

Nghiên cứu ảnh hưởng của tích hợp vi khuẩn endophyte *Bacillus subtilis* GB03 với vật liệu nano silica đến sự phát triển của cây dưa lưới (*Cucumis melo*)

Đinh Thị Hiền¹, Phạm Trung Hiếu¹, Trần Đại Lâm², Lê Thế Tâm³, Vũ Thị Thoa⁴, Nguyễn Thị Phương Thảo⁵, Lê Đăng Quang^{1,4*}

¹Trung tâm Phát triển công nghệ cao, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

²Viện Kỹ thuật Nhiệt đới, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

³Trường Đại học Vinh

⁴Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam

⁵Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

Ngày nhận bài 7/9/2020; ngày chuyển phản biện 11/9/2020; ngày nhận phản biện 14/10/2020; ngày chấp nhận đăng 11/11/2020

Tóm tắt:

Nano silica có kích thước 20-50 nm, được chế tạo bằng phương pháp sol-gel kết hợp siêu âm, được sử dụng nhằm mục đích thử nghiệm tác động của nano silica đối với sự phát triển của vi khuẩn *Bacillus subtilis* GB03 trong phòng thí nghiệm. Đồng thời, đánh giá hiệu quả của nano silica tích hợp vi khuẩn *B. subtilis* GB03 đến sự sinh trưởng của cây dưa lưới (*Cucumis melo*). Kết quả cho thấy, nano silica ở nồng độ 10 µg/ml có tác động tích cực đối với sự phát triển của vi khuẩn *B. subtilis* GB03. Trong thí nghiệm *in vivo*, nhóm nghiên cứu đã quan sát được hiện tượng các phân tử nano SiO₂ bám vào bề mặt vi khuẩn và sự xâm nhập của vi khuẩn vào rễ cây. Đồng thời, sự tích hợp của vi khuẩn và nano silica ở nồng độ 10 µg/ml cũng cho thấy tác động tốt đến tỷ lệ và tốc độ nảy mầm, sự phát triển của bộ rễ, thời gian sinh trưởng, chiều cao và khả năng phân nhánh của cây dưa lưới. Nghiên cứu mở ra hướng phát triển chế phẩm kết hợp nano silica-vi khuẩn endophyte có nguồn gốc tự nhiên thay thế cho các loại thuốc hóa học để phát triển cây dưa lưới nói riêng và cây trồng nói chung.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, cây dưa lưới, *Cucumis melo*, nano silica, sol-gel.

Chỉ số phân loại: 4.1

Giới thiệu

Vi khuẩn nội cộng sinh thực vật (vi khuẩn endophyte) được tìm thấy ở hầu hết các loài thực vật. Nghiên cứu vi khuẩn endophyte cho thấy chúng giúp thúc đẩy thực vật tăng trưởng, tăng năng suất và đóng vai trò là một tác nhân điều hòa sinh học. Ngoài ra, chúng còn có tiềm năng loại bỏ các chất gây ô nhiễm trong đất bằng cách tăng cường khả năng khử độc trên thực vật, làm cho đất trở nên màu mỡ. Hiện nay, nhiều nhà khoa học quan tâm phát triển các ứng dụng công nghệ sinh học của vi khuẩn endophyte để phát triển các giống cây trồng có khả năng khử độc, đồng thời có khả năng sản xuất sinh khối và nhiên liệu sinh học [1, 2].

Những năm gần đây, công nghệ nano đã trở thành một lĩnh vực nghiên cứu hấp dẫn và được ứng dụng nhiều trong các ngành y sinh và nông nghiệp. Trong nông nghiệp, năng suất của cây trồng được cải thiện đáng kể nhờ sử dụng các chất dinh dưỡng trung - vi lượng thiết yếu dưới dạng phân bón nano. Silica tồn tại phong phú trong đất và được hấp thụ từ đất thông qua rễ của cây và lưu lại trong thân của thực

vật. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, các hạt nano silica rất có ý nghĩa trong việc phát triển khả năng đề kháng ở thực vật [3, 4]. Silica được coi như một vi chất thiết yếu và được biết đến với vai trò giúp tăng cường sự phát triển của thực vật. Ứng dụng của silica đối với thực vật đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu trước đây [5, 6].

Các nghiên cứu tích hợp vật liệu nano với vi khuẩn endophyte mới xuất hiện gần đây và chỉ có một số ít báo cáo được công bố [7, 8]. Do đó trong công trình này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của sự tích hợp vi khuẩn endophyte (*Bacillus subtilis* GB03) với nano silica được chế tạo bằng phương pháp sol-gel kết hợp siêu âm nhằm mục đích phát triển chế phẩm có nguồn gốc tự nhiên, an toàn khi sử dụng.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Hóa chất và vi sinh vật

Các hóa chất được sử dụng để tạo nano silica bao gồm: tetraethyl orthosilicat (TEOS) - Si(OC₂H₅)₄ 98% (Sigma -

* Tác giả liên hệ: Email: ledangquang2011@gmail.com

Study on the effect of integrating endophyte *Bacillus subtilis* GB03 and silica nanoparticles on the growth of melon crop (*Cucumis melo*)

Thi Hien Dinh¹, Trung Hieu Pham¹, Dai Lam Tran², The Tam Le³, Thi Thoa Vu⁴, Thi Phuong Thao Nguyen⁵, Dang Quang Le^{1,4*}

¹Center for High Technology Development, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

²Institute for Tropical Technology, VAST

³Vinh University

⁴Vietnam Institute of Industrial Chemistry

⁵Institute of Tropical Biology Ho Chi Minh city, VAST

Received 7 September 2020; accepted 11 November 2020

Abstract:

Nano silica of size 20-50 nm prepared by the sol-gel method was used to test the effect on the growth of *Bacillus subtilis* GB03 in *in vitro* bioassay and evaluate the effectiveness of integrating nano silica and *B. subtilis* GB03 for the growth of melon crop (*Cucumis melo*). The results showed that nanosilica at a concentration of 10 µg/ml had a good effect on the growth of *B. subtilis* GB03. In the *in vivo* experiment, not only the incident of silica nanoparticles adhering to the bacterial surface but also bacterial invasion and penetration on the roots were observed. Besides, the mixture of *B. subtilis* GB03-nano silica at 10 µg/ml also showed a good impact on the rate and speed of germination, the development of the roots, growth time, height, and branching of the melon plant. The study suggested the development of natural-derived nano silica-endophytic bacteria preparations to replace synthetic chemical pesticides used in agriculture.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Cucumis melo*, melon plant, nanosilica, sol-gel.

Classification number: 4.1

Aldrich, Đức), polyethylene glycol 400 (PEG 400) 99% (Merck, Đức), amoniac (NH₃) 25% (Merck, Đức) và một số dung môi như ethanol, methanol, nước cất hai lần.

Chủng vi khuẩn endophyte sử dụng trong nghiên cứu là *Bacillus subtilis* GB03 ở dạng sinh khối khô do TS Chang Ho Chung thuộc Viện Vật liệu Sinh học Jeonju - Hàn Quốc cung cấp. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn được sử dụng trong nghiên cứu là Luria-Bertani (LB) có thành phần (g/l): peptone 10, cao nấm men 5, NaCl 10.

Phương pháp

Tổng hợp nano silica: nano silica được điều chế dựa trên phương pháp sol-gel kết hợp siêu âm. Sử dụng 2,0 g TEOS hòa vào 50 ml ethanol thu được dung dịch tiền chất - dung dịch 1. Hòa tan 1,0 ml H₂O vào 50 ml ethanol thu được dung dịch 2. Hòa 100 ml PEG 400 vào 400 ml ethanol, cùng với đó thêm NH₃ vào hỗn hợp trên đến khi pH~13 thu được dung dịch 3 là môi trường phản ứng. Sau khi đã thu được ba dung dịch trên, tiến hành nhỏ đồng thời dung dịch 1 và dung dịch 2 liên tục vào dung dịch 3 với tốc độ 0,5 ml/phút trong 4 giờ, cốc phản ứng được đặt trong bể siêu âm 37 kHz, nhiệt độ 80°C, khuấy cơ 350 vòng/phút. Sau khi nhỏ hết dung dịch 1 và dung dịch 2, tiếp tục siêu âm hỗn hợp thêm 15 giờ. Trong quá trình phản ứng bổ sung ethanol, NH₃ để duy trì môi trường phản ứng. Sau khi dừng bổ sung ethanol, tiếp tục tiến hành gia nhiệt, siêu âm và khuấy cơ để loại bỏ ethanol trong cốc phản ứng, thu sản phẩm. Kết quả thu được là dung dịch nano silica sử dụng trong thực nghiệm.

Đánh giá cấu trúc hạt:

Đo tán xạ ánh sáng động học - Dynamic Light Scattering (DLS): phân bố kích thước hạt và gián đồ thế zeta của dịch phân tán nano silica được xác định bằng phương pháp DLS trên máy ZS-100 của hãng Horiba.

Đo phổ FT-IR và chụp ảnh TEM, SEM: xác định nhanh đặc trưng cấu trúc của mẫu nano silica bằng phương pháp đo phổ FT-IR trên máy phân tích quang phổ hồng ngoại FT-IR TENSOR II (Bruker, Đức). Kích thước hạt nano silica được xác định bằng phương pháp TEM và phương pháp SEM. Ảnh TEM được đo trên thiết bị kính hiển vi điện tử truyền qua JEM 2100 (JEOL - Nhật Bản) và ảnh SEM được đo trên thiết bị kính hiển vi điện tử quét phát xạ trường Hitachi S-4800 (Nhật Bản), đặt tại Viện Khoa học Vật liệu, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam.

Nuôi cấy vi khuẩn: chủng vi khuẩn *B. subtilis* GB03 ban đầu được lưu trữ ở dạng sinh khối khô. Vi khuẩn được hoạt hóa trên môi trường LB lỏng, tiến hành nuôi lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ 35-37°C trong vòng 24 giờ. Sau 24

giờ, dùng que cấy vòng thao tác vô trùng, nhúng vào dịch mẫu để có các vi khuẩn muốn phân lập. Rĩa các đường trên đĩa petri có chứa môi trường thạch LB. Sau mỗi đường rĩa liên tục đốt khử trùng que cấy và làm nguội trước khi thực hiện thao tác tiếp theo và giữ trong tủ ấm 32°C/24 giờ để xác định hình thái khuẩn lạc. Tiến hành quan sát hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn xác định độ thuần. Chuyển một khuẩn lạc thuần từ đĩa mới nhân vào bình tam giác chứa 50 ml môi trường LB nhân giống dịch thể. Nuôi trên máy lắc 200 vòng/phút ở 35-37°C trong 24 giờ. Xác định mật độ vi khuẩn trong bình nuôi bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch. Cấy 15 ml dung dịch vi khuẩn có mật độ 10^5 cfu/ml vào bình chứa 150 ml môi trường nuôi cấy (tỷ lệ 10%). Lặp lại quá trình nuôi trên máy lắc với các chế độ như trên trong 24 giờ.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ nano silica đến sự phát triển của vi khuẩn *B. subtilis* GB03: ảnh hưởng của nồng độ nano silica đối với sự phát triển của vi khuẩn theo thời gian đã được thực hiện trong nghiên cứu. Tiến hành trộn nano silica ở các nồng độ (0; 10; 30 và 50 $\mu\text{g/ml}$) với 50 ml môi trường LB được pha sẵn trong các trong ống nghiệm. Sau đó, 5 ml vi khuẩn *B. subtilis* GB03 đạt mật độ 10^5 cfu/ml được thêm vào mỗi ống môi trường LB chứa nano silica nồng độ khác nhau. Tiến hành nuôi lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C. Cứ sau bốn giờ, lấy 100 μl môi trường pha loãng trong ống đưa lên trên bề mặt các đĩa thạch bằng que thủy tinh vô trùng và tiến hành đếm khuẩn lạc trên đĩa ở 37°C bằng kỹ thuật cấy bề mặt.

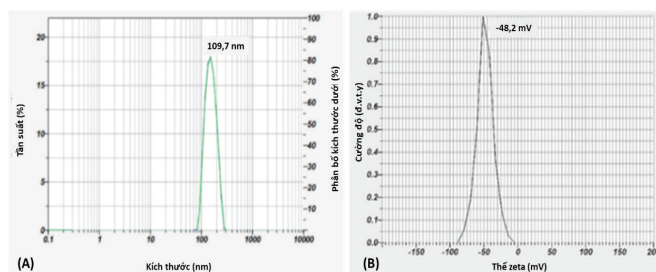
Khảo sát ảnh hưởng của nano SiO_2 -vi khuẩn đến khả năng sinh trưởng và phát triển của cây dưa lưới: hạt giống dưa F1 Kim Cô Nương được sản xuất bởi Công ty TNHH KNOWN-YOU SEED, Đà Loan. Tuyển chọn hạt (hạt to, mẩy, chắc) và đem 30 hạt ngâm trong 20 ml nước cất đối với mẫu đối chứng và 30 hạt trong 20 ml hỗn dịch nano SiO_2 -vi khuẩn *B. subtilis* GB03 ở nồng độ 10 $\mu\text{g/ml}$, mật độ vi khuẩn đạt $\sim 10^9$ đối với công thức thử nghiệm ở nhiệt độ 25-30°C trong 2 giờ, ủ cho nứt mầm rồi gieo 1 hạt/lỗ vào khay loại 50 lỗ/khay. Sau đó tưới dung dịch nano-vi khuẩn lên bề mặt khay giống, tưới 2 lần vào lúc mọc mầm đều và 5 ngày sau mọc. Sau khoảng 10-12 ngày ươm, lúc này cây đã cho ra 2 lá chính, tiến hành di chuyển cây con sang chậu bầu đất (60% xơ dừa; 10% tro trấu hun; 30% phân trùn quế; trộn đều các thành phần của giá thể, sau đó dùng màng phủ dày kín và tưới nước ẩm trước khi trồng 1 tuần). Cứ 7 ngày tưới dung dịch nano-vi khuẩn 1 lần. Tiến hành khảo sát các chỉ tiêu: tỷ lệ và tốc độ nảy mầm, khả năng bám dính vi khuẩn lên rễ cây, sự phát triển của bộ rễ, tăng trưởng chiều cao cây (cm). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên

hoàn toàn với 2 công thức nêu trên, giữa 2 công thức có giải phân cách với 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại trồng 3 cây, xử lý số liệu bằng phần mềm MS Excel 2016.

Kết quả và thảo luận

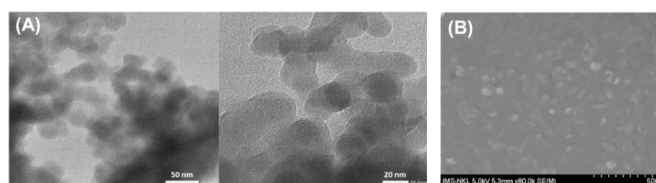
Khảo sát cấu trúc hạt nano silica điều chế được

Kết quả phân tích bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động DLS (hình 1) cho thấy, mẫu nano silica thu được có kích thước hạt trung bình là 109,7 nm và thế zeta là -48,2 mV. Điều này cho thấy mẫu có độ ổn định cao, hệ phân tán sẽ chống lại sự keo tụ (thế zeta trong khoảng $\pm 40 \div \pm 60$ mV).



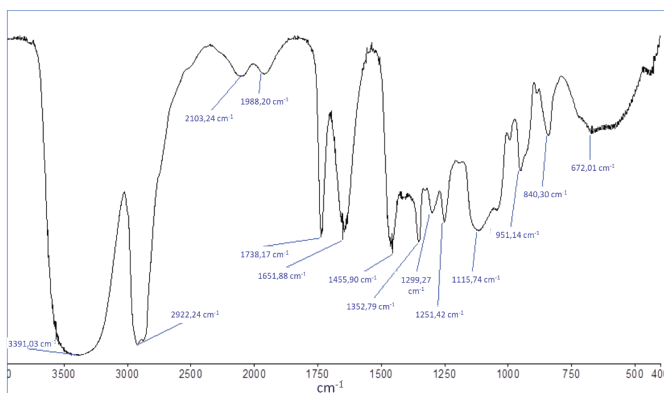
Hình 1. Kết quả phân tích mẫu nano SiO_2 . (A) phân bố kích thước hạt; (B) thế zeta.

Ảnh TEM (hình 2A) của mẫu nano silica cho thấy, các tiểu phân SiO_2 đạt kích cỡ 20-50 nm và phân bố khá đều trong môi trường phân tán. Trên ảnh SEM (hình 2B), các hạt SiO_2 có kích cỡ khoảng 40-70 nm, lớn hơn so với kết quả đo được qua phân tích TEM.



Hình 2. Kết quả phân tích mẫu nano SiO_2 . (A) ảnh TEM; (B) ảnh SEM.

Kết quả đo phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FT-IR) (hình 3) cho thấy, peak tại 1115 cm^{-1} với vai trò ở 1200 cm^{-1} và peak ở 840 cm^{-1} tương ứng với dao động hóa trị bất đối xứng và dao động hóa trị đối xứng của nhóm Si-O. Dao động uốn Si-O-Si xuất hiện ở peak hấp phụ 460 cm^{-1} . Dải peak hấp phụ cường độ thấp ở 672 cm^{-1} ứng với tín hiệu của vòng siloxane trong mạng [9-12]. Peak 951 cm^{-1} được gán cho dao động liên kết Si-O [13]. Dải peak cường độ rộng tại 3450 cm^{-1} và 1640 cm^{-1} tương ứng với dao động hóa trị và dao động uốn của phân tử nước hydrat hóa. Bên cạnh đó là các peak đặc trưng cho tín hiệu của PEG 400. Peak $\sim 2870 \text{ cm}^{-1}$ và 1455 cm^{-1} lần lượt tương ứng với dao động hóa trị và dao động uốn của nhóm C-H. Peak tại 1298 cm^{-1} tương ứng với dao động hóa trị nhóm C-O. Các peak tín hiệu ở 951

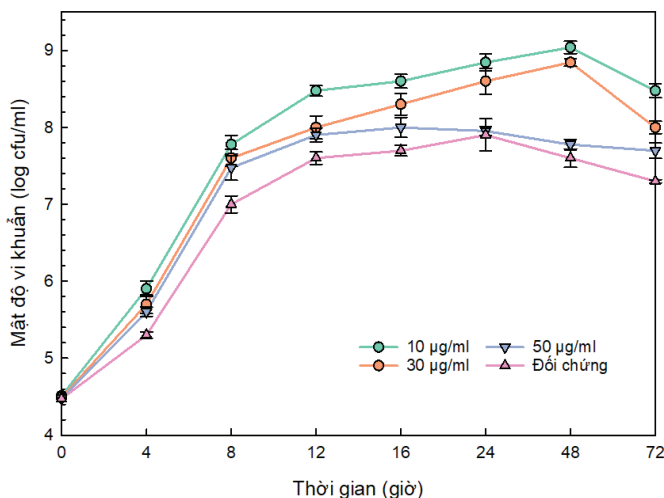


Hình 3. Phổ IR của mẫu nano SiO₂.

cm⁻¹ và 3450 cm⁻¹ cho thấy sự hình thành liên kết hydro giữa nhóm -OH các tiểu phân nano và nguyên tử O hoặc -OH của PEG 400 [14]. Kết quả kiểm tra IR cho thấy có sự tương tác giữa chất bọc và các tiểu phân SiO₂, tuy nhiên tương tác còn yếu, các tiểu phân nano có xu hướng hình thành các tiểu phân đồng dạng với mức năng lượng hình thành mạng thấp hơn mức năng lượng của các tiểu phân với polymer bọc. Có thể khẳng định các hợp chất polymer cho vào trong quá trình tổng hợp chỉ mang tính chất là nền cho quá trình phản ứng, giúp ổn định các tiểu phân hình thành ở kích thước đã định trước.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ nano silica đến sự phát triển của vi khuẩn B. subtilis GB03

Kết quả (hình 4) cho thấy ảnh hưởng của các nồng độ nano silica khác nhau đến sự phát triển của vi khuẩn B. subtilis GB03. Sự phát triển của vi khuẩn phụ thuộc vào nồng độ nano silica và thời gian nuôi. Trong 24 giờ đầu, vi khuẩn phát triển và sinh trưởng bình thường, mật độ vi khuẩn tăng tuyến tính theo thời gian. Sau 48 giờ thí nghiệm,



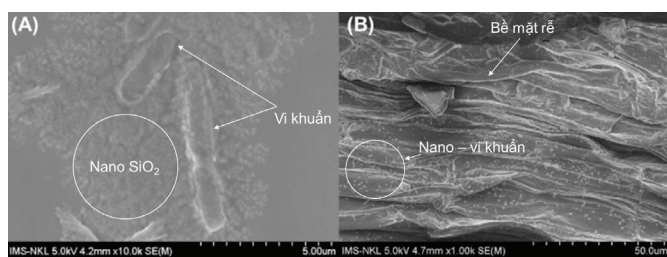
Hình 4. Đồ thị biểu diễn mối quan hệ giữa mật độ vi khuẩn và nồng độ nano SiO₂.

mật độ vi khuẩn đạt giá trị cao nhất ($1,1 \times 10^9$ cfu/ml) tại nồng độ nano SiO₂ (10 µg/ml) thấp nhất trong ba nồng độ thí nghiệm, trong khi đó vi khuẩn ở mẫu đối chứng chỉ đạt 6×10^7 cfu/ml. Từ 48 đến 72 giờ, mật độ vi khuẩn bắt đầu giảm ở tất cả các mẫu thí nghiệm. Trong toàn bộ quá trình thí nghiệm, mật độ vi khuẩn B. subtilis GB03 ở mẫu chứa nano SiO₂ (10 µg/ml) luôn đạt giá trị cao nhất so với tất cả các mẫu còn lại. Sự thay đổi của mật độ vi khuẩn theo nồng độ nano silica trong nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu trước đây của nhóm tác giả Boroumand và cộng sự (2020) [15]. Nghiên cứu của nhóm tác giả này đã cho thấy ảnh hưởng của nồng độ nano silica đối với sự phát triển của chủng vi khuẩn endophyte Pseudomonas stutzeri. Theo đó, kết quả nghiên cứu cho thấy ở nồng độ nano silica 0,07 µg/ml, vi khuẩn P. stutzeri phát triển có mật độ cao nhất, theo sau là nồng độ 0,05 µg/ml tại thời điểm 48 h. Trong khi đó, tại nồng độ nano silica là 0,1 µg/ml, mật độ vi khuẩn P. stutzeri thấp hơn so với hai nồng độ trên ở mọi thời điểm so sánh [15]. Như vậy, vi khuẩn sẽ phát triển tốt nhất ở một nồng độ silica thích hợp, nồng độ silica quá cao có thể gây ra ức chế vi khuẩn. Do đó, chúng tôi lựa chọn nồng độ nano SiO₂ 10 µg/ml cho các thử nghiệm trên cây dưa lưới tiếp theo.

Ảnh hưởng của nano SiO₂-vi khuẩn đến khả năng sinh trưởng và phát triển của cây dưa lưới

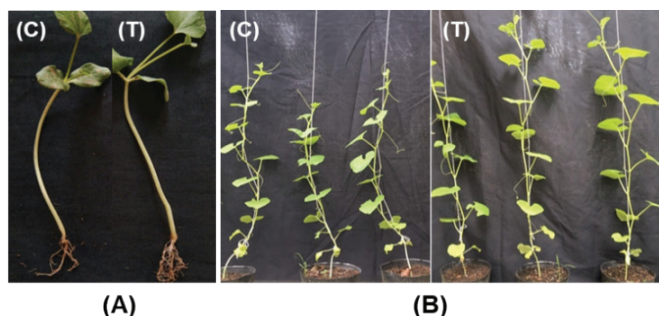
Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã ngâm ủ trực tiếp hạt giống cây dưa lưới trong hỗn hợp nano-vi khuẩn B. subtilis GB03 cho đến khi nảy mầm. Sau đó trồng thùy canh có tưới dung dịch hỗn hợp nano-vi khuẩn để tiến hành chụp SEM và quan sát sự phát triển của bộ rễ. Sau khi trồng vào bầu đất, chúng tôi sử dụng phân bón bình thường mà không tiếp thêm dung dịch tích hợp và quan sát sự sinh trưởng của cây. Qua quan sát các mẫu thí nghiệm xử lý hạt giống với nano silica-vi khuẩn B. subtilis GB03 cho thấy, sau 48 h tất cả các hạt thử nghiệm (100%) đều nảy mầm tương tự như các hạt đối chứng. Một số nghiên cứu trước đây cho thấy silica hay nano silica có tác dụng kích thích sự nảy mầm của hạt giống do tác dụng sinh hóa có thể làm giảm sản xuất axit abisicic và tăng mức gibberellin [16, 17]. Li và Ma (2002) [18] đã báo cáo rằng, khi hàm lượng silica trong đất có nồng độ trong khoảng 55 đến 203 mg/kg, hoạt tính của protease, lipase trong hạt và tốc độ hô hấp tăng lên, thúc đẩy quá trình nảy mầm của hạt cây dưa chuột, sức sống của hạt giống cũng được tăng lên đáng kể. Nghiên cứu của Rathinam và cộng sự (2011) [19] cho thấy, tỷ lệ nảy mầm của hạt ngô cao hơn (từ 2-11%) khi chúng được trồng trong đất có trộn với vật liệu nano silica ở nồng độ 100 đến 400 µg/g so với mẫu đối chứng và mẫu đất trộn với silica thông thường.

Khi tiến hành nghiên cứu các mẫu rễ cây dưa lưới được xử lý với nano silica-vi khuẩn B. subtilis GB03 trong điều kiện nồng độ nano silica 10 µg/ml và ủ hạt nảy mầm, chúng tôi đã quan sát được hiện tượng các phân tử nano SiO₂ bám vào bề mặt vi khuẩn và sự xâm nhập của vi khuẩn vào rễ cây.



Hình 5. Hình ảnh hiển vi điện tử quét (SEM) của nano SiO₂ và vi khuẩn *B. subtilis*: (A) nano SiO₂ bám vào vi khuẩn *B. subtilis* GB03 trong môi trường nuôi cấy LB sau 48 h thử nghiệm; (B) nano SiO₂-vi khuẩn *B. subtilis* GB03 trên rễ của mẫu cây dưa lưới trước khi được trồng vào bầu đất.

Hình 5A cho thấy, nano silica bám lên bề mặt của vi khuẩn, từ đó tạo điều kiện thuận lợi cho rễ cây hấp thu được silica trong quá trình vi khuẩn xâm nhập vào sâu qua vỏ rễ (hình 5B). Quan sát ảnh SEM các mẫu rễ thí nghiệm có thể thấy hỗn hợp nano-vi khuẩn *B. subtilis* GB03 bám trên bộ rễ, từ đó có những tác động tới hoạt động của bộ rễ, ảnh hưởng tới khả năng sinh trưởng và phát triển của cây trồng. Qua theo dõi, mẫu cây dưa lưới được thử nghiệm với hỗn hợp nano silica-vi khuẩn *B. subtilis* GB03 có số lượng rễ và chiều dài rễ nhỉnh hơn so với công thức đối chứng (hình 6).



Hình 6. Ảnh hưởng của hỗn hợp nano SiO₂-vi khuẩn *B. subtilis* GB03 đến sự phát triển rễ và chiều cao cây dưa lưới Kim Cô Nương: hình ảnh mẫu đối chứng (C) và mẫu thí nghiệm (T). (A) bộ rễ cây dưa lưới trước khi trồng vào bầu đất; (B) chiều cao thân sau trồng 28 ngày.

Kết quả theo dõi sự phát triển chiều cao của các mẫu dưa lưới được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Chiều cao trung bình của các mẫu cây dưa lưới theo thời gian (cm).

Công thức	Số ngày sau trồng (ngày)		
	14	21	28
Thí nghiệm	22,93 ^a	63,63 ^a	107,04 ^a
Đối chứng	21,53 ^b	60,70 ^b	101,20 ^b
LSD _{0,05} [*]	1,08	1,52	3,83
CV% ^{**}	1,39	0,69	1,05

Trong cùng một dòng, các số có cùng chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa p=0,05. *: giá trị sai khác nhỏ nhất có ý nghĩa; **: hệ số biến thiên.

Bảng 1 cho thấy tốc độ tăng trưởng chiều dài thân chính ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau là khác nhau. Ban đầu, các cây trong thử nghiệm có chiều cao tương đương nhau (~5 cm). Giai đoạn 14 ngày sau trồng, các mẫu dưa thí nghiệm có tốc độ tăng trưởng chiều dài thân chính chậm do cây dưa phải trải qua quá trình hồi xanh bén rễ 2-5 ngày, khả năng hút nước và dinh dưỡng hạn chế. Ở giai đoạn tiếp theo từ 14-21 ngày sau trồng, sự tăng trưởng của cây, đặc biệt là sự kéo dài của các lóng rất rõ rệt. Lúc này cây vừa sinh trưởng sinh dưỡng vừa sinh trưởng sinh thực nên cần tác động các biện pháp kỹ thuật hợp lý để cây phát triển chiều dài, khối lượng thân lá tối ưu nhằm tích lũy vật chất để cây ra hoa, kết quả. Giai đoạn sau trồng từ 21-28 ngày, tốc độ tăng trưởng chiều dài thân của các giống dưa lưới rất mạnh, trong đó ở công thức chứa nano silica có chiều dài thân chính trung bình đạt (107,04 cm), cao hơn khá rõ rệt so với công thức đối chứng (101,20 cm) (hình 6B). Kết quả này cho thấy, các cây thử nghiệm phát triển bình thường và tốt hơn mẫu đối chứng.

Nghiên cứu của Rathinam và cộng sự (2011) [19] về ảnh hưởng của nồng độ nano silica (100-400 µg/g) trong đất đến sự phát triển sinh trưởng của cây ngô cho thấy, ở một nồng độ phù hợp (100, 200 µg/g trong đất), nano silica có tác động tích cực đến sự sinh trưởng của cây ngô so với mẫu cây trồng trong đất không chứa nano silica hay chứa silica thông thường. Thí nghiệm trên cây cải xoong của tác giả Boroumand cùng cộng sự (2020) [15] cho thấy nồng độ nano silica tối ưu sử dụng giúp thu hoạch được trọng lượng khô thực vật cao nhất là ở 100 µg/ml. Một số báo cáo trước đây cũng chỉ ra rằng, việc cung cấp silic, silica hay nano silica vào trong đất trồng có tác động tích cực làm tăng sản lượng, năng suất của nhiều loại cây trồng trong nông nghiệp. Như vậy, đã có khá nhiều nghiên cứu liên quan đến thử nghiệm ảnh hưởng trực tiếp của silica, nano silica hay các hợp chất của silic ảnh hưởng đến sự phát triển của thực vật. Tuy nhiên, những nghiên cứu về tác động của tích hợp vật liệu nano-vi khuẩn endophyte lên thực vật còn khá ít. Ví dụ như báo cáo của tác giả Palmqvist và cộng sự (2015) [7] đã chỉ ra rằng, nano titan có khả năng làm tăng cường sự phát triển của vi khuẩn *B. amyloliquifaciens* và tích hợp nano-vi khuẩn của chúng có tác động tích cực lên rễ của cây cải dầu (*Brassica napus*), giúp cây chống lại bệnh đốm nâu (*Alternaria brassicae*) trong quá trình sinh trưởng. Một nghiên cứu khác của Luciana và cộng sự (2019) [20] thử nghiệm đối kháng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* (gây bệnh héo xanh) trên khoai tây của tích hợp vi khuẩn endophyte với hỗn hợp nano silica và than chì đã chỉ ra, hỗn hợp nano silica và than chì có tác động làm tăng nhanh sự phát triển của 3 chủng vi khuẩn endophyte (*Lysinibacillus*, *P. fluorescens* và *B. subtilis*), trong đó mật độ vi khuẩn *B. subtilis* đạt cao nhất. Bên cạnh đó, tích hợp

vi khuẩn *B. subtilis*-nano silica và than chì cũng cho thấy hiệu quả ức chế cao nhất đối với sự phát triển của vi khuẩn *R. solanacearum* trong thí nghiệm *in vitro*.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã chế tạo được nano SiO₂ 20-50 nm bằng phương pháp sol-gel kết hợp siêu âm. Bên cạnh đó, các phương pháp đo phân tích cấu trúc hạt SEM, TEM, DLS, IR đã chỉ ra cấu trúc và những liên kết cơ bản của hạt nano silica được tổng hợp. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã quan sát được hiện tượng các hạt nano silica bám lên trên bề mặt vi khuẩn và thấy sự xâm nhập của vi khuẩn vào trong rễ cây. Nghiên cứu bước đầu đã khảo sát ảnh hưởng của tích hợp vi khuẩn *B. subtilis* GB03-nano silica ở nồng độ 10 µg/ml đến cây dưa lưới và cho thấy, tích hợp có tác dụng làm tăng khả năng phát triển của bộ rễ, chiều cao, thời gian sinh trưởng và khả năng phân nhánh của cây theo thời gian. Đây là tiền đề để tiếp tục nghiên cứu, phát triển các chế phẩm bảo vệ thực vật sạch và an toàn với môi trường có chứa tích hợp vi khuẩn-nano silica sử dụng trên cây dưa lưới nói riêng và cây trồng nói chung.

LỜI CẢM ƠN

Tập thể tác giả xin trân trọng cảm ơn Ủy ban Nhân dân TP và Sở KH&CN TP Hồ Chí Minh đã hỗ trợ thực hiện nghiên cứu thông qua đề tài: “Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm nano-vi khuẩn PGPR nhằm phòng trừ bệnh giả sương mai trên cây dưa lưới”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] E. Eymard-Vernain, S. Luche, T. Rabilloud, C. Lelong (2018), “Impact of nanoparticles on the *Bacillus subtilis* GB03(3610) competence”, *Scientific Report*, **8**, p.2984.

[2] P.R. De Gregorio, G. Michavila, L. Ricciardi Muller, C. de Souza Borges, M.F. Pomares, E.L. Saccol de Sá, C. Pereira, P.A. Vincent (2017), “Beneficial rhizobacteria immobilized in nanofibers for potential application as soybean seed bioinoculants”, *PLoS One*, **12**, p.e0176930.

[3] E. Epstein (1999), “Silicon”, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**, pp.641-664.

[4] J.F. Ma, N. Yamaji (2006), “Silicon uptake and accumulation in higher plants”, *Trends in Plant Science*, **11**, pp.392-397.

[5] H.A. Currie, C.C. Perry (2007), “Silica in plants: biological, biochemical and chemical studies”, *Annals of Botany*, **100**, pp.1383-1389.

[6] D.W. Galbraith (2007), “Silica breaks through in plants”, *Nature Nanotechnology*, **2**, pp.272-273.

[7] N.G.M. Palmqvist, S. Bejai, J. Meijer, G.A. Seisenbaeva, V.G. Kessler (2015), “Nano titania aided clustering and adhesion of

beneficial bacteria to plant roots to enhance crop growth and stress management”, *Science Report*, **5**, p.10146.

[8] S. Timmus, G. Seisenbaeva, L. Behers (2018), “Titania (TiO₂) nanoparticles enhance the performance of growth-promoting rhizobacteria”, *Science Report*, **8**, p.617.

[9] M.J. Adeogun, J.N. Hay (2001), “Structure control in sol-gel silica synthesis using ionene polymers. 2: evidence from spectroscopic analysis”, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, **20**, pp.119-128.

[10] P. Innocenzi (2003), “Infrared spectroscopy of sol-gel derived silica-based films: a spectra microstructure overview”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, **316**, pp.309-319.

[11] J.M. Nedelec, L.L. Hench (1999), “Ab initio molecular orbital calculations on silica rings”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, **255**, pp.163-170.

[12] Y. Hiroyuki, K. Kanichi, N. Hiroyuki (1990), “IR study on the structural evolution of sol-gel derived SiO₂ gels in the early stage of conversion to glasses”, *Journal of Non-Crystalline Solids*, **126**, pp.68-78.

[13] V. Simon, D. Eniu, A. Gritco, S. Simon (2007), “Thermal and spectroscopic investigation of sol-gel derived aluminosilicate bioglass matrices”, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, **9**, pp.3368-3371.

[14] M. Catauro, F. Bollino, F. Papale, M. Gallicchio, S. Pacifico (2015), “Influence of the polymer amount on bioactivity and biocompatibility of SiO₂/PEG hybrid materials synthesized by sol-gel technique”, *Materials Science and Engineering C*, **48**, pp.548-555.

[15] N. Boroumand, M. Behbahani, G. Dini (2020), “Combined effects of phosphate solubilizing bacteria and nano silica on the growth of land cress plant”, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, **20**, pp.232-243.

[16] S.C.C. Cassandra, E.T. Peter, W.M.H. Henk, E.F.S. William (2006), “Gene expression profiles of Arabidopsis Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism”, *Plant J.*, **46**, pp.805-822.

[17] K. Birgit, A.C. Marc, L. Gerhard (2005); “Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination”, *Seed Sci. Res.*, **15**, pp.281-307.

[18] Q.F. Li, C.C. Ma (2002), “Effect of available silicon in soil on cucumber seed germination and seedling growth metabolism”, *Acta Horti Sinica.*, **29**, pp.433-437.

[19] Y. Rathinam, E. Viswanathan, R. Venkatachalam, S.K. Narayana, P. Periasamy (2011), “Influence of nano silica powder on the growth of maize crop (*Zea Mays* L.)”, *International Journal of Green Nanotechnology*, **3**, pp.180-190.

[20] D. Luciana, N.I. Hersantia, H. Sri, J.I. Made (2019), “*In vitro* study of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and endophytic bacteria antagonistic to *Ralstonia solanacearum* formulated with graphite and silica nano particles as a biocontrol delivery system (BDS)”, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **19**, p.101153.