus alvarezii*, antibiotics, callus, silver nano, natri hypochlorite.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cũng giống như thực vật bậc cao, tạo vật liệu sạch cho đầu vào nuôi cấy mô được xem là yếu tố quan trọng, quyết định sự thành công của toàn bộ quá trình nuôi cấy. Rong sụn là thực vật

thủy sinh, bởi vậy luôn bị tác động tiêu cực bởi các yếu tố môi trường nước, dịch hại và các ký sinh thân rong (tảo bám, rong ký sinh, bọt nước...). Để có thể tạo vật liệu sạch cho nghiên cứu, rong biển cần được lựa chọn, làm sạch và khử trùng một cách cẩn thận trước khi tiến

hành quá trình nuôi cấy. Hơn nữa, rong biển không có lớp bảo vệ bề mặt như ở thực vật bậc cao, dễ bị tổn thương bởi hóa chất nên việc khử trùng càng trở nên khó khăn (Polne-Fuller, 1988; Baweja & cs., 2009).

Các nghiên cứu trên thế giới đã tiến hành khử trùng mẫu thực vật nói chung và rong biển nói riêng bằng nhiều phương pháp khác nhau như xử lý với hỗn hợp kháng sinh, dung dịch nano bạc, natri hypochlorite, dung dịch thủy ngân... (Yokoya & cs., 1999; Reddy & cs., 2003; Hurtado & Biter, 2007; Kumar & cs., 2007; Hayashi & cs., 2008; Sulistiani & cs., 2012; Phạm Thị Mát & cs., 2015). Trong đó, chất khử trùng được sử dụng phổ biến là hỗn hợp kháng sinh, kháng nấm. Tuy nhiên, hiệu quả của mỗi loại chất khử trùng được các tác giả đánh giá khác nhau và sử dụng ở nồng độ khác nhau. Reddy & cs. (2003), Sulistiani & cs. (2012) đã sử dụng hỗn hợp kháng sinh với nồng độ 3% trong thời gian 48 giờ để khử trùng rong sụn *K. alvarezii* cho tỷ lệ mẫu sạch cao. Kumar & cs. (2007) đã tiến hành thí nghiệm khử trùng 4 chủng rong sụn bằng hỗn hợp kháng sinh ở các nồng độ 2, 3, 4, 5% trong thời gian 24, 48, 72, 96 giờ cho thấy xử lý kháng sinh 3-5% trong 48-72 giờ cho hiệu quả cao. Trong khi đó, nghiên cứu của Viện Nghiên cứu Hải sản cho thấy nồng độ và thời gian xử lý bằng hỗn hợp kháng sinh càng cao, cho tỷ lệ mẫu sạch càng cao nhưng tỷ lệ sống và tỷ lệ tạo mô sẹo càng thấp. Việc xử lý với hỗn hợp kháng sinh nồng độ 4,5% trong thời gian 48 giờ cho tỷ lệ mô sẹo đạt thấp nhất (6,67%) và đạt cao nhất (46,67%) ở nồng độ 1,5%, thời gian 12 giờ. Kết quả nghiên cứu cho thấy công thức tốt nhất là dung dịch natri hypochlorite nồng độ 0,25% với thời gian 5 giây cho hiệu quả ưu việt hơn cả kháng sinh. Tuy cho tỷ lệ mẫu sạch tuy không cao bằng kháng sinh, vẫn còn hiện tượng nhiễm khuẩn nhưng dung dịch natri hypochlorite cho tỷ lệ tạo mô sẹo đạt trên 80% với chất lượng mô sẹo cao (Phạm Thị Mát & cs., 2015). Trong giai đoạn gần đây, dung dịch nano bạc được sử dụng rộng rãi trong việc khử trùng thực vật và rong biển bởi đặc tính kháng khuẩn, kháng nấm, kháng vi rút hiệu quả (Mo & cs., 2020). Nano bạc có diện tích bề

mặt lớn hơn kim loại bạc hàng triệu lần, nhờ đó giúp gia tăng tiếp xúc với tác nhân tạp nhiễm và có khả năng ức chế, phá hủy tế bào tức thì. Nghiên cứu của Mo & cs. (2020) đã cho thấy hiệu quả khử trùng của nano bạc ở nồng độ 500ppm trên đối tượng rong *Kappaphycus striatus* với tỷ lệ mẫu sạch đạt 100%, tỷ lệ mẫu sống cao (80%) và tỷ lệ mô sẹo đạt 54,4%.

Vì vậy, nhằm xác định phương pháp khử trùng thích hợp nhất cho nuôi cấy mô rong sụn Việt Nam, nghiên cứu này được tiến hành thực hiện trên 3 loại chất khử trùng phổ biến bao gồm hỗn hợp kháng sinh, dung dịch nano bạc và natri hypochlorite ở các nồng độ khác nhau để đánh giá so sánh.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu rong sụn *K. alvarezii* được thu thập vào tháng 2/2021 từ vịnh Cam Ranh, Khánh Hòa và chuyển về phòng Nghiên cứu Công nghệ Sinh học Biển, Viện Nghiên cứu Hải sản. Rong được nuôi thích nghi trong môi trường nước biển, độ mặn $30 \pm 1\text{‰}$, có bổ sung dinh dưỡng nitơ, phospho (NH_4Cl và KH_2PO_4) ở điều kiện phòng thí nghiệm dưới ánh sáng đèn huỳnh quang $35 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, chu kỳ sáng tối L:D = 12:12, nhiệt độ $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sục khí liên tục.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Bố trí thí nghiệm

Việc nghiên cứu lựa chọn phương pháp tạo vật liệu sạch dựa trên cơ sở bố trí thí nghiệm so sánh hiệu quả của ba phương pháp khử trùng bằng dung dịch natri hypochloride, hỗn hợp kháng sinh (nguyên chất hãng Sigma) và nano bạc ở các nồng độ khác nhau. Công thức đối chứng không sử dụng chất khử trùng. Khử trùng bằng hỗn hợp kháng sinh được thực hiện dựa trên phương pháp của Reddy & cs. (2003): Mẫu rong được cắt thành các đoạn 5cm, rửa với chất tẩy rửa (Lô hội - Hàn Quốc) ở nồng độ 0,5% trong 10 phút và ngâm trong dung dịch provine iodine (HD Pharma) 2% (0,5% w/v) 3 phút. Sau đó, mẫu rong được xử lý với hỗn hợp kháng sinh, sử dụng 3 nồng độ 0,5%; 1,0% và 1,5% trong

thời gian 24 giờ. Hỗn hợp kháng sinh gồm Penicillin 1,0g; Streptomycin sulphate 2,0g; Kanamycin 1,0g; Nystatin 25mg và Neomycin 200mg pha trong 100ml nước cất.

Đối với công thức khử trùng bằng natri hypochlorite, các bước được tiến hành dựa trên kết quả nghiên cứu lựa chọn tốt nhất của Phạm Thị Mát (2017). Mẫu rong cũng được xử lý với chất tẩy rửa và dung dịch provine iodine như trên sau đó khử trùng bằng natri hypochloride nồng độ 0,25% trong thời gian 5 giây.

Đối với công thức khử trùng bằng nano bạc (Sigma), thí nghiệm được bố trí dựa trên nghiên cứu của Mo & cs. (2020). Cụ thể: mẫu rong được cắt thành các đoạn 5cm và rửa trong chất tẩy rửa 1% với thời gian 10 phút. Sau đó, mẫu rong được xử lý với dung dịch nano bạc trong thời gian 5 phút với các nồng độ từ 100ppm đến 1.000ppm, bước nhảy là 100ppm.

Sau giai đoạn khử trùng vật liệu, mẫu rong được cấy trên môi trường thạch (1,5%) có bổ sung PES (2%), nuôi trong điều kiện nhiệt độ $25 \pm 1^\circ\text{C}$, ánh sáng huỳnh quang $5\mu\text{mol photon m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, chu kỳ sáng tối L:D = 12:12. Thí nghiệm được bố trí một cách ngẫu nhiên, mỗi công thức 30 mẫu với 3 lần lặp lại. Theo dõi mẫu 5 ngày một lần trong thời gian 60 ngày với các chỉ tiêu gồm tỷ lệ sống, tỷ lệ mẫu sạch, tỷ lệ hình thành và chất lượng mô sẹo. Mẫu sạch là mẫu không bị tạp nhiễm vi sinh vật và thực vật biểu sinh. Chất lượng mô sẹo được phân thành 3 loại dựa trên nghiên cứu của Sulistiani & cs. (2012) và chỉnh sửa theo Phạm Thị Mát (2017). Mô sẹo loại 1 là loại tốt nhất, mô sẹo hình thành dày, kín bề mặt cắt hoặc toàn bộ mẫu cấy. Mô sẹo loại 2 có chất lượng trung bình, hình thành hơn một nửa bề mặt cắt. Mô sẹo loại 3 có chất lượng thấp nhất, hình thành dưới một nửa bề mặt cắt.

2.2.2. Xử lý số liệu

Thí nghiệm gồm 15 công thức, mỗi công thức có 30 mẫu, 3 lần lặp lại. Số liệu được xử lý trên Microsoft Excel 2010 và phần mềm IBM SPSS Statistics 20 với phân tích ANOVA, LSD, Tukey.

Tỷ lệ mẫu sống được tính bằng tỷ số giữa tổng mẫu sống trên tổng mẫu cấy. Tỷ lệ mẫu sạch được tính bằng tỷ số giữa tổng mẫu sống vô trùng trên tổng mẫu cấy. Tỷ lệ tạo mô sẹo được

tính bằng tỷ số giữa mẫu hình thành mô sẹo trên tổng mẫu cấy.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện khử trùng đến tỷ lệ sống, tỷ lệ mẫu sạch và tỷ lệ tạo mô sẹo

- Kết quả nghiên cứu xác định phương pháp khử trùng giống rong gốc nguyên liệu làm mô sẹo được trình bày trong bảng 1.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, phương pháp khử trùng có ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ mẫu sống, tỷ lệ mẫu sạch và tỷ lệ tạo mô sẹo.

Tỷ lệ sống: Khử trùng bằng dung dịch natri hypochlorite cũng như bằng kháng sinh nguyên chất cho tỷ lệ mẫu sống cao, trong đó khử trùng bằng dung dịch natri hypochlorite ở nồng độ 0,25% cho tỷ lệ sống cao nhất đạt 100%. Ở các nồng độ kháng sinh khác nhau từ 0,5 đến 1,5% đều cho tỷ lệ sống đạt trên 96% và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Mặt khác, khử trùng bằng nano bạc cho tỷ lệ mẫu sống khác biệt rõ rệt theo dãy nồng độ. Tỷ lệ mẫu sống tỷ lệ nghịch với nồng độ nano bạc. Nồng độ nano bạc xử lý càng cao, tỷ lệ mẫu sống càng giảm. Tỷ lệ mẫu sống đạt cao nhất là 98,89% khi xử lý ở nồng độ nano bạc 100ppm. Ngược lại, ở công thức sử dụng nano bạc 1.000ppm, tỷ lệ sống thấp nhất, giảm đáng kể và chỉ còn đạt 58,89%. Nhìn chung, ở các nghiệm thức khác nhau, tỷ lệ sống của mẫu cấy rong sụn là tương đối cao và không khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các phương thức khử trùng mẫu. Tuy nhiên, điểm khác biệt đến từ công thức thí nghiệm với hàm lượng nano bạc $> 400\text{ppm}$ trở lên làm suy giảm sức sống của mẫu cấy và giảm tỷ lệ sống của mẫu.

Trong 60 ngày nuôi cấy, tỷ lệ sống của mẫu rong ở các công thức thí nghiệm có sự biến động rõ rệt theo thời gian. Tỷ lệ mẫu sống có xu hướng giảm mạnh trong thời gian 35 ngày đầu theo dõi, sau đó không đổi hoặc giảm không đáng kể. Khử trùng bằng nano bạc với nồng độ càng cao, tỷ lệ mẫu sống giảm càng nhanh. Trừ công thức đối chứng và công thức sử dụng natri hypochlorite, toàn bộ mẫu đều sống trong suốt quá trình nuôi cấy.

Bảng 1. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của loại và nồng độ chất khử trùng vật liệu rong sụn
(Số liệu trình bày là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn SD)

Chất khử trùng	Nồng độ	Tỷ lệ sống	Tỷ lệ mẫu sạch	Tỷ lệ tạo mô sẹo
Đối chứng	-	100,00 ^a $\pm$ 0	0	66,67 ^{bc} $\pm$ 1,92
Natri hypochlorite	0,25	100,00 ^a $\pm$ 0	86,67 ^a $\pm$ 3,33	94,44 ^a $\pm$ 1,92
Kháng sinh (%)	0,5	98,89 ^a $\pm$ 1,92	43,33 ^f $\pm$ 3,33	54,44 ^d $\pm$ 3,85
	1,0	97,78 ^a $\pm$ 1,92	54,44 ^e $\pm$ 1,92	46,67 ^c $\pm$ 3,33
	1,5	96,67 ^a $\pm$ 3,33	70,00 ^c $\pm$ 3,33	41,11 ^c $\pm$ 3,85
Nano bạc (ppm)	100	98,89 ^a $\pm$ 1,92	12,22 ⁱ $\pm$ 1,92	71,11 ^b $\pm$ 1,92
	200	97,78 ^a $\pm$ 1,92	20,00 ^h $\pm$ 1,92	67,78 ^{bc} $\pm$ 1,92
	300	95,56 ^a $\pm$ 1,92	36,67 ^g $\pm$ 3,85	64,44 ^c $\pm$ 1,92
	400	91,11 ^b $\pm$ 1,92	50,00 ^e $\pm$ 1,92	62,22 ^c $\pm$ 1,92
	500	87,78 ^{bc} $\pm$ 1,92	73,33 ^{bc} $\pm$ 3,33	58,89 ^{cd} $\pm$ 3,33
	600	83,33 ^c $\pm$ 3,33 ^c	76,67 ^b $\pm$ 1,92	55,56 ^d $\pm$ 1,92
	700	77,78 ^{cd} $\pm$ 1,92 ^{cd}	75,56 ^b $\pm$ 1,92	52,22 ^{de} $\pm$ 3,85
	800	73,33 ^d $\pm$ 3,33 ^d	70,00 ^c $\pm$ 1,92	50,00 ^{de} $\pm$ 3,33
	900	65,56 ^e $\pm$ 1,92 ^e	63,33 ^d $\pm$ 1,92	47,78 ^e $\pm$ 1,92
	1.000	58,89 ^e $\pm$ 1,92 ^e	56,67 ^e $\pm$ 3,33	45,56 ^e $\pm$ 1,92

Tỷ lệ mẫu sạch: Tỷ lệ mẫu sạch tỷ lệ thuận với nồng độ chất khử trùng, cả về kháng sinh lẫn công thức nano bạc. Nồng độ nano bạc càng tăng thì mẫu càng ít bị nhiễm. Ở công thức xử lý bằng nano bạc với nồng độ 100ppm, tỷ lệ mẫu sạch đạt thấp nhất là 12,22%. Khi xử lý với nồng độ nano bạc từ 500 ppm đến 700ppm, tỷ lệ mẫu sạch cao, đạt trên 70% và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Tỷ lệ mẫu sạch tăng khi xử lý bằng nano bạc với nồng độ tăng từ 100ppm đến 400ppm, ngược lại ở ngưỡng nồng độ từ 700ppm trở lên, tỷ lệ mẫu sạch giảm. Điều này có thể giải thích là do nồng độ nano bạc càng cao cho hiệu quả diệt khuẩn càng cao nhưng đồng thời tác động đến mẫu cấy càng lớn dẫn đến tỷ lệ sống giảm đi kéo theo tỷ lệ mẫu sạch cũng bị giảm theo. Tương tự như công thức khử trùng bằng nano bạc, tỷ lệ nhiễm cũng giảm khi nồng độ hỗn hợp kháng sinh tăng. Tỷ lệ mẫu sạch tăng từ 43,33% lên 70% khi nồng độ hỗn hợp kháng sinh sử dụng tăng từ 0,5% lên 1,5%. Công thức xử lý bằng dung dịch natri hypochlorite cho tỷ lệ mẫu sạch cao nhất, đạt 86,67%, cao hơn so với cả ba công thức

sử dụng hỗn hợp kháng sinh và các công thức sử dụng nano bạc.

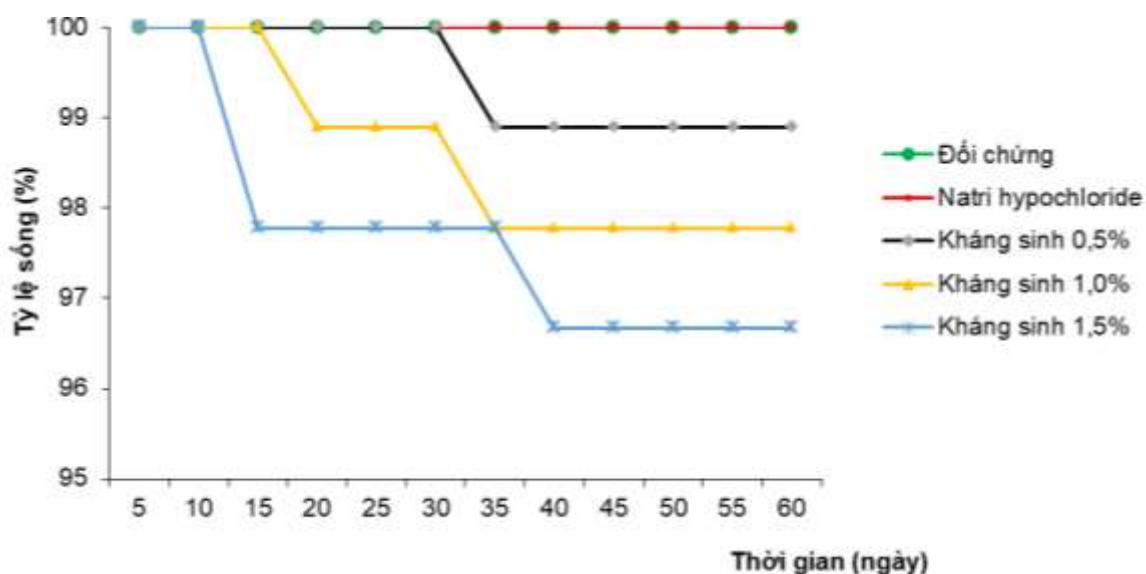
Trong 60 ngày nuôi cấy, tỷ lệ mẫu sạch ở các công thức thí nghiệm cũng có sự biến động rõ rệt theo thời gian. Tương tự về tỷ lệ sống, tỷ lệ mẫu sạch có xu hướng giảm mạnh trong thời gian 30 ngày đầu theo dõi, sau đó giảm không đáng kể. Tuy nhiên, khử trùng bằng nano bạc với nồng độ càng cao, tỷ lệ mẫu sạch giảm càng ít, ngược lại, nồng độ nano bạc càng thấp, tỷ lệ mẫu sạch giảm càng nhanh. Xu hướng này tương tự khi khử trùng bằng hỗn hợp kháng sinh.

Tỷ lệ tạo mô sẹo: Sử dụng các chất khử trùng khác nhau cho hiệu quả rõ rệt trong việc cảm ứng tạo mô sẹo. Tỷ lệ mô sẹo cao nhất đạt 94,44% khi xử lý mẫu bằng dung dịch natri hypochlorite 0,25% (lô đối chứng). Trong khi đó, sử dụng hỗn hợp kháng sinh và nano bạc ở các nồng độ khác nhau cho tỷ lệ mô sẹo dao động từ 40% đến 70%. Ở cả hai loại chất khử trùng này, tỷ lệ cảm ứng mô sẹo đều có xu hướng giảm khi nồng độ tăng. Tỷ lệ mô sẹo cũng có sự khác biệt rõ rệt giữa các công thức với chất khử trùng, nồng độ khác nhau. Việc xử

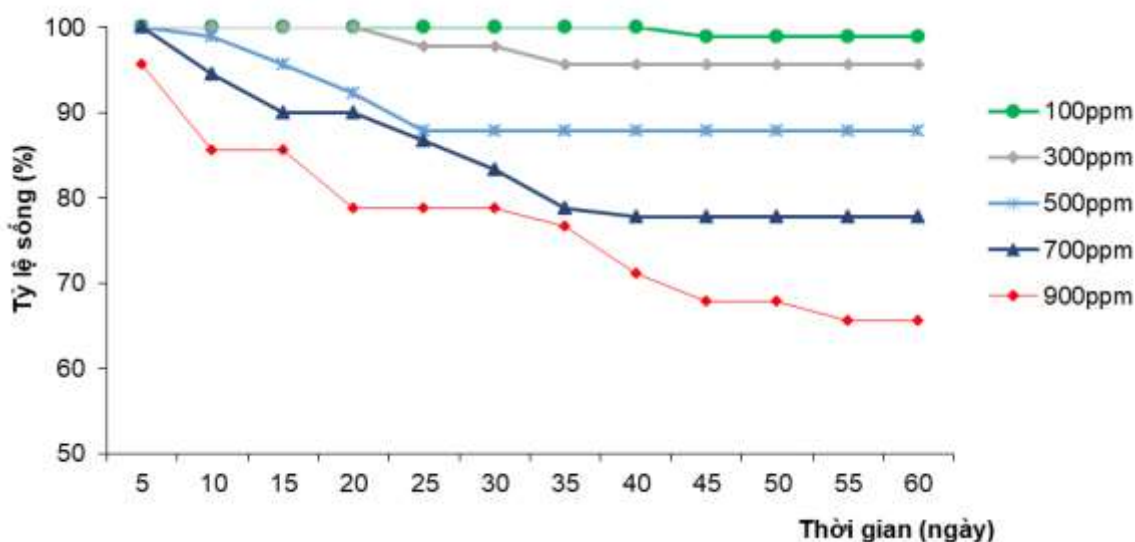
lý với hỗn hợp kháng sinh nồng độ 1,5% cho tỷ lệ mô sẹo đạt thấp nhất (41,11%) và đạt cao nhất (54,44%) ở nồng độ 0,5%. Với dung dịch nano bạc, nồng độ 1.000ppm cho tỷ lệ mô sẹo thấp nhất (45,56%). Trong khi đó, công thức 100ppm có tỷ lệ mô sẹo cao nhất, đạt 71,11%.

Trong 60 ngày nuôi cấy, tỷ lệ tạo mô sẹo ở các công thức thí nghiệm cũng có sự biến động rõ rệt theo thời gian. Tỷ lệ tạo mô sẹo có xu

hướng tăng nhanh trong thời gian 30 ngày đầu theo dõi, sau đó tăng không đáng kể. Ở công thức khử trùng bằng dung dịch natri hypochlorite, mẫu rong có khả năng tạo mô sẹo nhanh, ở ngày thứ 10 tỷ lệ mô sẹo đã đạt 86,67% và đạt cao nhất ở ngày thứ 20 (94,44%). Khử trùng bằng nano bạc cho tỷ lệ mô sẹo cao nhất vào khoảng thời gian 40-45 ngày nuôi cấy, đạt từ 45,56 đến 71,11%.



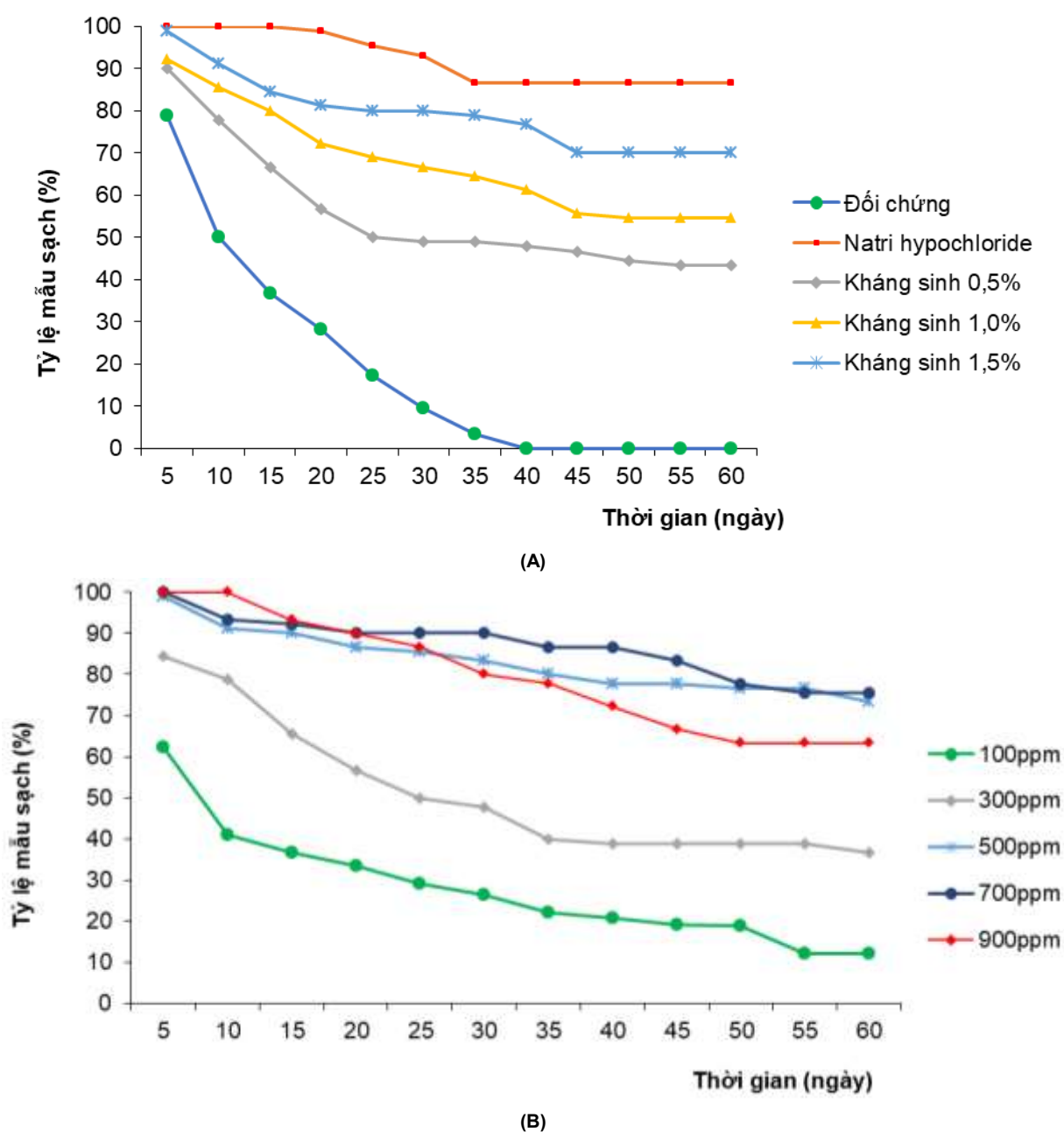
(A)



(B)

Ghi chú: (A): Công thức đối chứng và công thức khử trùng bằng natri hypochlorite, kháng sinh; (B): Công thức khử trùng bằng nano bạc.

Hình 1. Tỷ lệ sống của mẫu rong trong thời gian 60 ngày nuôi cấy



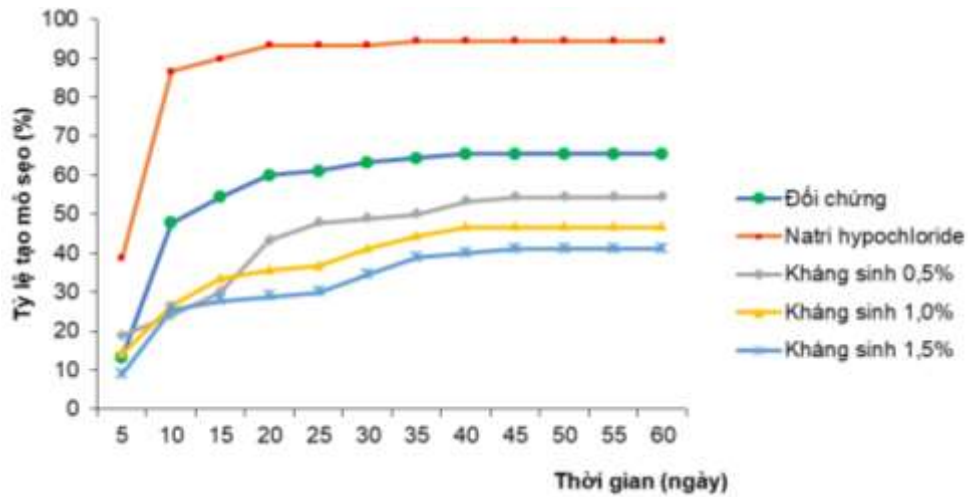
Ghi chú: (A): Công thức đối chứng và công thức khử trùng bằng natri hypochlorite, kháng sinh; (B): Công thức khử trùng bằng nano bạc.

Hình 2. Tỷ lệ mẫu sạch trong thời gian 60 ngày nuôi cấy

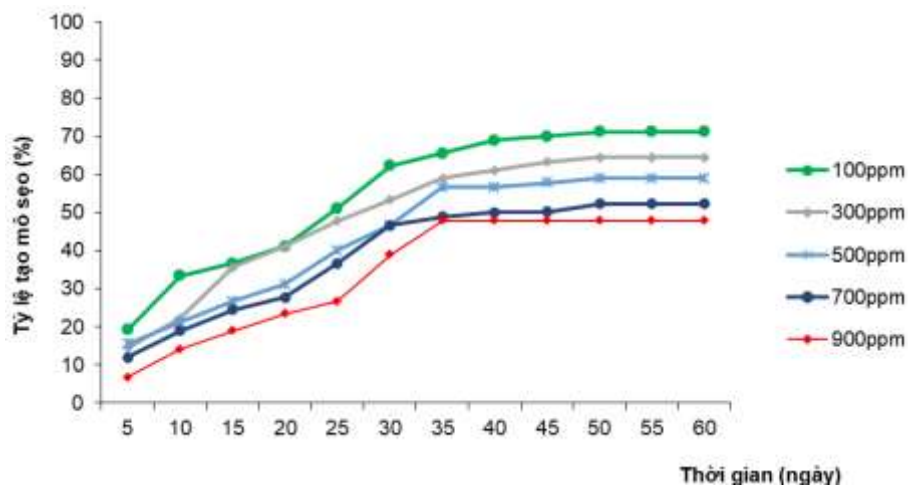
3.2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện khử trùng đến chất lượng mô sẹo

Chất lượng mô sẹo có sự khác biệt rõ rệt giữa các công thức thí nghiệm (Bảng 2). Trong đó, khử trùng bằng dung dịch natri hypochlorite và nano bạc (400-600ppm) cho chất lượng mô

sẹo tốt, tỷ lệ mô sẹo loại 1 đạt trên 50%. Khử trùng bằng kháng sinh cho chất lượng mô sẹo thấp hơn, chủ yếu là mô sẹo loại 2, tỷ lệ mô sẹo loại 1 chỉ đạt 28-32%. Công thức khử trùng bằng nano bạc ở nồng độ càng cao (trên 700ppm) thì chất lượng mô sẹo càng giảm, tỷ lệ mô sẹo loại 3 chiếm cao nhất (65,93%).



(A)



(B)

Ghi chú: (A): Công thức đối chứng và công thức khử trùng bằng natri hypochlorite, kháng sinh; (B): Công thức khử trùng bằng nano bạc.

Hình 3. Tỷ lệ tạo mô sẹo của mẫu rong trong thời gian 60 ngày nuôi cấy



(A)



(B)

Ghi chú: (A): Mô sẹo sợi ở hai đầu mặt cắt, (B): Mô sẹo sợi ở toàn bộ bề mặt.

Hình 4. Mô sẹo loại 1 trong nuôi cấy mô rong sụn (sau 60 ngày nuôi cấy)

Bảng 2. Kết quả chất lượng mô sẹo ở các công thức khử trùng
(Số liệu trình bày là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn SD (n = 3))

Chất khử trùng	Nồng độ	Chất lượng mô sẹo		
		Loại 1	Loại 2	Loại 3
Đối chứng	0	9,33 ^{ef} $\pm$ 1,26	23,14 ^c $\pm$ 2,48	67,53 ^e $\pm$ 6,33
Natri hypochlorite	0,25%	56,53 ^a $\pm$ 4,53	32,92 ^a $\pm$ 1,35	10,55 ^a $\pm$ 3,33
Kháng sinh	0,5%	28,24 ^b $\pm$ 2,47	42,75 ^b $\pm$ 3,78	29,02 ^b $\pm$ 9,51
	1%	33,27 ^c $\pm$ 1,54	40,46 ^b $\pm$ 1,3	26,26 ^b $\pm$ 8,33
	1,5%	27,04 ^b $\pm$ 7,14	37,30 ^{ab} $\pm$ 9,49	35,66 ^c $\pm$ 7,57
Nano bạc	100 ppm	45,31 ^d $\pm$ 2,51	23,52 ^c $\pm$ 5,2	31,17 ^{bc} $\pm$ 6,55
	200 ppm	42,62 ^d $\pm$ 5,48	27,86 ^c $\pm$ 2,58	29,52 ^b $\pm$ 0,82
	300 ppm	48,25 ^d $\pm$ 5,43	30,96 ^{ac} $\pm$ 4,37	20,79 ^c $\pm$ 5,66
	400 ppm	57,12 ^a $\pm$ 4,66	32,16 ^{ac} $\pm$ 5,36	10,72 ^a $\pm$ 1,53
	500 ppm	56,64 ^a $\pm$ 5,05	26,36 ^{ac} $\pm$ 6,07	16,99 ^d $\pm$ 1,13
	600 ppm	52,08 ^{ad} $\pm$ 4,66	22,06 ^{ac} $\pm$ 9,18	25,86 ^{bc} $\pm$ 8,51
	700 ppm	44,58 ^d $\pm$ 5,05	25,69 ^{ac} $\pm$ 7,32	29,72 ^b $\pm$ 6,79
	800 ppm	24,37 ^b $\pm$ 2,68	33,57 ^{ac} $\pm$ 7,73	42,06 ^d $\pm$ 8,36
	900 ppm	16,35 ^e $\pm$ 4,42	18,73 ^d $\pm$ 8,54	64,92 ^e $\pm$ 12,96
	1000 ppm	14,47 ^e $\pm$ 6,87	19,60 ^d $\pm$ 4,67	65,93 ^e $\pm$ 7,69

Như vậy, từ sự so sánh, phân tích trên cho thấy, công thức khử trùng tốt nhất là dung dịch natri hypochlorite 0,25% trong thời gian 5 giây với tỷ lệ sống đạt 100%, tỷ lệ mẫu sạch 86,67%, tỷ lệ mô sẹo đạt 94,44% và mô sẹo loại tốt 56,53%.

4. THẢO LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ nano bạc càng tăng thì tỷ lệ mẫu sạch càng cao, tuy nhiên tỷ lệ mẫu sống và tỷ lệ cảm ứng tạo mô sẹo càng giảm. Với dung dịch nano bạc, nồng độ 1.000ppm cho tỷ lệ mô sẹo thấp nhất (45,56%), trong khi đó, công thức 100ppm có tỷ lệ mô sẹo cao nhất, đạt 71,11% nhưng tỷ lệ mẫu sạch thấp nhất, chỉ đạt 12,22%. Công thức sử dụng nano bạc tốt nhất là nồng độ 500ppm cho tỷ lệ mẫu sống là 87,78%, tỷ lệ mẫu sạch đạt 73,33% và tỷ lệ tạo mô sẹo là 58,89%. Khử trùng với nano bạc ở nồng độ 400-600ppm cho kết quả tạo mô sẹo loại 1 nhiều hơn so với ở các nồng độ 100-300ppm và 700-1.000ppm. Điều này có thể được giải thích là nồng độ nano bạc thấp (100-300ppm) cho tỷ lệ mẫu sạch thấp, rong bị nhiễm vi khuẩn nhiều nên ảnh hưởng tới sức

sống và khả năng tạo mô sẹo. Ngược lại, khử trùng với nồng độ nano bạc cao (700-1.000ppm) cho tỷ lệ mẫu sạch cao nhưng rong bị tác động mạnh hơn dẫn đến sức sống kém hơn kéo theo tỷ lệ sống và chất lượng mô sẹo cũng kém hơn.

Kết quả nghiên cứu cũng tương tự kết quả báo cáo của Mo & cs. (2020) trên đối tượng rong bắp sù *Kappaphycus striatus* khử trùng bằng nano bạc. Xử lý bằng nano bạc ở khoảng nồng độ 500-1.000ppm giúp loại bỏ 100% nhiễm vi khuẩn, trong khi phương pháp xử lý ở khoảng nồng độ 100-400ppm không hiệu quả với tỷ lệ nhiễm chiếm 50,0-93,3%. Tuy nhiên, ở khoảng nồng độ thấp, tỷ lệ mẫu sống cao đạt 80,0-98,9% và duy trì màu sắc tự nhiên. Ngược lại, ở nồng độ cao (1.000ppm), mẫu rong có tỷ lệ sống thấp (70%) và dễ bị chết trắng. Việc xử lý ở nồng độ 500ppm cho kết quả tối ưu với tỷ lệ mẫu sống đạt 80%, tỷ lệ mẫu sạch 100% và tỷ lệ hình thành mô sẹo đạt cao nhất 54,4%. Nano bạc được chứng minh là có tỷ lệ loại bỏ vi sinh vật cao vì có khả năng xâm nhập nhanh chóng vào tế bào, tiêu diệt vi sinh vật gây bệnh rong biển bằng cách can thiệp vào quá trình sao chép DNA của vi khuẩn (Lansdown, 2006; Navarro & cs., 2008; Nasser & Sepideh, 2013).

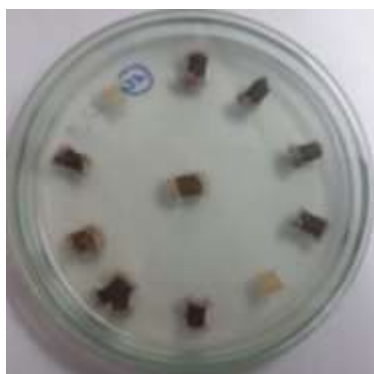
Tương tự như phương pháp khử trùng bằng dung dịch Natri hypochlorite, phương pháp khử trùng bằng nano bạc cũng cho hiệu quả về mặt thời gian, trong khi khử trùng bằng kháng sinh cần ít nhất 1-3 ngày (Reddy & cs., 2003) và thậm chí có thể kéo dài tới 7 ngày (Baweja & cs., 2009).

Kết quả thí nghiệm chỉ ra rằng hỗn hợp kháng sinh nồng độ thấp (0,5-1,5%) không có hiệu quả cao trong tạo vật liệu sạch, hiệu quả chỉ đạt 43,33% đến 70% mẫu sạch. Rất nhiều nghiên cứu sử dụng hỗn hợp kháng sinh để khử trùng rong đã được báo cáo trên thế giới với kết quả tương tự. Tỷ lệ này trong nghiên cứu của Sulistiani & cs. (2012) đạt 64,5% mẫu sạch. Trong nghiên cứu của Phạm Thị Mát & cs. (2015), cũng sử dụng hỗn hợp kháng sinh này với nồng độ càng cao trong thời gian càng dài, tỷ lệ mẫu sạch càng cao nhưng tỷ lệ mô sẹo càng thấp. Rong được xử lý kháng sinh 4,5% trong 48

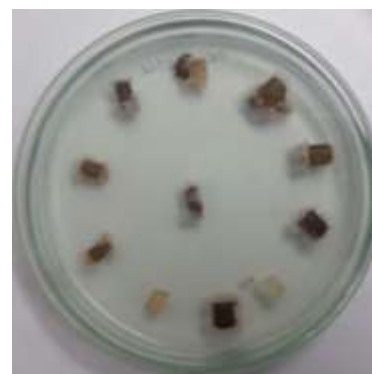
giờ cho hiệu quả tạo mẫu sạch cao nhất (trên 95,83%), trái lại tỷ lệ mô sẹo tạo thành thấp, chỉ đạt 20,83%. Với nồng độ kháng sinh thấp (1,5%) ở cả 3 mức thời gian (12, 24, 48 giờ) đều cho tỷ lệ mẫu sạch thấp, thấp nhất chỉ đạt 29,17%. Tuy nhiên, Vũ Thị Mơ & Reddy (2016) đã tiến hành khử trùng rong sụn *K. alvarezii* bằng 0,5-1% hỗn hợp kháng sinh trong thời gian 24 giờ lại thu được 95-98% mẫu vô khuẩn. Reddy & cs. (2003) lại sử dụng nồng độ cao hơn (2%) trong thời gian 3 ngày, kết quả thu được 90 -95% mẫu sạch và trên 80% mẫu cảm ứng hình thành mô sẹo. Theo nghiên cứu của Kumar & cs. (2007) tiến hành thí nghiệm khử trùng trên 4 chủng rong bằng hỗn hợp kháng sinh cho thấy việc xử lý kháng sinh 3-5% trong 48-72 giờ cho tỷ lệ mẫu sạch cao, đạt 60% đối với *Gracilaria corticata*, *Sargassum tenerrimum*, *Turbinaria conoides* và 10% đối với *Hypnea musciformis*.



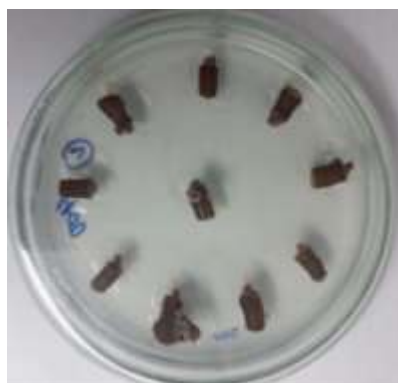
(1)



(2)



(3)



(4)



(5)



(6)

Chú thích: (1): Natri hypochlorite 0,25% - 5 giây; (2): Kháng sinh 1% - 24 giờ; (3): Nano bạc 200ppm; (4): Kháng sinh 0,5% - 24 giờ; (5): Nano bạc 100ppm; (6): Nano bạc 400ppm.

Hình 5. Mẫu cấy ở một số công thức khử trùng khác nhau

Sử dụng nồng độ kháng sinh cao (5%) trong thời gian dài (72-96 giờ) dẫn đến mẫu bị hỏng bề mặt và chết dần trong quá trình nuôi.

Tuy chưa có nhiều nghiên cứu xử lý mẫu rong với natri hypochlorite nhưng các báo cáo cũng cho thấy hiệu quả khử trùng của nó. Theo Liu & Gordon (1987) và Bradley & cs. (1988) lại nhấn mạnh rằng chất khử trùng này không phù hợp với rong do có thể sẽ gây chết mẫu. Tuy nhiên, cũng như kết quả nghiên cứu thực tiễn từ đề tài, một số nghiên cứu đã cho thấy vai trò của natri hypochlorite trong khử trùng vật liệu rong biển. Theo nghiên cứu của Liu & Bernard (1992), xử lý với natri hypochlorite 1% hoặc 2% trong 15 phút trên *Laminaria digitata* và 10 phút trên rong đỏ đã làm giảm lượng lớn vi khuẩn. Nghiên cứu của Yokoya & Handro (2002) và Yokoya & cs. (2004) cũng cho thấy hiệu quả khử trùng hiệu quả *Solieria filiformis*, *Gracilaria tenuistipitata* và *Gracilaria perplexa* bằng Natri hypochlorite nồng độ 0,5% trong thời gian 10 giây. Mặc dù có hiệu quả trong tạo vật liệu sạch không cao như khử trùng bằng kháng sinh nhưng khử trùng bằng natri hypochlorite ít tác động đến sức sống của mẫu và cho tỷ lệ hình thành mô sẹo cao. Trong khi đó, việc sử dụng kháng sinh cho tỷ lệ mẫu sạch cao hơn nhưng rong có thể bị nhạt màu và khả năng cảm ứng mô sẹo kém hơn. Điều này có thể là do kháng sinh ức chế sự tổng hợp DNA, RNA và các hệ thống khác của tế bào, do đó không những tiêu diệt vi khuẩn mà còn tác động tiêu cực đến mẫu cấy (Liu & Bernard, 1992). Hơn nữa, rong biển không có lớp bảo vệ bề mặt nên các mô tế bào dễ bị tổn thương bởi hóa chất khử trùng (Polne- Fuller, 1988; Baweja & cs., 2009).

5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Việc khử trùng bằng hỗn hợp kháng sinh và nano bạc đều có xu hướng chung khi nồng độ càng tăng thì tỷ lệ mẫu sạch càng cao nhưng tỷ lệ mẫu sống và tỷ lệ tạo mô sẹo càng giảm. Hỗn hợp kháng sinh với nồng độ 1,5% cho tỷ lệ mô sẹo đạt thấp nhất (41,11%) và đạt cao nhất (54,44%) ở nồng độ 0,5%. Với dung dịch nano bạc, nồng độ 1.000ppm cho tỷ lệ mô sẹo thấp nhất (45,56%), trong khi đó, công thức 100ppm có tỷ lệ mô sẹo cao

nhất, đạt 71,11% nhưng tỷ lệ mẫu sạch thấp nhất, chỉ đạt 12,22%. Công thức sử dụng nano bạc tốt nhất là nồng độ 500 ppm cho tỷ lệ mẫu sống là 87,78%, tỷ lệ mẫu sạch đạt 73,33% và tỷ lệ tạo mô sẹo là 58,89%.

Phương pháp khử trùng thích hợp nhất trong nuôi cấy mô rong sụn *K. alvarezii* là sử dụng dung dịch natri hypochlorite 0,25% trong thời gian 5 giây cho tỷ lệ mẫu sạch 86,67%, tỷ lệ mô sẹo cao đạt 94,44% và chất lượng mô sẹo tốt đạt 56,53%. Phương pháp khử trùng này không những cho hiệu quả cao mà còn tiết kiệm thời gian và chi phí, vì vậy có thể nghiên cứu áp dụng trên các đối tượng rong tương tự khác.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này thuộc đề tài “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ cao trong sản xuất giống và công nghệ trồng rong nhằm nâng cao năng suất và chất lượng carrageenan tại miền Trung” của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baweja P., Sahoo D., García-Jiménez P. & Robaina R.R. (2009). Review: Seaweed tissue culture as applied to biotechnology: Problems, achievements and prospects. *Phycological Research*. 57(1): 45-58.
- Bradley P.M., Cheney D.P. & Saga N. (1988). One step antibiotic disk method for obtaining axenic culture of multicellular marine algae. *Plant Cell, Tissue and Organic Culture*. 12: 55-60.
- Hayashi L., Yokoya S., Kikuchi D.M. & Oliveira E.C. (2008). Callus induction and micropropagation improved by colchicine and phytohormones in *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae). *Journal of Applied Phycology*. 20: 653-659.
- Hurtado A.Q. & Biter A.B. (2007). Plantlet regeneration of *Kappaphycus alvarezii* var. adik-adik by tissue culture. *Journal of Applied Phycology*. 19: 783-786.
- Kumar G.R., Reddy C.R.K. & Jha B. (2007). Callus induction and thallus regeneration from callus of phycocolloid yielding seaweeds from the Indian coast. *Journal of Applied Phycology*. 19: 15-25.
- Liu X. & Bernard (1992). Explant axenisation for tissue culture in marine macroalgae. *Journal Oceanology and Limnology*. pp. 268-275.
- Liu X. & Gordon M.E. (1987). Tissue and cell culture of New Zealand *Pterocladia* and *Porphyra* species. *Hydrobiologia*. 151-152(1): 147-154.

- Nasser M. & Sepideh Z.V.S.K. (2013). Plant in vitro culture goes nano: nanosilver-mediated decontamination of *ex vitro* explants. *Journal Nanomedicine Nanotechnology*. 4: 161-164.
- Navarro E.A.B., Behra R. & Hartman N.B. (2008). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nano particles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*. 17: 372-386.
- Lansdown A.B.G. (2006). Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Current Problem Dermatology*. 33: 17-34.
- Phạm Thị Mát, Đào Duy Thu & Nguyễn Văn Nguyên (2015). Nghiên cứu tìm hiểu phương pháp tạo vật liệu sạch phục vụ nuôi cấy mô rong sụn *Kappaphycus alvarezii*, Doty. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. 12: 103-111.
- Phạm Thị Mát (2017). Nghiên cứu tái sinh in vitro rong sụn *Kappaphycus alvarezii* từ mô sẹo. Luận văn thạc sĩ Công nghệ sinh học. Học viện Nông nghiệp Việt Nam.
- Polne-Fuller M. (1988). The past, present and future of tissue culture and biotechnology of seaweeds. *Algal Biotechnology*. pp. 7-31.
- Reddy C.R.K., Kumar G.R.K., Siddhanta A.K. & Tewari A. (2003). *In vitro* somatic embryogenesis and regeneration of somatic embryos from pigmented callus of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (Rhodophyta, Gigartinales). *Journal of Applied Phycology*. 39: 610-616.
- Sulistiani E., Soelistyowati D.T., Alimuddin & Yani S.A. (2012). Callus induction and filaments regeneration from callus of cottonii seaweed (Doty) collected from Natuna Islands, Riau Islands Province. *Biotropia*. 19(2): 103-114.
- Vũ Thị Mơ & Reddy C.R.K. (2016). Khảo sát quy trình khử trùng mẫu, ảnh hưởng của cường độ ánh sáng, nồng độ môi trường agar lên sự hình thành mô sẹo rong *Kappaphycus alvarezii* (doty) doty (Rhodophyta) trong điều kiện *in vitro*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 14(3): 515-522.
- Vũ Thị Mơ, Lê Kim Cương, Hoàng Thanh Tùng, Trần Văn Huỳnh, Lê Trọng Nghĩa, Châu Minh Khanh, Nguyễn Ngọc Lam & Dương Tân Nhứt (2020). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from the seaweed *Kappaphycus striatus*. *Acta Physiologiae Plantarum*. 42:104.
- Yokoya N.S & Handro W. (2002). Effects of plant growth regulators and culture medium on morphogenesis of *Solieria filiformis* (Rhodophyta) cultured *in vitro*. *Journal of Applied Phycology*. 14: 97-102.
- Yokoya N.S., West J.A. & Luchi A.E. (2004). Effects of plant growth regulators on callus formation, growth and regeneration in axenic tissue cultures of *Gracilaria tenuistipitata* and *Gracilaria perplexa* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycological Research*. 52: 244-254.
- Yokoya S., Kakita H., Obika H. & Kitamura T. (1999). Effects of environmental factors and plant growth regulators on growth of the red alga *Gracilaria vermiculophylla* from Shikoku Island, Japan. *Hydrobiologia*. 398/399: 339-347.