

ẢNH HƯỞNG CỦA NANO KIM LOẠI Fe, Cu VÀ Co ĐẾN SINH TRƯỞNG CỦA VI KHUẨN CỐ ĐỊNH ĐẠM *SINORHIZOBIMUM FREDII* T14 VÀ KHẢ NĂNG TẠO NỐT SÀN TRONG RỄ CÂY ĐẬU TƯƠNG

Phan Thị Hồng Thảo^{1,✉}, Đặng Thị Nhung¹, Trần Thị Hương¹, Nguyễn Văn Hiếu¹, Nguyễn Thị Hồng Liên¹, Nguyễn Vũ Mai Linh¹, Đào Thị Hồng Vân², Nguyễn Tường Vân¹, Nguyễn Hoài Châu³

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Mở Hà Nội

³Viện Công nghệ môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: pthongthao@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 03.10.2020

Ngày nhận đăng: 09.3.2021

TÓM TẮT

Đậu tương là cây trồng có giá trị kinh tế cao được trồng phổ biến tại Việt Nam và nhiều nước trên thế giới. Cây đậu tương có khả năng cố định đạm nhờ nhiều loại vi sinh vật khác nhau trong tự nhiên. Trong đó, vi sinh vật cộng sinh *Rhizobium* đóng vai trò quan trọng trong quá trình cố định đạm và tạo nốt sần trên cây họ đậu. Hiện nay để giảm thiểu sử dụng hóa chất và dư lượng các kim loại trong đất, một số loại phân bón vi lượng nano được sử dụng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày ảnh hưởng của nano kim loại Fe, Cu, Co đến khả năng phát triển *in vitro* của vi khuẩn cố định đạm *Sinorhizobium fredii* T14 và khả năng tạo nốt sần trong rễ cây đậu tương ĐT26. Kết quả cho thấy, nano Fe ở các nồng độ 2, 5, 10, 25, 50 ppm không gây ảnh hưởng tới sinh trưởng của *S. fredii* T14; ở các nồng độ 100, 250 và 500 làm giảm tương ứng 20, 35 và 46% khả năng sinh trưởng. Nano Co ở nồng độ dưới 10 ppm không gây ảnh hưởng đến sinh trưởng của *S. fredii* T14, nhưng ở mức 500 ppm làm giảm 73% khả năng sinh trưởng. Nano Cu ở nồng độ 5, 25 ppm và 50 ppm làm giảm tương ứng 23, 68 và 100% khả năng sinh trưởng của *S. fredii* T14. Khả năng sinh polysaccharide ngoại bào của *S. fredii* T14 ít bị ảnh hưởng bởi nano Fe và Co dưới 250 ppm, nhưng bị giảm mạnh khi có mặt nano Cu. Bổ sung nano Fe, Cu và Co ở nồng độ 2 ppm làm tăng số lượng nốt sần trong rễ cây đậu tương và khả năng phát triển của cây trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Từ khóa: cây đậu tương, cố định nitơ, nano kim loại, nốt sần cây đậu tương, *Sinorhizobium fredii* T14

GIỚI THIỆU

Cây đậu tương là cây trồng ngắn ngày có giá trị kinh tế cao, là nguồn cung cấp thực phẩm chính, làm nguyên liệu cho công nghiệp, thức ăn cho gia súc và đặc biệt có vai trò trong cải tạo đất (Phạm Văn Thiệu, 2002). Cây đậu tương được biết đến là khả năng cố định đạm nhờ các loại vi sinh vật khác nhau, trong đó mối quan hệ cố định nitơ cộng sinh giữa vi khuẩn nốt sần (*Rhizobium*) và cây họ đậu là điển hình nhất, lượng đạm tạo thành ước tính đạt trên 80 triệu tấn mỗi năm, tương đương với lượng phân đạm vô cơ trên toàn thế giới sản xuất năm 1990 (Nguyễn Lâm Dũng *et al.*, 2009). Các loài cây họ đậu tham gia vào mối quan hệ cộng sinh với vi khuẩn bao gồm *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* và *Burkholderia*, chúng chuyển hóa N₂ trong khí quyển thành amoniac, được gọi là cộng sinh thân rễ. Tại vị trí cộng sinh, rễ hình thành các nốt sần để chứa các thân rễ cố định N₂.

Để bắt đầu sự cộng sinh giữa cây họ đậu-rhizobia, sự phát sinh cơ quan nốt sần và sự lây nhiễm vi khuẩn phải được phối hợp chặt chẽ, và được thực hiện bằng việc nhận biết phân tử tín hiệu của rhizobia (một lipochitoooligosaccharide) được gọi là NOD Factor (Tian *et al.*, 2019), hình thành nốt sần là yếu tố quan trọng để đánh giá quá trình cố định nitơ.

Sự gia tăng nhu cầu về sản lượng cây trồng dẫn đến việc sử dụng nhiều và đa dạng các loại phân bón hóa học, dẫn đến ô nhiễm môi trường đất. Ứng dụng các nano kim loại như Fe, Cu, Co, ZnO... trong nông nghiệp đang là hướng nghiên cứu triển vọng để thúc đẩy tăng trưởng và tăng năng suất cây trồng, giảm thiểu hàm lượng lớn phân bón hóa học sử dụng, với hàm lượng lớn đã gây ảnh hưởng xấu cho đất (Fraceto *et al.*, 2016). Tuy nhiên, có không ít quan ngại về việc sử dụng các nano kim loại sẽ ảnh hưởng đến hệ vi sinh vật trong đất, trong đó có nhóm vi sinh vật cố định

đạm (Siddiqui *et al.*, 2015).

Một số nghiên cứu đã sử dụng các nguyên tố vi lượng dưới dạng hạt kích thước nano (<100 nm) để đưa vào các sản phẩm sử dụng trên cây trồng, kết quả các chỉ số sinh lý, sinh hóa và năng suất được tăng lên so với khi sử dụng các sản phẩm vi lượng dạng muối kim loại hoặc chelat. Một số nghiên cứu của (Sah *et al.*, 2009); Lu và cộng sự (2002) khi sử dụng các hạt oxit kim loại có kích thước nano để xử lý hạt giống, phân bón lá cho thấy, hỗn hợp hạt SiO₂ và TiO₂ làm tăng sức nảy mầm của hạt đậu. Một số nghiên cứu công bố về sử dụng sản phẩm có chứa các hạt kim loại ở kích thước nano như: Afshar và cộng sự (2010) theo dõi tác dụng của phân bón lá tới quá trình phát triển của cây đậu đũa trong điều kiện thời tiết khô hạn; Zhu và cộng sự (2008) khảo sát quá trình hấp thu, vận chuyển và tích lũy các hạt oxit sắt trong cây bí ngô. Sah và cộng sự (2009) ảnh hưởng của các hạt kim loại lên sự nảy mầm của hạt xà lách và hệ vi sinh vật trong đất.

Trong bài báo này chúng tôi đánh giá tác động của hạt nano kim loại Fe, Cu, Co ở đến sinh trưởng và khả năng tạo thành nốt sần của chủng vi khuẩn cố định đạm *Sinorhizobium fredii* T14.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng vi khuẩn cố định đạm *Sinorhizobium fredii* T14 được phân lập trên nốt rễ của cây đậu tương tại xã Vĩnh Quỳnh, Thanh Trì, Hà Nội thuộc bộ sưu tập chủng của Phòng Vi sinh vật đất, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH và CN Việt Nam.

Các nano kim loại Fe, Cu, Co có kích thước hình cầu, đường kính từ 20-40 nm nhận từ Viện Công nghệ Môi trường.

Hạt đậu tương giống ĐT26 được nhận từ Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ, Vĩnh Quỳnh, Thanh Trì, Hà Nội.

Kiểm tra đặc điểm sinh học

Hình thái khuẩn lạc của các chủng *Rhizobium* sp. được kiểm tra trên môi trường YEMA-CR và kiểm tra khả năng sinh trưởng nhanh hay chậm bằng thử nghiệm Bromothymol Blue trên môi trường lỏng theo Vincent (1970). Phản ứng nhuộm Gram được thực hiện theo Somasegaran và Hoben (1994). Đánh giá khả năng phân hủy gelatin theo Singh và cộng sự (2008).

Đánh giá khả năng sử dụng nguồn cacbon

Chủng *S. fredii* T14 được nuôi cấy trên môi

trường YEMA lỏng thay nguồn đường D-manitol bằng các nguồn tương ứng: D-glucose, L-arabinose, D-xylose, D-manitol, D-fructose, D-cellulose và sucrose trong 72 giờ ở nhiệt độ 28°C. Môi trường có D-manitol được coi là đối chứng dương, môi trường YEMA không có đường là đối chứng âm. Sự sinh trưởng của chủng được quan sát bằng sự thay đổi OD_{600nm} so với môi trường đối chứng không cấy vi khuẩn

Xác định khả năng chịu muối, khoảng pH và nhiệt độ phát triển

Chủng *S. fredii* T14 được nuôi cấy trên các môi trường YEM có chứa các nồng độ muối khác nhau từ 0 đến 10% (w/v) ở 28°C trong 72 giờ (Hashem *et al.*, 1998). Chủng *S. fredii* T14 được nuôi cấy trên các môi trường YEM có pH khác nhau (pH 3,0 đến 10,0) và nuôi lắc 200 vòng/phút, ở 28°C trong 48 giờ sau đó kiểm tra sự sinh trưởng (Aurag *et al.*, 1992). Vi khuẩn *S. fredii* T14 được nuôi cấy trên môi trường YEMA ở các nhiệt độ 15, 24, 28, 30, 37, 42, 45 và 55°C trong 5 ngày. Ở các thí nghiệm xác định nồng độ muối, dải pH, nhiệt độ. Sự sinh trưởng của vi khuẩn được xác định bằng sự thay đổi OD_{600nm} trên môi trường lỏng so với đối chứng.

Kiểm tra khả năng chuyển hóa nitrate thành nitrite

Chủng *S. fredii* T14 được nuôi trong môi trường nitrate (5 g/L peptone, 3 g/L yeast extract, 1 g/L KNO₃, pH 7.0) ở 30°C, lắc 200 vòng/phút, sau 48 giờ, thử khả năng chuyển hóa bằng thuốc thử gồm acid sulfanilic và alpha-naphthylamine. Nếu dịch nuôi cấy chuyển sang màu đỏ là có sự chuyển hóa nitrate thành nitrite (Bhatt *et al.*, 2013).

Thử khả năng phát huỳnh quang

Vi khuẩn kiểm tra được nuôi trên môi trường King (2 g/L pepton, 1,5 g/L MgSO₄, 1,5 g/L K₂HPO₄, 10 mL/L glycerol, 20 g/L agar, pH 7) sau 48 giờ nuôi cấy, theo dõi khả năng phát huỳnh quang dưới ánh sáng UV (Singh *et al.*, 2008).

Kiểm tra khả năng ức chế vi khuẩn của các hạt nano kim loại

Kiểm tra khả năng ức chế của các nano Fe, Cu và Co (0 – 500 ppm) đến sinh trưởng của chủng vi khuẩn *S. fredii* T14 theo thời gian. Xác định khả năng sinh trưởng thông qua đo OD_{600 nm} và xác định mật độ. Hình ảnh tế bào vi khuẩn *S. fredii* T14 sau xử lý với nano được chụp kiểm tra dưới kính hiển vi điện tử quét JSM-5410LV (Jeol - Japan).

Xác định hàm lượng polysaccharide

Hàm lượng polysaccharide ngoại bào được định

lượng bằng phương pháp phenol-sulfuric acid (Dubois *et al.*, 1956). Chuẩn bị mẫu: chủng vi khuẩn *S. fredii* T14 được lên men trong môi trường lỏng YEM, sau 96 giờ lên men, ly tâm 10.000 vòng/phút thu dịch trong để xác định polysaccharide. Các bước được tiến hành lấy 400 μ L dịch mẫu chứa polysaccharide bổ sung 200 μ L dung dịch phenol 5% tiếp đến 1 mL H₂SO₄ đậm đặc và để 30 phút ở nhiệt độ phòng. Đo quang phổ ở bước sóng 490 nm. Hàm lượng polysaccharide được định lượng dựa trên số đo OD thu được của mẫu thí nghiệm đối chiếu với đồ thị chuẩn glucose.

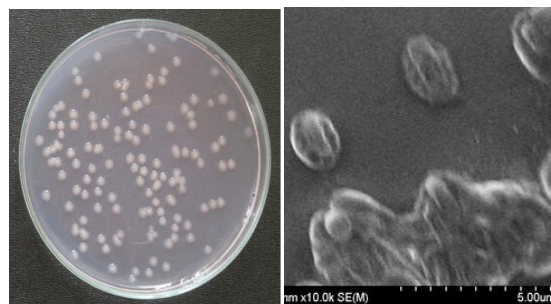
Phân tích thống kê

Phân tích thống kê được thể hiện ý nghĩa bằng \pm SD và được phân tích bằng ANOVA-test khi so sánh giá trị trung bình của các nhóm. Sự khác nhau sẽ được chỉ ra ý nghĩa bằng $p < 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn *Sinorhizobium fredii* T14

Theo một số nghiên cứu gần đây, chủng *S. fredii* là loài vi khuẩn cố định đạm được nghiên cứu nhiều do khả năng cố định đạm cao trên nhiều cây chủ khác nhau, sinh polysaccharide ngoại bào và có tiềm năng ứng dụng lớn trong tạo phân bón sinh học cố định đạm (López-Baena *et al.*, 2016; Margaret *et al.*, 2011).



Hình 1. Khuẩn lạc chủng *S. fredii* T14 trên môi trường YEMA-CR (a) và tế bào *S. fredii* T14 trên kính hiển vi điện tử quét JSM-5410LV (Jeol - Japan) x10000 (b).

Bảng 1. Đặc điểm nuôi cấy và sinh hóa của chủng *Sinorhizobium fredii* T14.

Thử nghiệm	Đặc điểm	
Nuôi cấy trên môi trường GPA	Không phát triển	
pH phát triển	$6 \leq \text{pH} \leq 9$	
Nhiệt độ phát triển, °C	$24 \leq t \leq 42$, t_{opt} : 37°C	
Muối, %	$\leq 2,5$	
Khả năng chuyển hóa nitrate thành nitrite	+	
Khả năng phân hủy gelatin	-	
Khả năng phát triển	nhanh	
Phát huỳnh quang	-	
	D-glucose	+
	L-arabinose	+
	D-xylose	-
Khả năng sử dụng nguồn cacbon	D-manitol	+
	D-fructose	+
	D-cellulose	+
	sucrose	+
	khoáng	-

"-": không sinh trưởng hoặc không chuyển hóa; "+": có sinh trưởng và có chuyển hóa.

Đặc điểm sinh học chủng *S. fredii* T14 thuộc nhóm trực khuẩn Gram (-) không phát huỳnh quang, ở độ phóng đại 3000 và 10000 lần tế bào có kích thước $0,5 \div 1,5 \mu\text{m}$, sinh màng nhầy bao kín tế bào (Hình 1), đây cũng là một đặc điểm quan trọng với nhóm *Rhizobium* (López-Baena *et al.*, 2016; Sayyed

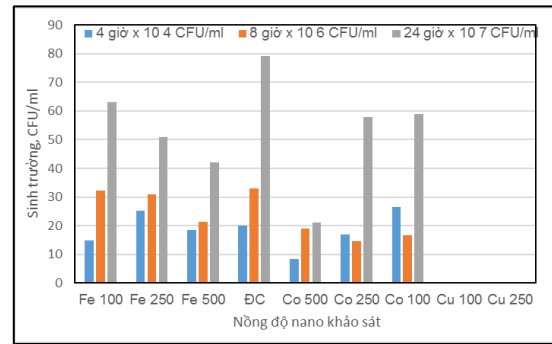
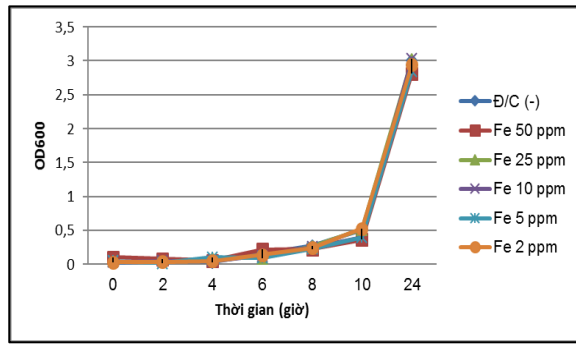
et al., 2011). Các chủng *S. fredii* có khả năng cố định đạm cao, phát triển nhanh, có khả năng tạo nốt sần trên các giống đậu tương ở Mỹ, Trung Quốc và châu Á, tổng hợp nhiều loại polysaccharide như exopolysaccharide, lipopolysaccharide và các vỏ nhầy polysaccharide (Margaret *et al.*, 2011).

Chủng *S. fredii* T14 sinh trưởng tốt ở nồng độ muối 0,02 - 0,5% và giảm sinh trưởng dần khi nồng độ muối tăng đến 2,5%, ở nồng độ muối cao hơn chủng không phát triển. Nghiên cứu của Kucuk và cộng sự (2006), các chủng *S. fredii* phát triển nhanh thường chịu được nồng độ muối cao hơn so với các chủng sinh trưởng chậm. Chủng *S. fredii* T14 phát triển tốt trong dải pH 6,0 - 9,0; nhiệt độ 24 - 42°C, sinh trưởng tối thích ở 30°C, không phát triển ở nhiệt độ > 45°C. Kết quả của chúng tôi tương tự như kết quả của Kucuk và cộng sự (2006) (Kucuk *et al.*, 2006). Chủng *S. fredii* T14 có khả năng chuyển hóa nitrate thành nitrite và không sinh gelatinase trong môi trường nuôi, đây cũng là một đặc điểm của chi *Rhizobium* (Hunter

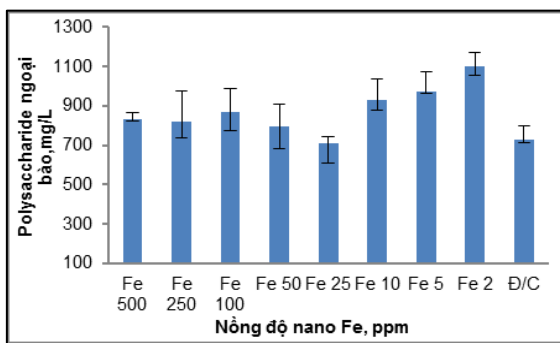
et al., 2007). Bên cạnh đó, *S. fredii* T14 có khả năng đồng hóa được: D-glucose, L-arabinose, D-manitol, D-fructose, D-cellulose, Sucrose và không có khả năng đồng hóa D-xylose.

Ảnh hưởng của nano kim loại Fe đến khả năng sinh trưởng và polysaccharide của chủng vi khuẩn *Sinorhizobium fredii* T14

Kết quả cho thấy, nano Fe ở các nồng độ 2, 5, 10, 25, 50 ppm không ảnh hưởng tới khả năng sinh trưởng của chủng *S. fredii* T14 (Hình 2 a). Các nồng độ nano Fe 100, 250 và 500 ppm gây ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn *S. fredii* T14, làm giảm 20, 35 và 46% số lượng vi khuẩn (Hình 2 b).



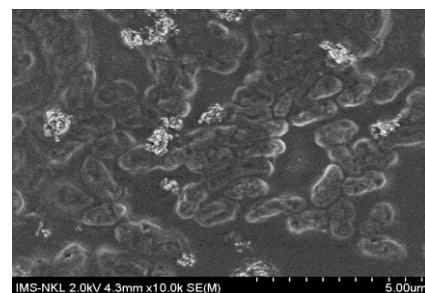
Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ nano kim loại Fe (a,b) và Co (b) đến sinh trưởng của vi khuẩn *S. fredii* T14.



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ nano Fe đến sinh tổng hợp polysaccharide ngoại bào của *S. fredii* T14 sau 96 giờ.

Sinh polysaccharide là một đặc điểm của các loài *Rhizobium*, giúp các chủng có khả năng bám dính vào rễ cây, chống chịu tốt hơn với môi trường khắc nghiệt, giúp cây trồng giữ được độ ẩm. Kết quả cho thấy, hạt nano Fe có ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp polysaccharide của vi khuẩn *S. fredii* T14, hàm lượng

polysaccharide cao nhất ở nồng độ nano Fe 2 ppm, với Fe 25 ppm, quá trình sinh tổng hợp polysaccharide ngoại bào giảm nhẹ sau đó lại tăng ở các nồng độ nano từ 50 đến 500 ppm (Hình 3).



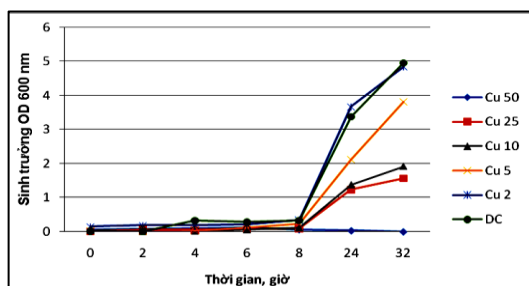
Hình 4. Ảnh hưởng của nano Fe nồng độ 250 ppm đến hình thái của tế bào vi khuẩn *S. fredii* T14 (x 10.000).

Hình thái tế bào *S. fredii* T14 ở nồng độ nano Fe 250 ppm đã thay đổi, lớp vỏ nhầy bám quanh tế bào không tròn đều mà tạo hình elip. Bên cạnh đó, có nhiều đám nano Fe bám vào tế bào vi khuẩn (Hình 4).

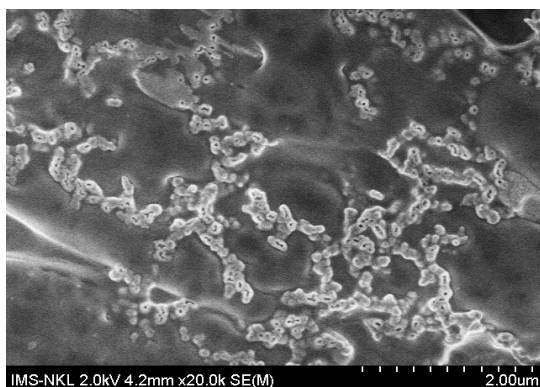
Như vậy sự tác động của nano Fe đã làm lớp vỏ nhày quanh tế bào bị biến đổi dẫn đến một phần polysaccharide thoát ra ngoài dịch nuôi nên hàm lượng polysaccharide bị biến động mạnh ở các nồng độ 100, 250 và 500 ppm.

Ảnh hưởng của nano Cu đến khả năng sinh trưởng và polysaccharide của vi khuẩn *S. fredii* T14

Mức độ sinh trưởng của vi khuẩn *S. fredii* T14 giảm dần khi nồng độ hạt nano Cu tăng: ở nano Cu nồng độ 5, 10 và 25 ppm đã làm giảm sinh trưởng 23, 61 và 68% của chủng ở 32 giờ, ở 24 giờ ở các nồng độ 50, 100, 250 và 500 ppm đều không cho thấy sự sinh trưởng (Hình 5). Hình ảnh tế bào ở độ phóng đại 20.000 lần cho thấy, nhiều thành tế bào vi khuẩn bị thủng (Hình 6), chính điều này đã gây chết tế bào, nên sau 24 giờ không phát hiện thấy sự phát triển của chủng.

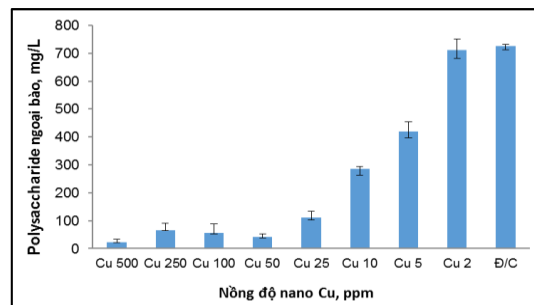


Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ nano Cu đến sinh trưởng của chủng *S. fredii* T14.



Hình 6. Ảnh hưởng của nano Cu ở nồng độ 50 ppm đến hình thái của tế bào vi khuẩn *S. fredii* T14 (x 20.000) sau 24 giờ.

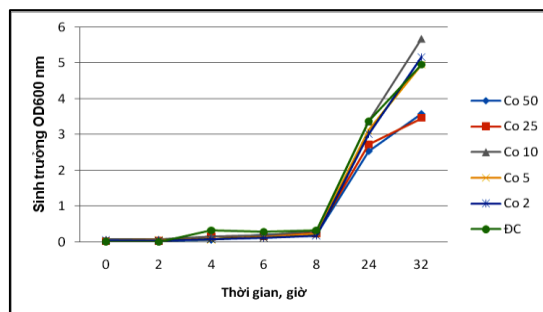
Nano Cu ở nồng độ 2 ppm không ảnh hưởng tới khả năng sinh tổng hợp polysaccharide của vi khuẩn *S. fredii* T14, nano Cu từ 5 - 500 ppm đã làm giảm khả năng sinh tổng hợp polysaccharide, như ở nồng độ từ 25 ppm lượng polysaccharide hầu như không được sinh tổng hợp, do ở nồng độ này chủng vi khuẩn đã không cho thấy sự sinh trưởng (Hình 7).



Hình 7. Ảnh hưởng của nano Cu đến khả năng sinh tổng hợp polysaccharide ngoại bào của chủng *S. fredii* T14 sau 96 giờ nuôi cấy.

Ảnh hưởng của nano kim loại Co đến khả năng sinh trưởng và polysaccharide của chủng *S. fredii* T14

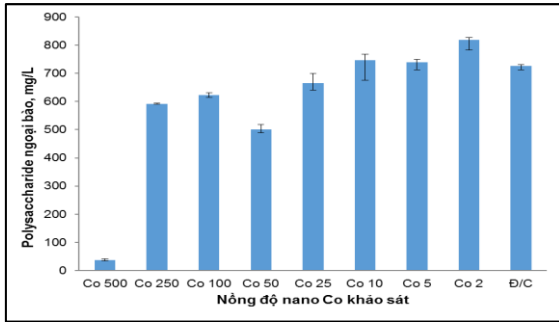
Trong 8 giờ đầu nuôi, chưa nhận rõ tác động của nano đến sinh trưởng của vi khuẩn *S. fredii* T14. Sau 24 giờ và 32 giờ, kết quả cho thấy hạt nano Co ở các nồng độ 2,5 và 10 ppm không ảnh hưởng đến sinh trưởng của chủng vi khuẩn, ở nồng độ 25 và 50 ppm, khả năng sinh trưởng của vi giảm khoảng 20% và ở nồng độ 100, 250 và 500 sinh trưởng giảm lần lượt 25, 26 và 73% so với đối chứng (Hình 8).



Hình 8. Ảnh hưởng của nano Co đến sinh trưởng của chủng *S. fredii* T14.

Ở các nồng độ nano hạt Co 2-10 ppm đều làm tăng khả năng sinh tổng hợp polysaccharide ngoại bào của chủng *S. fredii* T14. Ở nồng độ 100 và 250 ppm không ảnh hưởng đến lượng polysaccharide, tuy nhiên ở nồng độ 500 ppm ức chế mạnh sự sinh trưởng của chủng (giảm 73%) do đó có ảnh hưởng lớn đến hàm lượng polysaccharide tổng hợp.

Các kết quả cho thấy, nên sử dụng nồng độ nano Fe và Co dưới 10 ppm và nano Cu dưới 2 ppm thì phù hợp cho sự sinh trưởng và sinh polysaccharide ngoại bào của chủng *S. fredii* T14.



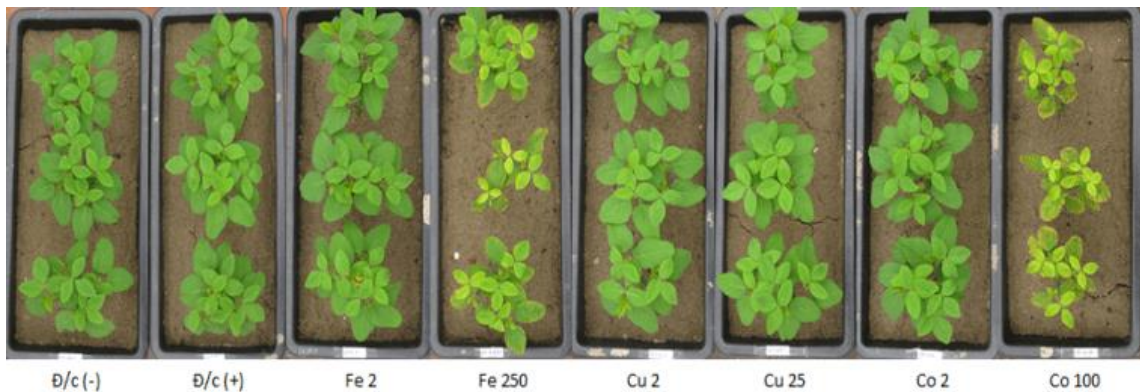
Hình 9. Ảnh hưởng của nano Co đến khả năng sinh tổng hợp polysaccharide ngoại bào của chủng *S. fredii* T14 sau 96 giờ nuôi cấy

Ảnh hưởng của các hạt nano kim loại đến khả năng sinh trưởng *in vitro* của cây đậu tương

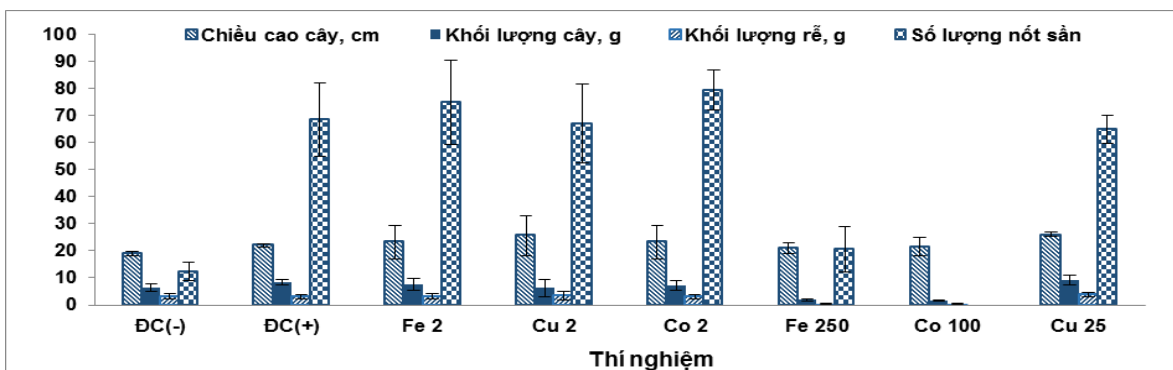
Ảnh hưởng của các nano kim loại Fe, Cu và Co và chủng vi khuẩn *S. fredii* T14 đến sự sinh trưởng và phát triển của cây đậu tương và số lượng nốt sần hình

thành, ở các nồng độ như sau, nano Fe: 2 ppm và 250 ppm; nano Cu: 2 ppm và 25 ppm; nano Co : 2ppm và 100 ppm.

Kết quả ở nano Fe ở nồng độ 250 ppm và Co ở nồng độ 100 ppm ảnh hưởng mạnh đến sinh trưởng của cây đậu tương, cây có hiện tượng vàng và đốm lá, cây còi cọc, trong khi đó ở thí nghiệm có bổ sung vi khuẩn và Fe 2 ppm, Cu 2 ppm và Co 2 ppm, cây có biểu hiện lá phát triển tốt, xanh và cây khỏe (Hình 10). Như vậy, bổ sung nano Fe, Cu và Co ở nồng độ 2 ppm khả năng phát triển của cây tốt hơn về chiều cao, khối lượng cây và khối lượng rễ. Số nốt sần hình thành trên nhiều ở thí nghiệm có bổ sung vi khuẩn *S. fredii* T14, với bộ rễ phát triển và nốt sần nhiều, chứng tỏ vi khuẩn đã cộng sinh với rễ cây đậu để hình thành nốt rễ cố định đạm. Đây là các nốt rễ hữu hiệu với đặc trưng đều có sắc hồng khi giả phẫu. Với Fe ở nồng độ 250 ppm và Co ở nồng độ 100 ppm ảnh hưởng không tốt đến sinh trưởng của cây, lượng nốt sần tạo thành thấp, trung bình là 20 nốt và 0 nốt trên cây.



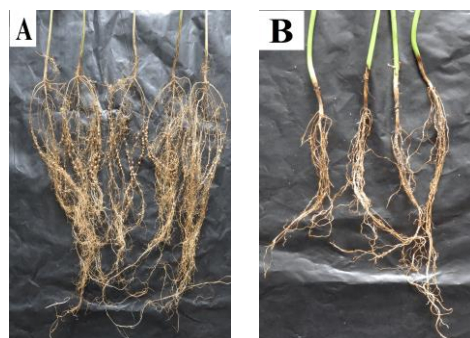
Hình 10. Ảnh hưởng của các nano kim loại đến sinh trưởng của cây đậu tương trong phòng thí nghiệm.



Hình 11. Ảnh hưởng của nano kim loại và vi khuẩn cố định đạm T14 đến sinh trưởng và số lượng nốt sần trên cây đậu tương.



Hình 12. Đậu tương không xử lý nano: không bổ sung vi khuẩn (A), có bổ sung vi khuẩn T14 (B).



Hình 13. Đậu tương xử lý nano Fe 2 ppm (A) và 250 ppm (B)



Hình 14. Đậu tương xử lý nano Cu 2 ppm (A) và 25 ppm (B).



Hình 15. Đậu tương xử lý nano Co 2ppm (A) và 100 ppm (B).

Thông qua các thí nghiệm trên cho thấy nên sử dụng các nano kim loại Fe, Co và Cu ở nồng độ phù hợp 2 ppm sẽ có tác dụng tích cực đến sinh trưởng, tạo nốt sần cố định đạm trên cây đậu tương ĐT26.

Sự hiện diện của các hạt nano trong đất có thể làm giảm tính đa dạng và chức năng của vi sinh vật trong đất. Tuy nhiên, cũng có những nghiên cứu chỉ ra tác động tích cực của NPs đối với cộng đồng vi sinh vật đất. Các tương tác các hạt nano-vi khuẩn phụ thuộc vào điều kiện và nồng độ nano sử dụng. Cấu trúc bề mặt tế bào của *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 khi xử lý với nano TiO₂ ở nồng độ 250 hoặc 750 mg/L phát hiện các vết nứt và nếp nhăn. Nốt sần ở vùng có nano Ag làm mất lớp màng peribacteroid và vi khuẩn nốt rễ bị biến dạng (Tian *et al.*, 2019). Ghafariyan và cộng sự (2013) cho rằng nồng độ thấp của nano Fe giúp tăng đáng kể lượng chất diệp lục trong lá của cây đậu nành. Theo Fan và cộng sự (2014), các suy giảm sự cộng sinh giữa cây họ đậu với *Rhizobium leguminosarum* sau tiếp xúc với nano TiO₂ do sự thay đổi hình thái ở màng ngoài của vi khuẩn, làm thay đổi trong thành phần của polysaccharide thành tế bào. Hiện tại không có đủ bằng chứng liên quan đến sự nhạy cảm của các loài / chủng rhizobial khác nhau đối với các hạt nano, tuy

nhiên, các nghiên cứu so sánh giữa vi khuẩn vùng rễ và các vi khuẩn gợi ý rằng các phản ứng khác biệt có thể xảy ra. Ví dụ, hoạt động kháng khuẩn của các hạt nano ZnO được chứng minh là phụ thuộc vào loài vi sinh vật với *Pseudomonas putida* (ức chế sự phát triển), với vi khuẩn cố định nitơ *Sinorhizobium meliloti* (diệt khuẩn) (Tian *et al.*, 2019). Hiện các bằng chứng về các cơ chế tác động kích thích của NP đối với sự hình thành nốt sần còn ít, nhưng đã có một số suy đoán. Ví dụ, sự phát triển nốt sần được tăng cường ở đậu tương tiếp xúc với các hạt nano mang điện tích dương Fe₃O₄ được cho do chúng cung cấp Fe (Burke *et al.*, 2015) một yếu tố cần thiết cho vi khuẩn cố định N₂ (Brear *et al.*, 2013). Ngoài ra, hạt nano sắt có thể gây tác động vào yếu tố tạo nốt sần và genistein (một isoflavone tiết ra từ rễ chính) điều này làm tăng sự biểu hiện của *Bradyrhizobium japonicum*. Ảnh hưởng của các hạt nano đến *Mycorrhiza* và *Rhizobium* phụ thuộc vào operon YABC được chứng minh là được điều chỉnh bởi các hạt nano Fe₃O₄. Điều này dẫn đến sự cải thiện nốt sần được quan sát thấy trong cộng sinh giữa cây đậu tương và *Bradyrhizobium japonicum* (Ghalamboran, 2011).

KẾT LUẬN

Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học cho

thấy chủng *S. fredii* T14 có khả năng phát triển ở pH 6 - 9, chịu muối đến 2,5% phát triển tốt ở nhiệt độ 37°C, có khả năng chuyển hóa mạnh nitrat thành nitrit và không phân giải gelatine. Ảnh hưởng của các nano kim loại đến sự sinh trưởng của vi khuẩn *S. fredii* T14 tỷ lệ thuận với nồng độ nano sử dụng. Nano Fe và Co < 250 ppm ít ảnh hưởng đến khả năng sinh polysaccharide ngoại bào, trong khi nano Cu ức chế mạnh khả năng sinh polysaccharide của chúng. Bổ sung nano Fe, Cu và Co ở nồng độ 2 ppm giúp kích thích sự sinh trưởng, phát triển của cây đậu tương và số lượng nốt sần hình thành trên rễ. Sắt ở nồng độ 250 ppm và Co 100 ppm làm giảm sự sinh trưởng và hình thành nốt sần.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này nhận được sự hỗ trợ kinh phí từ nhánh số 7 thuộc hợp phần II “Nghiên cứu ứng dụng các chế phẩm nano trong trồng trọt”, MS: VAST.TĐ.NANO.02/15-18 thuộc Dự án trọng điểm cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và trang thiết bị của phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ Sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Afshar RM, Hadi H, Pirzad A (2012) Effect of Nano-ironfoliar application on qualitative and quantitative characteristics of cowpea, under end season drought stress. *Int Res J Appl Basic Sci* 3(8): 1709-1717.
- Aurag J, Sasson A (1992) Tolerance of *Rhizobium leguminosarum* by phaseoli to acidity and drought. *World J Microbiol Biotechnol* 8(5): 532-537.
- Bhatt S, Vyas RV, Shelat HN, Mistry SJ (2013) Isolation, Identification of Root Nodule Bacteria of Mung Bean (*Vigna radiata* L.) for Biofertilizer Production. *Int J Res Pure Appl Microbio* 3: 127-133.
- Brear EM, Day DA, Smith PMC (2013) Iron: an essential micronutrient for the legume-rhizobium symbiosis. *Front Plant Sci* 4:359.
- Burke DJ, Pietrasiak N, Situ SF, Abenojar EC, Porche M, Kraj P, et al. (2015) Iron oxide and titanium dioxide nanoparticle effects on plant performance and root associated microbes. *Int J Mol Sci* 16: 23630–23650.
- Dubois M, Gilles AK, Hamilton KJ, Rebers AP, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350-356.
- Fan RM, Huang YC, Grusak MA, Huang CP, Sherrier DJ (2014) Effects of nano-TiO₂ on the agronomically-relevant *Rhizobium-legume* symbiosis. *Sci Total Environ* 466, 503–512.
- Ghafariyan MH, Malakouti MJ, Dadpour MR, Stroeve P, Mahmoudi M (2013) Effects of magnetite nanoparticles on soybean chlorophyll. *Environ. Sci. Technol* 47: 10645–10652.
- Ghalamboran MR (2011) Symbiotic Nitrogen Fixation Enhancement due to Magnetite Nanoparticles. PhD, EngD and MSc thesis, Cranfield: Cranfield University.
- Hashem FM, Swelim DM, Kuykendall LD, Mohamed AI, Abdel-Wahab SM, Hegazi NI (1998) Identification and characterization of salt and thermotolerant *Leucaena nodulating Rhizobium* strains. *Biol Fertil Soils* 27: 335-341.
- Hunter WJ, Kuykendall LD, Manter DK (2007) *Rhizobium selenireducens* sp. nov.: a selenite reducing alpha Proteobacteria isolated from a bioreactor. *Curr Microbiol* 55: 455-460.
- Kucuk C, Kivanc M, Kinaci E (2006) Characterization of *Rhizobium* sp. Isolated from Bean. *Turk J Biol* 30: 127-132.
- López-Baena FJ, Ruiz-Sainz JE, Rodríguez-Carvajal MA, J.M. Vinardell (2016) Bacterial Molecular Signals in the *Sinorhizobium fredii* - Soybean Symbiosis. *Int J Mol Sci* 17(5):755 (1-22).
- Lu CM, Zhang CY, Wen JQ, Wu GR (2002) Effects of nano material on germination and growth of soybean. *Soybean Sci* 21(3): 168–171.
- Margaret I, Becker A, Blom J, Bonilla I, Goesmann A, Göttfert M, Lloret J, Mittard-Runte V, Rückert C, Ruiz-Sainz JE, Vinardell JM, Weidner S (2011) Symbiotic properties and first analyses of the genomic sequence of the fast growing model strain *Sinorhizobium fredii* HH103 nodulating soybean. *J Biotechnol* 155(1):11-19.
- Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyên và Phạm Văn Ty, (2009), Vi sinh vật học, Nhà xuất bản Giáo dục.
- Phạm Văn Thiệu (2002) Cây đậu tương - Kỹ thuật trồng và chế biến sản phẩm, NXB Nông Nghiệp, Hà Nội.
- Sayyed RZ, Jamadar DD, Patel PR (2011) Production of Exo-polysaccharide by *Rhizobium* sp., *Indian J Microbiol*, 51(3): 294-300.
- Shah V, Belozerova I (2009) Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. *Water Air Soil Pollut* 197: 143–148.
- Siddiqui MH, Al-Whaibi MH, Firoz M, Al-Khaishany MY (2015). Chapter 2: Role of Nanoparticles in Plants. © Springer International Publishing Switzerland, Siddiqui M.H. et al. (eds.), in book: Nanotechnology and Plant Sciences.
- Singh B, Kaur R, Singh K (2008) Characterization of *Rhizobium* strains isolated from roots of *Trigonella foenumgraecum*. *African J Biotechnol* 7(20): 3067-3076.
- Somasegaran P, Hoben HJ (1994) Handbook for *Rhizobia* - Methods in Legume-*Rhizobium* Technology. Springer-

Verlag. New York.

Tian H, Kah M and Kariman K (2019) Are Nanoparticles a Threat to *Mycorrhizal* and *Rhizobial* Symbioses? A Critical Review. *Front Microbiol* 10: 1660.

Vincent JM (1970) A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Blackwell, Oxford.

Zhu H, Han J, Xiao JQ, Jin Y (2008) Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *J Environ Monit* 10(6), 713-717.

EFFECTS OF METAL NANOPARTICLES OF IRON, COPPER AND COBALT ON THE GROWTH OF NITROGEN-FIXING BACTERIUM *SINORHIZOBIUM FREDII* T14 AND NODULATION IN SOYBEAN ROOTS

Phan Thi Hong Thao¹, Đặng Thi Nhung¹, Tran Thi Huong¹, Nguyen Van Hieu¹, Nguyen Thi Hong Lien¹, Nguyen Vu Mai Linh¹, Dao Thi Hong Van², Nguyen Tuong Van¹, Nguyen Hoai Chau³

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Hanoi Open University*

³*Institute of Environmental Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

Soybean is a high valuable crop of Vietnam and many other countries. The ability of soybean plants in nitrogen fixation and soil improvement is attributed to their symbiosis with different rhizobia in the root nodules. It has been well documented that members of genus *Rhizobium* are the most effective in nodulation and nitrogen fixation in legumes. Recently, in order to minimize undesired accumulation of agro-chemicals and metal salts in soil, nanotechnology products have been intensively studied and applied as nanofertilizers. In this report, the effect of nanoparticles of iron, cobalt and copper on the in vitro growth of nitrogen fixing bacterium *Sinorhizobium fredii* T14 and nodulation in the root of soybean DT26 was studied. In the cultures of *S. fredii* T14, nano Fe at the final concentrations of 2, 5, 10, 25 and 50 ppm did not affect the growth, but the latter was reduced of 20, 35 and 46% at 100, 250 and 500 ppm, respectively. No growth inhibition was observed at nano Co concentrations below 10 ppm, while it was reduced of 73% at 500 ppm. Nano Cu seemed to have significant adverse effect on *S. fredii* T14, showing growth inhibition of 23, 68 and 100% at the concentrations of 5, 25 ppm and 50 ppm, respectively. The production of extracellular polysaccharide by *S. fredii* T14 was not affected at the concentrations of nano Fe and Co below 250 ppm, while drastic decrease occurred at the presence of nano Cu. Laboratory experiments showed that nanoparticles of all three studied metals at extremely low concentration of 2 ppm significantly increased the number of effective nodules in the roots of soybean DT26 and enhanced the plant growth.

Keywords: metal nanoparticles, nitrogen-fixing bacteria, *Sinorhizobium fredii* T14, soybean, soybean-nodulation