TUYỂN CHỌN GIỐNG VI SINH VẬT NỘI SINH TỪ VÙNG SINH THÁI ĐẤT PHÈN, HẢI PHÒNG

Nguyễn Thị Minh

Khoa Môi trường, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email:NguyenMinh@vnua.edu.vn

Ngày gửi bài: 05.05.2017 Ngày chấp nhận: 14.06.2017

TÓM TẮT

Nghiên cứu này trình bày kết quả phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn nội sinh có ích cho sinh trưởng thực vật từ vùng sinh thái đất phèn huyện Kiến Thụy, Hải Phòng ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp và bảo vệ môi trường. Các chủng vi khuẩn nội sinh được tuyển chọn thông qua đánh giá khả năng sinh IAA, phân giải lân vô cơ, sinh tổng hợp cellulase, amylase và khả năng thích ứng với pH và nhiệt độ. Từ 120 chủng vi sinh vật nội sinh được phân lập từ các mẫu cây trồng trên vùng sinh thái đất phèn tại Hải Phòng, 8 chủng vi khuẩn nội sinh đã được tuyển chọn bao gồm 2 chủng thuộc chi *Pseudomonas,*3 chủng thuộc *Azospirillum,* 2 chủng thuộc *Burkholderia* và 1 chủng thuộc chi *Klebsiella* có hoạt tính enzyme ngoại bào và khả năng phân giải lân mạnh, khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng cho cây trồng (IAA) cao, thích ứng với pH và nhiệt độ rộng, hứa hẹn tiềm năng ứng dụng trong cải tạo và sử dụng đất phèn.

Từ khóa: Đất phèn, IAA, enzyme thủy phân, phân giải lân, vi sinh vật nội sinh.

Selection of Endophytic Microorganism from Thionic Fluvisols in Hai Phong

ABSTRACT

This research describes the result of isolation and selection of endophytic bacteria which is considered useful for plant growth from the Thionic Fluvisols in Kien Thuy district, Hai Phong for applying in agricultural production and environmental protection. The endophytic microorganisms were selected by assessment of IAA production, inorganic phosphorus solubilizing, cellulase and amylase synthesis and pH and temperature adaptability. Of the 120 strains isolated from plant at Thionic Fluvisols region, 8 endophytic bacteria strains were selected including 2 trains belongs to *Pseudomonas* genus, 3 strains of *Azospirillum*, 2 strains of *Burkholderia* and 1 strain of *Klebsiella* with strong hydrolysis enzymes and phosphorus solubilizing,high ability in plant growth production (IAA), wide pH and temperature adaption. These microorganisms will be promising solutions for using and reclamation of Thionic Fluvisols.

Keywords: Endophytic microorganisms, IAA, hydrolysis enzyme, solubilizing phosphorus, thionic fluvisols soils.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi sinh vật (VSV) nội sinh là VSV sống trong mô thực vật được tìm thấy ở vùng rễ, rễ, thân, lá và quả của thực vật, chúng không gây hại hay cạnh tranh dinh dưỡng với cây chủ; trái lại chúng xúc tiến sự sinh trưởng, phát triển của cây trồng (Zinniel *et al*., 2002). Vi khuẩn nội sinh còn thúc đẩy các quá trình chuyển hóa trong cây cũng như sự phát triển lông rễ một cách mạnh mẽ và giảm sự kéo dài rễ (Harari *et al*., 1988). Vi khuẩn nội sinh thường giúp tăng cường sự sinh trưởng của cây bằng cách tổng hợp kích thích tố auxin (Indol 3 acetic acid - IAA) (Barbieri *et al*., 1986).

Trên thế giới đã có một số chế phẩm sinh học được sản xuất từ vi sinh vật nội sinh cho hiệu quả cao trên cây trồng như dịch phân bón Sumagrowth của Mỹ hay chế phẩm Kurojiru của Nhật đang lưu thông trên thị trường với giá thành rất cao. Ở Việt Nam, một số nghiên cứu đã thực hiện phân lập các dòng vi khuẩn nội

sinh từ cây khóm, xuyến chi hay cỏ chăn nuôi (Nguyễn Thị Thu Hà và cs., 2009; Cao Ngọc Điệp và Nguyễn Ái Chi, 2009; Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Thành Dũng, 2010; Lương Thị Hồng Hiệp và Cao Ngọc Điệp, 2011), tuy nhiên hoạt tính của các chủng vi sinh vật nội sinh này chưa thực sự như mong muốn và cũng chưa được đánh giá đầy đủ. Nghiên cứu phân lập và tuyển chọn giống VSV nội sinh từ vùng sinh thái đất chua mặn nhằm mục đích tuyển chọn được các chủng VSV nội sinh nguồn gốc bản địa có hoạt tính sinh học cao để ứng dụng cho cải tạo và sử dụng loại đất này cũng như phục vụ cho sản xuất nông nghiệp và bảo vệ môi trường.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các loại cây tự nhiên: Rau cải (Brassicaceae), cỏ ba lá (Trifolium), rau lang (Ipomoea batatas), đậu que (Vigna), khoai tây (Solanum tuberosum), chuối lùn (Musa), xuyến chi (Bidens pilosa), đậu tương (Glycine max) và lạc (Arachis hypogaea) trên đất phèn tại Kiến Thụy, Hải Phòng (mang tính chất phèn phát triển trên nền sú vẹt, tập trung ở các vùng gần cửa sông chịu ảnh hưởng của thủy triều, phản ứng của đất khá chua, hàm lượng muối sulfat nhiều). Khu vực đất lấy mẫu có tính chất như sau: pH_{KCl} 5,3; Nts 0,16%; OM 3,09%; P_2O_5 0,1%; P_2O_5 dễ tiêu 1,9 mg/100g đất; K_2O trao đổi 20,8 mg/100g đất, Hàm lượng muối tổng số Cl^- 0,05 và VSV tổng số $1,76\times10^7$.

2.2. Khử trùng mẫu

Mẫu (thân cây, rễ, lá) được rửa sạch dưới vòi nước để loại trừ các VSV có khả năng còn bám ở bề mặt, cắt tách rời thân và lá, tiếp tục rửa lại bằng nước cất vô trùng rồi cắt rễ và thân thành những đoạn nhỏ 1 - 2 cm, làm khô mẫu bằng giấy hút ẩm; sau đó lần lượt khử trùng mẫu bằng cồn 96% trong 3 phút, hypochloride 1% trong 3 phút, hydrogen peroxide 3% trong 3 phút và rửa lại với nước cất vô trùng 4 lần để tẩy rửa các loại hóa chất còn thừa.

Để kiểm tra các VSV còn sót lại trên bề mặt mẫu sau khi khử trùng, lấy 200 µl nước cất vô trùng đã rửa mẫu ở lần thứ 4 (lần cuối) cấy lên các đĩa môi trường Tryptone glucose yeast agar và ủ ở 30^0C, nếu sau 24 giờ ủ các đĩa môi trường này không có sự xuất hiện các khuẩn lạc thì các mẫu đã khử trùng đạt yêu cầu.

2.3. Phân lập chủng giống VSV nội sinh

Các mẫu khử trùng đạt yêu cầu được cho vào các ống nghiệm chứa 10 ml nước cất vô trùng và nghiền mẫu bằng đũa thủy tinh đã khử trùng trên đèn cồn. Lấy 200 µl dịch mẫu nghiền cho vào các ống nghiệm chứa 3 ml môi trường LGI (Cavacante, Dobereiner, 1988), Nfb (Krieg, Dobereiner, 1984) và RMR bán đặc (Elbeltagy *et al.*, 2000) rồi đem ủ ở 30°C trong 2 - 3 ngày, mỗinghiệm thức được lặp lại 3 lần.

Sau 2 - 3 ngày nuôi, quan sát thấy các ống nghiệm chứa các môi trường bán đặc với nhiều dịch chiết của mẫu xuất hiện một lớp màng mỏng cách mặt môi trường khoảng 0,5 cm, đây là chỉ thị có sự hiện diện của vi khuẩn nội sinh. Lấy một ít màng mỏng của các môi trường bán đặc lần lượt cấy chuyển sang các đĩa môi trường đặc khác để tách các khuẩn lạc riêng rẽ. Sau vài lần cấy chuyển trên các môi trường đặc, chọn các khuẩn lạc đơn dòng nằm trên đường cấy quan sát dưới kính hiển vi, làm thuần và giữ giống ở 4°C. Các môi trường sử dụng để phân lập VSV nội sinh bao gồm: LB, MPA, Gause 1, NA, Hansen, LGI, Sabouraud, YMA và MRS.

2.4. Xác định khả năng phân giải cellulose và tinh bột theo phương pháp khuếch tán phóng xạ trên đĩa thạch (Wiliam, 1983)

Sự có mặt của các enzym cellulase, amylase được xác định dựa trên khả năng tạo vòng phân giải được nhuộm màu bằng dung dịch lugol trên đĩa thạch chứa các cơ chất tương ứng là CMC và tinh bột với nồng độ 0,2%. Khả năng phân giải cơ chất được tính bằng hiệu giữa đường kính vòng phân giải và đường kính lỗ thạch.

2.5. Xác định khả năng phân giải lân

Khả năng phân giải lân được xác định dựa trên sự hình thành vòng sáng trong xung quanh khuẩn lạc của các chủng cấy chấm điểm trên

môi trường Pikovaskya. Khả năng phân giải lân được tính bằng hiệu giữa đường kính vòng sáng và đường kính khuẩn lạc VSV.

2.6. Định lượng IAA bằng phương pháp Salkowski

Vi khuẩn được nuôi trong môi trường NA bổ sung 0,1% tryptophan lắc với tốc độ 200 vòng/phút ở nhiệt độ 30^{0}C trong 48 h. Sau đó thu dịch nuôi cấy đem ly tâm với tốc độ 5.500 vòng/phút trong 5 phút.Hút 1 ml dịch trong thu được sau ly tâm cho vào ống nghiệm chứa sẵn 2 ml thuốc thử Salkowski, đối chứng là 1 ml môi trường dịch thể đã ly tâm không nuôi VSV thêm vào 2 ml thuốc thử. Lắc đều, để trong tối 20 phút. So màu trên máy đo quang phổ ở bước sóng 530 nm. Chỉ số OD được đối chiếu với đồ thị chuẩn để tính lượng IAA trong dịch nuôi cấy. Hàm lượng IAA tính theo đơn vị µg/ml.

Xây dựng đồ thị đường chuẩn

Xây dựng đường chuẩn IAA: gồm 10 bình định mức được đánh số theo thứ tự từ 0 đến 10 với bình 0 là bình đối chứng âm (không có IAA), hàm lượng IAA các bình theo thứ tự tăng dần là 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60,70, 80, 90 µg/ml.

Lắc đều các bình sau đó hút từ mỗi bình 1ml dung dịch thêm vào 2 ml thuốc thử Salkowski lần lượt vào các ống nghiệm đánh số từ 0 đến 10. Lắc đều, để trong tối 20 phút. So màu trên máy đo quang phổ ở bước sóng 530 nm. Chỉ số OD được dùng để xây dựng đường chuẩn.

Phương trình đường chuẩn có dạng Y = aX + b, trong đó X là nồng độ của mẫu (µg/ml), Y là độ hấp thụ quang (OD 530 nm). Hàm lượng IAA có trong mẫu được tính theo công thức X = (Y-b)/a.

2.7. Đánh giá khả năng thích ứng pH và nhiệt độ

Đánh giá khả năng thích ứng pH: Bổ sung 10% dung dịch đệm pH (pha bằng Na_2HPO_4 và KH_2PO_4) vào môi trường chuyên tính, đo và chỉnh lại pH, đem hấp khử trùng và đổ vào đĩa petri, cấy VSV tương ứng và đem nuôi ở 28^{o}C, sau đó đếm số lượng khuẩn lạc tạo thành.

Đánh giá khả năng chịu nhiệt của các chủng VSV: Cấy VSV trên từng môi trường chuyên tính tương ứng sau đó đem nuôi ở các mức nhiệt độ khác nhau 20^{o}C, 30^{o}C, 35^{o}C, 40^{o}C và đếm số lượng khuẩn lạc tạo thành.

2.8. Xác định tính đối kháng của chủng giống VSV theo phương pháp cấy vạch

Các chủng giống được đánh giá tính đối kháng theo từng cặp theo phương pháp đường vuông góc Cross-Streak. Nếu xuất hiện sự đối kháng nhau thì không thể phối trộn chúng vào cùng chất mang.

2.9. Phân loại sơ bộ chủng vi sinh vật được tuyển chọn

Các chủng vi sinh vật tuyển chọn được phân loại sơ bộ bằng phương pháp so sánh đặc điểm hình thái và các phản ứng sinh hóa đặc trưng theo khóa phân loại Campbell (1971), Peter (1991) và Bergey's (2009).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả các chủng giống VSV nội sinh được phân lập từ đất phèn

Các chủng giống VSV nội sinh điển hình phân lập từ thân, rễ, lá thực vật trên vùng sinh thái đất phèn tại Kiến Thụy, Hải Phòng được trình bày trong bảng 1.

Kết quả đã phân lập được 120 chủng VSV nội sinh từ 9 loại cây khác nhau trên vùng sinh thái đất phèn Hải Phòng. Đa số các chủng đều thuộc nhóm VSV mọc nhanh trong vòng 24 h, ngoài ra, một số chủng có thời gian mọc chậm hơn (48 h) như: 4RRL1, 4TDQ, 8TC, 8LC, 8RC, YDTg1 và YL1 là 36 h; 12RKT1, 12RKT2 và 12LKT.

Các chủng VSV nội sinh có hình thái khuẩn lạc khác nhau nhưng nhìn chung đa số đều nhày và có dạng vết. Một số chủng có khuẩn lạc dạng khô gồm: 3R14, 3T11, 3LKT2, 3TKT2, 3RKT2, 3RC3, 4LDQ, 4TDQ, 7LDQ1, 7LDQ2, 7TDQ, 7RDQ1, 7RDQ3, 7LKT2, 7TKT1 và 9RDQ4. Màu sắc chủ yếu là trắng đục, trắng

Bảng 1. Kết quả phân lập VSV nội sinh từ vùng sinh thái đất phèn (Hải Phòng)

TT	Ký hiệu giống	Nguồn phân lập	Môi trường	Thời gian sinh trưởng	Hình thái khuẩn lạc
1	3LĐQ2	Đậu que	LB	24	Trắng đục, nhày, dạng vết
2	3RĐQ1	Đậu que	LB	24	Trắng đục, nhày, dạng vết
3	3TKT2	Khoai tây	LB	24	Trắng, khô, nhăn, dạng vết
4	3LC2	Chuối lùn	LB	24	Trắng đục, nhày, bóng, dạng vết
5	3TC2	Chuối lùn	LB	24	Trắng, nhày, dạng vết
6	3RC2	Chuối lùn	LB	24	Trắng, nhày, nhăn, dạng vết
7	3RC3	Chuối lùn	LB	24	Trắng, khô, loang
8	3LXC1	Xuyến Chi	LB	24	Trắng đục, nhày, nhăn, dạng vết
9	3TXC2	Xuyến Chi	LB	24	Trắng, nhày, nhăn, dạng vết
10	3TXC3	Xuyến Chi	LB	24	Trắng, nhày, nhăn, dạng vết
11	3RXC3	Xuyến Chi	LB	24	Trắng, nhày, dạng vết
12	3RXC4	Xuyến Chi	LB	24	Vàng nhạt, nhày, dạng vết
13	4RRL2	Rau lang	MPA	24	Trong, nhày, dạng vết
14	5RDQ	Đậu que	Hansen	24	Vàng nhạt, nhày, bóng, dạng vết
15	5TKT	Khoai tây	Gause 1	24	Vàng, nhày, bóng, dạng vết
16	5RKT	Khoai tây	Gause 1	24	Trắng đục, nhày, dạng vết
17	6LKT	Khoai tây	NA	24	Trong, nhày, dạng vết
18	6TKT	Khoai tây	NA	24	Vàng, nhày, dạng vết
19	6RKT	Khoai tây	NA	24	Trắng, nhày, nhăn, dạng vết
20	6TXC1	Xuyến Chi	NA	24	Trắng, nhày, dạng vết
21	6TXC2	Xuyến Chi	NA	24	Trắng đục, nhày, dạng vết
22	6RXC1	Xuyến Chi	NA	24	Vàng nhạt, nhày, dạng vết
23	7L11	Rau cải	Hansen	24	Trắng, nhày, lồi, bóng,loang
24	7L12	Rau cải	Hansen	24	Trắng, trơn, nhày, lồi, tròn, bong
25	7R12	Rau cải	Hansen	24	Trắng, nhày, lồi, bóng,loang
26	7LRL3	Rau lang	Hansen	24	Vàng, nhày, dạng vết
27	7TĐQ	Đậu que	Hansen	24	Trắng đục, khô, dạng vết
28	7RĐQ3	Đậu que	Hansen	24	Trắng đục, khô, dạng vết
29	7LKT1	Khoai tây	Hansen	24	Vàng, nhày, dạng vết
30	7LKT2	Khoai tây	Hansen	24	Trắng, khô, dạng vết
31	7TKT2	Khoai tây	Hansen	24	Trong, nhày, dạng vết
32	7TKT3	Khoai tây	Hansen	24	Vàng, nhày, lồi, bóng, dạng vết
33	7LC1	Chuối lùn	Hansen	24	Trắng đục, nhày, nhăn, dạng vết
34	7LC2	Chuối lùn	Hansen	24	Trắng, nhày, nhăn, dạng vết
35	7RC2	Chuối lùn	Hansen	24	Vàng, nhày, lồi, bóng, dạng vết
36	7RXC2	Xuyến Chi	Hansen	24	Trắng, nhày, dạng vết
37	8LC	Chuối lùn	LGI	36	Trong, nhày, lồi, bóng, dạng vết
38	8RC	Chuối lùn	LGI	36	Trong, nhày, lồi, bóng, dạng vết
39	12RKT2	Khoai tây	MRS	48	Trắng, nhày, lồi, bóng, dạng vết
40	YDTg2	Đậu tương	YMA	24	Trong, nhày, lồi, bong
41	YL1	Lạc	YMA	36	Trắng, nhày, lồi, bong
42	YLD2	Lạc	YMA	24	Trắng đục, nhày, lồi, bong

Hình 1. Một số chủng vi sinh vật nội sinh được phân lập

trong và vàng. Các mô tả về đặc điểm khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn tương tự cũng được tìm thấy trong nghiên cứu của Cao Ngọc Điệp và Nguyễn Ái Chi (2009).

3.2. Tuyển chọn các chủng giống vi sinh vật nội sinh

3.2.1. Khả năng phân giải cellulose của các chủng VSV nội sinh

Khả năng phân giải cellulose giúp cho VSV dễ xâm nhập vào trong cây sống nội sinh và tương tác với cây trồng. Do đó, đánh giá hoạt tính enzym cellulase là một yếu tố quan trọng để tuyển chọn các chủng VSV nội sinh.

Số liệu bảng 2 cho thấy: 12 chủng có hoạt tính cellulase mạnh nhất gồm: 7 chủng phân lập trên môi trường LB (3TC2, 3RC2, 3RC3, 3TXC2, 3TXC3, 3RXC4, 3TKT2), 1 chủng phân lập trên môi trường Gause 1 (5TKT), 3 chủng phân lập trên môi trường NA (6TXC1, 6TXC2, 6RXC1) và 1 chủng phân lập trên môi trường Hasen (7LKT2) có kích thước vòng phân giải cellulose D ≥ 2,5 cm. Đặc biệt có 6 chủng đạt kích thước vòng phân giải cellulose ≥ 3,8 cm gồm: 3TKT2, 3TC2, 3TXC2, 3TXC3, 3RXC4, 6TXC4 (Hình 2).

Đây là một trong những chỉ tiêu quan trọng để đánh giá VSV nội sinh nhưng hầu hết các nghiên cứu vềVSV nội sinh trước đây chưa quan tâm đánh giá đến khả năng phân giải cellulose này.

3.2.2. Khả năng phân giải và chuyển hóa lân của các chủng VSV nội sinh

Kết quả đánh giá khả năng phân giải lân của các chủng vi sinh vật nội sinh phân lập được cho thấy: 14 chủng có khả năng phân giải lân tốt nhất gồm 3 chủng phân lập trên môi trường LB (3LXC1, 3RXC3, 3LDQ2), 1 chủng phân lập trên môi trường MPA (4RRL2), 2 chủng phân lập trên môi trường Gause1 (5TKT, 5LKT), 2 chủng phân lập trên môi trường NA (6LKT, 6TKT) và 6 chủng phân lập trên môi trường Hansen (7TKT2, 7TKT3, 7L12, 7R12, 7LC1, 7RC2). Các chủng này đều có kích thước vòng phân giải lân D ≥ 0,3 cm (Bảng 3), trong đó 6 chủng có kích thước vòng phân giải lân ≥ 0,4 cm (3RXC3, 6TKT, 6LKT, 4RRL, 3LDQ2, YDTg2), đặc biệt có 2 chủng có kích thước vòng phân giải lớn nhất đạt 0,9 cm là 3RXC3 và YDTg2 (Bảng 2). Kết quả đạt được về khả năng phân giải lân của các chủng VSV nội sinh trong nghiên cứu này có sự tương đồng với nghiên cứu của Đỗ Ngọc Huyền và cs. (1998); Phạm Quang Thu, Lê Khánh Vân (2005). Như vậy, các chủng có khả năng phân giải lân tốt, có tiềm năng ứng dụng trong thực tế.

3.2.3. Khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng (IAA) của các chủng VSV nội sinh

Số liệu bảng2 cho thấy các dòng VSV nội sinh phân lập được có khả năng tổng hợp IAA trong khoảng từ 7,18 - 89,74 µg/ml. Trong đó có 45/120 chủng đạt ≥ 45 µg/ml, chiếm 37,5% tổng số chủng phân lập được. Khả năng tổng hợp IAA của chủng 3LC2 cao nhất đạt 89,74 µg/ml (Bảng 2). Như vậy, tất cả các chủng VSV nội sinh phân lập được trong nghiên cứu này đều có khả năng tổng hợp IAA cao và kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Trần Thanh Phong (2012), cao hơn so với nghiên cứu của Lương Thị Hồng Hiệp và Cao Ngọc Điệp (2009) và Nguyễn Thị Huỳnh Như và cs. (2013).

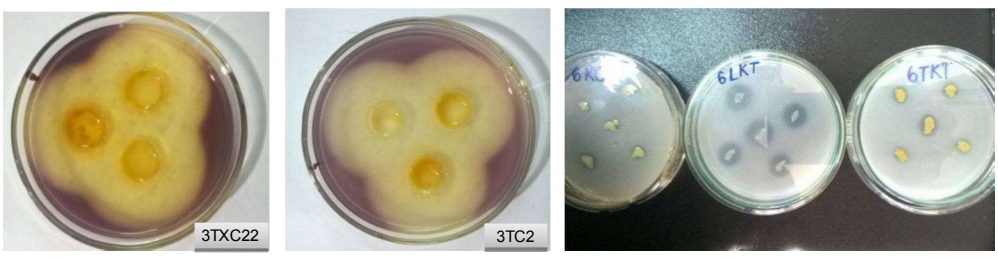
Trên cơ sở đánh giá các chỉ tiêu về khả năng phân giải cellulose, khả năng phân giải và chuyển hóa lân và khả năng sinh IAA, 42 chủngVSV nội sinh thể hiện các hoạt tính khảo sát tốt nhất cho các nghiên cứu tiếp theo (Bảng 3).

Bảng 2. Khả năng phân giải cellulose, lân và sinh chất kích thích sinh trưởng của các chủng vi sinh vật nội sinh

TT	Ký hiệu chủng	Đường kính vòng phân giải (cm)		IAA (µg/ml)	TT	Ký hiệu chủng	Đường kính vòng phân giải (cm)		IAA (µg/ml)
		Cellulose	lân				Cellulose	Lân	
1	3LĐQ2	-	0,5	77,92	22	6RXC1	2,6	-	20,39
2	3RĐQ1	-	0,1	76,217	23	7L11	1,2	-	20,81
3	3TKT2	3,8	0,2	14,87	24	7L12	-	0,3	72,73
4	3LC2	-	0,2	89,74	25	7R12	2,0	0,3	55,27
5	3TC2	3,8	-	19,57	26	7LRL3	-	-	56,73
6	3RC2	2,8	-	27,76	27	7TĐQ	1,2	0,2	46,09
7	3RC3	2,8	-	35,18	28	7RĐQ3	1,5	-	56,00
8	3LXC1	-	0,3	17,53	29	7LKT1	0,9	0,3	79,00
9	3TXC2	3,8	-	18,87	30	7LKT2	2,8	0,2	17,36
10	3TXC3	3,8	-	35,63	31	7TKT2	1,3	0,3	47,88
11	3RXC3	-	0,9	31,45	32	7TKT3	-	0,3	80,28
12	3RXC4	3,8	-	20,58	33	7LC1	1,3	0,3	24,67
13	4RRL2	-	0,4	88,105	34	7LC2	1,3	-	66,64
14	5RDQ	2,0	-	47,73	35	7RC2	2,3	0,3	19,45
15	5TKT	2,8	0,3	22,96	36	7RXC2	-	0,2	70,81
16	5RKT	2,0	0,3	15,43	37	8LC	-	0,3	77,32
17	6LKT	-	0,8	12,88	38	8RC	-	0,1	58,53
18	6TKT	-	0,4	22,96	39	12RKT2	1,5	-	62,24
19	6RKT	-	-	15,44	40	YDTg2	1,0	0,9	57,58
20	6TXC1	2,6	-	17,34	41	YL1	-	-	47,85
21	6TXC2	3,8	-	18,01	42	YLD2	-	-	75,09

Ghi chú:(-): không thể hiện hoạt tính enzyme

Một số chủng tuy không có đủ hoạt tính cao ở cả 3 chỉ tiêu đánh giá nhưng một hoặc hai chỉ tiêu còn lại của chúng thuộc mức cao nhất nên vẫn được lựa chọn để phục vụ nghiên cứu, trong đó: các chủng 3TKT2, 3TC2, 3TXC2, 3TXC3, 3RXC4, 6TXC2 có khả năng phân giải cellulose rất mạnh (vòng phân giải = 3,8 cm); các chủng 3RXC3, 6LKT, YDTg2 có khả năng phân giải lân cao nhất (0,8 - 0,9 cm).Một số chủng có hoạt tính cao ở cả khả năng phân giải lân và khả năng sinh IAA bao gồm: 3LDQ2, 3LC2, 4RRL2, 7L12, 7TKT3, 7RXC2 và 8LC (khả năng phân giải lân từ 0,2 - 0,5 cm và khả năng sinh IAA từ 70,81 - 89,74 µg/ml).Các chủng thể hiện cả 3 hoạt tính khá cao gồm có: 3TKT1, 3TKT2, 5TKT, 7R12, 7LKT1, 7TKT2 và YDTg2.



Hình 2. Vòng phân giải cellulose (trái) và phân giải lân (phải) của một số chủng VSV

3.2.4. Khả năng phân giải tinh bột

Việc ứng dụng những dòng vi khuẩn có khả năng chuyên biệt để hoàn thiện công nghệ sản xuất chế phẩm sinh học đang chiếm một vai trò vô cùng quan trọng. Vì vậy, việc nghiên cứu, phân lập các vi khuẩn có khả năng tiết ra amylase là một việc làm rất thiết thực và mang tính ứng dụng cao (Nguyễn Hữu Hiệp và cs., 2012).

Kết quả khảo sát khả năng phân giải tinh bột chỉ rõ 10 chủng VSV nội sinh thể hiện hoạt tính amylase mạnh nhất gồm có: 3TXC3, 3RXC3, 3TKT2, 3LC2, 3TC2, 3RC2, 3LDQ2,4RRL2, 7R12, 8LC và YLD2. Các chủng này có kích thước vòng phân giải tinh bột D ≥ 2,0 cm (Bảng 3). So với các chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy tinh bột được phân lập bởi Nguyễn Hữu Hiệp và cs. (2012), hoạt tính enzym phân giải tinh bột của các chủng này có sự tương đồng rõ rệt.

3.2.5. Khả năng thích ứng pH

Nhiều nghiên cứu đã khẳng định chủng vi sinh vật nào có khả năng thích ứng pH rộng thì chủng đó sẽ sinh trưởng và phát huy tác dụng tốt ở nhiều vùng sinh thái khác nhau. Đây là một trong những chỉ tiêu quan trọng để đánh giá và tuyển chọn các chủng giống VSV có hoạt tính cao đáp ứng mục đích nghiên cứu.

Số liệu bảng 4 cho thấy các chủng VSV nghiên cứu có khả năng thích ứng ở các mức pH khác nhau. Hầu hết các chủng VSV đều phát triển tốt trên môi trường pH trung tính (pH = 6 - 7), kém phát triển trên môi trường axit yếu hoặc kiềm yếu và phát triển kém nhất trên môi trường kiềm (pH = 9). Các chủng 3TXC2, 3RXC4, 3RC2, 4RRL2, 6TKT và 6RKT phát triển tốt trên môi trường trung tính và môi trường kiềm nhẹ, ở môi trường axit kém phát

Bảng 3. Khả năng phân giải tinh bột của các chủng VSV nội sinh

TT	Ký hiệu chủng	Vòng PG tinh bột (cm)	TT	Ký hiệu chủng	Vòng PG tinh bột (cm)
1	3LXC1	-	22	6LKT	0,2
2	3TXC2	-	23	7LRL3	-
3	3TXC3	2,0	24	7RXC2	1,0
4	3RXC3	2,5	25	7TDQ	-
5	3RXC4	-	26	7RDQ3	-
6	3LDQ2	2,5	27	7TKT2	-
7	3RDQ1	-	28	7TKT3	-
8	3TKT2	2,0	29	7LKT1	0,2
9	3LC2	2,4	30	7LKT2	0,5
10	3TC2	2,5	31	7L11	-
11	3RC2	3,0	32	7L12	0,2
12	3RC3	-	33	7R12	2,0
13	4RRL2	2,5	34	7LC1	-
14	5RDQ	-	35	7LC2	-
15	5TKT	1,5	36	7RC2	-
16	5RKT	-	37	8LC	2,0
17	6TXC1	0,2	38	8RC	-
18	6TXC2	-	39	12RKT2	-
19	6RXC1	-	40	YDTg2	0,4
20	6TKT	-	41	YL1	
21	6RKT	-	42	YLD2	2,8

Ghi chú: (-): không thể hiện hoạt tính enzyme

Bảng 4. Khả năng thích ứng pH của các chủng VSV nội sinh

TT	Ký hiệu chủng	Số lượng khuẩn lạc (x 10^7 CFU/ml)				
		pH= 5	pH= 6	pH= 7	pH= 8	pH= 9
1	3LXC1	-	0,01	0,02	-	-
2	3TXC2	0,01	1,07	31,10	10,06	-
3	3TXC3	10,17	30,05	76,03	59,26	47,88
4	3RXC3	106,56	112,20	137,12	51,52	29,34
5	3RXC4	0,01	0,07	31,84	17,71	-
6	3LDQ2	46,41	47,65	66,85	47,29	45,2
7	3RDQ1	0,02	26,61	43,66	-	-
8	3TKT2	34,42	98,45	99,21	90,62	88,26
9	3LC2	56,45	78,87	99,80	83,86	82,41
10	3TC2	44,67	56,43	96,07	83,88	82,49
11	3RC2	1,71	9,69	66,14	65,89	52,36
12	3RC3	0,01	0,05	25,07	20,96	-
13	4RRL2	-	4,02	6,20	4,10	0,01
14	5RDQ	0,01	0,80	1,09	0,08	0,01
15	5TKT	0,01	0,07	0,10	-	-
16	5RKT	0,01	0,01	0,02	0,01	-
17	6TXC1	0,03	0,03	1,69	1,09	-
18	6TXC2	-	0,01	0,51	0,40	0,10
19	6RXC1	0,02	0,05	0,09	0,01	-
20	6TKT	0,02	4,95	51,94	41,70	10,01
21	6RKT	0,02	0,09	6,93	3,73	0,59
22	6LKT	-	0,01	0,05	-	-
23	7LRL3	0,03	1,29	0,98	0,09	-
24	7RXC2	-	0,21	0,14	-	-
25	7TDQ	0,13	1,78	0,09	0,01	-
26	7RDQ3	3,66	5,37	10,15	-	-
27	7TKT2	0,01	0,03	0,02	0,01	-
28	7TKT3	9,21	79,24	59,30	20,10	10,20
29	7LKT1	0,03	0,35	0,21	0,20	0,04
30	7LKT2	1,98	9,45	8,90	0,05	0,02
31	7L11	10,47	60,98	40,10	-	-
32	7L12	2,09	4,98	3,29	1,40	0,09
33	7R12	-	1,05	0,86	-	-
34	7LC1	20,38	54,67	45,90	2,95	-
35	7LC2	0,01	0,04	0,10	0,01	-
36	7RC2	1,65	11,09	10,10	5,14	0,01
3 7	8LC	0,09	2,91	1,57	0,39	0,21
38	8RC	1,43	5,32	3,98	0,98	-
39	12RKT2	15,99	52,09	91,93	80,39	45,63
40	YDTg2	0,01	1,90	1,67	0,06	-
41	YL1	0,02	0,03	0,05	0,01	-
42	YLD2	38,79	50,07	79,98	60,43	30,17

Ghi chú: (-): không thể hiện khả năng thích ứng pH

Hình 4. Khả năng thích ứng pH của chủng 3RC3

triển hơn. 10 chủng 3TXC3, 3LDQ2, 3RXC3, 3TKT2, 3TC2, 3LC2, 3LDQ2, YLD2, 7TKT3 và 12RKT2 có khả năng phát triển mạnh ở tất cả các mức pH khác nhau.

Như vậy, khả năng thích ứng của các chủng VSV nội sinh trong nghiên cứu này là tương đối rộng trong khoảng pH từ 5 - 8. Kết quả thí nghiệm này cũng phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Văn Giang, Trần Thị Đào, Trịnh Thị Thúy An (2016) đã nghiên cứu và nhận thấy VSV nội sinh hoạt động trong một phạm vi pH khá rộng.

3.2.6. Đánh giá khả năng thích ứng nhiệt độ

Số liệu khảo sát cho thấy: Các chủng VSV khác nhau có khoảng nhiệt độ thích hợp khác nhau. Hầu hết các chủng sinh trưởng và phát triển tốt trong khoảng nhiệt độ từ 30 - 40°C, trong đó nhiệt độ tối ưu là 30°C. Các chủng có tính chịu nhiệt cao gồm: 3RXC3, 3RC2, 3TKT2, 3TC2, 3LC2, 3TXC3, 3LDQ2, 6TXC1 và YLD2. Trong đó, chủng 3LC2 được đánh giá có tính chịu nhiệt cao nhất, đạt 3,69 - 9,86.10^8 CFU/ml (Bảng 5).

3.2.7. Tính đối kháng của các chủng giống tuyển chọn

Tổng hợp các kết quả đánh giá các hoạt tính sinh học của các chủng VSV nội sinh đã phân lập được, nghiên cứu này chọn được 8 chủng 3RXC3, 3RC2, 3TKT2, 3TC2, 3LC2, 3TXC3, 3LDQ2 và YLD2 (Hình 5) vừa có hoạt tính enzyme ngoại bào mạnh, khả năng phân giải lân và khả năng sinh IAA cao, thích ứng pH và nhiệt độrộng phục vụ cho sản xuất chế phẩm dinh dưỡng vi sinh đa chức năng bón cho cây trồng.

Các chủng VSV tuyển chọn để làm chế phẩm dinh dưỡng vi sinh phải có tính độc lập về sinh trưởng, không đối kháng hay ức chế nhau. Kết quả khảo sát tính đối kháng giữa các chủng VSV tuyển chọn cho thấy không xuất hiện vòng đối kháng, do đócó thể phối trộn chúng trong cùng một loại chất mang.

3.2.8. Định danh sơ bộ các chủng giống đã tuyển chọn

Phân loại các chủng vi sinh vật bằng phương pháp so sánh đặc điểm hình thái và các phản ứng sinh hóa đặc trưng theo khóa phân loại Bergay's (2009) gồm có 2 chủng thuộc chi *Pseudomonas, 3 chủng* thuộc *Azospirillum, 2 chủng* thuộc *Burkholderia* và 1 chủng thuộc chi *Klebsiella.* Nhìn chung, các chủng tuyển chọn đều có hoạt tính enzyme ngoại bào mạnh, khả năng phân giải lân và sinh chất kích thích sinh trưởng cao, thích ứng pH và nhiệt độ rộng nên có tiềm năng ứng dụng để sản xuất chế phẩm sinh học (Bảng 6).

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Trên cơ sở 120 chủng vi sinh vật nội sinh được phân lập từ các mẫu cây trồng trên vùng sinh thái đất phèn tại Hải Phòng đã tuyển chọn được 8 chủng bao gồm 2 chủng thuộc chi *Pseudomonas, 3 chủng* thuộc *Azospirillum, 2 chủng* thuộc *Burkholderia* và 1 chủng thuộc chi *Klebsiella* có hoạt tính enzyme ngoại bào (vòng phân giải cellulose > 3,0 cm, phân giải tinh bột > 2 cm) và khả năng phân giải lân mạnh (vòng phân giải đạt 0,2 - 0,9 cm), khả năng sinh chất

Bảng 5. Khả năng thích ứng nhiệt độ của các chủng VSV nội sinh

TT	Ký hiệu chủng	Số lượng khuẩn lạc (x10^7 CFU/ml)			
		20°C	30°C	35°C	40°C
1	3LXC1	0,01	0,02	0,04	-
2	3TXC2	10,69	31,10	-	-
3	3TXC3	32,21	76,03	49,13	38,25
4	3RXC3	48,45	137,12	100,89	58,36
5	3RXC4	-	31,84	1,22	1,87
6	3LDQ2	39,12	66,85	59,01	48,92
7	3RDQ1	10,01	43,66	0,57	0,02
8	3TKT2	52,64	99,21	30,69	28,83
9	3LC2	36,88	99,80	98,61	83,69
10	3TC2	55,34	96,07	87,83	67,20
11	3RC2	62,36	66,14	12,48	91,20
12	3RC3	0,02	0,07	0,01	-
13	4RRL2	0,90	7,27	0,19	-
14	5RDQ	0,01	0,04	0,03	0,01
15	5TKT	0,05	0,17	0,10	-
16	5RKT	0,01	0,30	0,03	0,05
17	6TXC1	20,12	51,69	31,89	13,06
18	6TXC2	0,02	0,51	0,03	0,01
19	6RXC1	0,01	0,09	-	-
20	6TKT	13,41	51,94	3,94	0,01
21	6RKT	1,04	6,93	3,84	0,17
22	6LKT	0,01	0,05	-	-
23	7LRL3	1,01	1,29	-	-
24	7RXC2	0,13	0,21	0,09	0,07
25	7TDQ	1,56	1,78	0,03	-
26	7RDQ3	0,01	5,37	-	-
27	7TKT2	-	0,03	0,01	-
28	7TKT3	30,57	79,24	34,01	0,08
29	7LKT1	0,21	0,35	0,11	-
30	7LKT2	3,42	9,45	7,66	0,74
31	7L11	10,67	60,98	27,91	1,62
32	7L12	1,95	4,98	0,04	-
33	7R12	0,09	1,05	0,02	0,01
34	7LC1	29,81	54,67	7,31	0,67
35	7LC2	0,01	0,04	0,04	0,03
36	7RC2	1,03	11,09	3,19	0,01
3 7	8LC	0,07	2,91	1,40	1,14
38	8RC	1,02	5,32	0,90	0,03
39	12RKT2	10,20	52,09	0,04	-
40	YDTg2	0,01	1,67	-	-
41	YL1	-	0,05	0,03	-
42	YLD2	20,90	79,98	69,94	45,52

Ghi chú: (-): không hình thành khuẩn lạc

Hình 5. Tính đối kháng (trái) và các chủng tuyển chọn (phải)

Bảng 6. Đặc điểm sinh học của các chủng VSV nội sinh được tuyển chọn

Kí hiệu	Vòng phân giải (cm)			IAA	Thích ứng		Đặc điểm sinh học	Phân loại sơ bộ
	Cellulose	Lân	Tinh bột	(µg/ml)	pH	t(^{o}C)		
3RXC3	-	0,9	2,5	31,45	5 - 9	20 - 40	KL màu trắng, Gram âm, hình que, có tiên mao ở cực.	*Pseudomonas 3RXC3*
3RC2	3,0	-	3,0	35,18	5 - 9	20 - 40	KL màu trắng, Gram âm, có khả năng chuyển động và có dạng hình que ngắn	*Azospirillum 3RC2*
3TKT2	3,8	0,2	2,0	14,87	5 - 9	20 - 40	KL màu trắng, Gram âm, hình que, có tiên mao ở cực	*Pseudomonas 3TKT2*
3TC2	3,8	-	2,5	19,57	5 - 9	20 - 40	KL màu trắng, Gram âm, có khả năng chuyển động và có dạng hình que ngắn	*Azospirillum 3TC2*
3LC2	-	0,2	2,5	89,74	5 - 9	20 - 40	KL màu trắng, đục, Gram âm, tế bào hình que, có khả năng di chuyển	*Klebsiella*3LC2
3TXC3	3,8	-	2,0	35,63	5 - 9	20 - 40	KL màu trắng, Gram âm, dạng que ngắn, có thể di chuyển nhờ tiên mao ở đầu.	*Burkholderia 3TXC3*
3LDQ2	-	0,5	2,5	77,92	5 - 9	20 - 40	KL màu đục, Gram âm, dạng que ngắn, có thể di chuyển nhờ tiên mao ở đầu.	*Burkholderia 3LDQ2*
YLD2	-	-	2,8	45,09	5 - 9	20 - 40	KL trắng đục, KL màu trắng, Gram âm, có khả năng chuyển động và có dạng hình que ngắn	*Azospirillum YLD2*

Ghi chú: (-): không thể hiện hoạt tính enzyme,KL: khuẩn lạc.

kích thích sinh trưởng cho cây trồng cao (IAA > 14,87 µg/ml), thích ứng với pH và nhiệt độ rộng (pH 5 - 9, 28 - 40^{0}C), có triển vọng ứng dụng trong cải tạo và sử dụng đất phèn.

4.2. Kiến nghị

Nghiên cứu sâu hơn các chủng vi sinh vật nội sinh đã được tuyển chọn để sản xuất chế phẩm sinh học phục vụ cho cải tạo và sử dụng đất phèn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Barbieri, P., Zanelli, T., Galli, E., and Zanetti, G. (1986). Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense Sp*6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. FEMS Microbiol. Lett., 36: 87-90.

Bergey (2009). Bergay manual's of systermatic Bacteriology. Second edition. William B. Whitman. Springer, USA, pp. 19-21.

Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Thành Dũng (2010). Đặc tính vi khuẩn nội sinh phân lập trong cây khóm trồng trên đất phèn Vĩnh Thuận, tỉnh Kiên Giang. Tạp chí Khoa học, Trường đại học Cần Thơ, 15a: 54-63

Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Ái Chi (2009). Phân lập và đặc tính của vi khuẩn nội sinh trong cây Khóm trồng trên đất phèn huyện Bến Lức, tỉnh Long An, Việt Nam. Tuyển tập công trình nghiên cứu của hội nghị Công nghệ sinh học năm 2009 tổ chức tại thành phố Hồ Chí Minh, 23-24, tháng 10 năm 2009.

Cavalcante, V.A and J. Dobereiner (1988). A new acid-tolerant nitrogen-Fixing bacterium associated with sugarcane. Plant soil, 108: 23-31.

Campbell I. (1971). Comparison of Serological and Physiological Classification of the Genus Saccharomyces, Journal of General Microbiology, 63: 189-198.

Elbeltagy A, K Nishioka, H Suzuki, T Sato,YI Sato, H Morisaki, H Mitsui and K Minamisawa (2000). Isolation and characterization of endophysic bacteria from wild anhd traditionally cultirated rice varieties, Soil Sci, Plant Nut, 46: 617-629.

Đỗ Ngọc Huyền và cs. (1998). Tuyển chọn vi sinh vật phân giải lân có hoạt tính cao để sản xuất chế phẩm phân lân vi sinh, Báo cáo đề tài Khoa học Công nghệ 02-06-04, Viện Công nghệ sau thu hoạch, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn.

Nguyễn Thị Thu Hà, Hà Thanh Toàn và Cao Ngọc Điệp (2009). Phân lập và đặc tính các dòng vi khuẩn nội sinh trong một số cây cỏ chăn nuôi. Tạp chí Công nghệ sinh học, 7(2): 241-250.

Harari, A., Kigel, J., and Okon, Y. (1988). Involvement of IAA in the interaction between *Azospirillum brasilense* and *Panicum miliaceum* roots. Plant Soil, 110: 275-282.

Hà Thanh Toàn, Mai Thu Thảo, Nguyễn Thu Phướng, Trần Lê Kim Ngân, Bùi Thế Vinh và Cao Ngọc Điệp (2008). Phân lập vi khuẩn phân giải cellulose, tinh bột và protein trong nước rỉ rác ở thành phố Cần Thơ. Tạp chí Khoa học, 10: 195-202.

Krieg, N. R and R. Dobereiner (1984). Genus Azospirillum Tarrand Krieg and Dobereiner 1979, 79 AL (effective publication: Tarrand, Krieg and Dijbereiner 1978, 978). In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1: 94-104.

Lương Thị Hồng Hiệp và Cao Ngọc Điệp (2011). Phân lập và nhận diện vi khuẩn nội sinh trong cúc xuyến chi (*Wedelia Trilobata* (L.) Hitche) bằng kỹ thuật PCR. Tạp chí khoa học, Trường đại học Cần Thơ, 18a: 168-176.

Nguyễn Hữu Hiệp và Nguyễn Thị Hải Lý (2012). Phân lập các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy tinh bột. Tạp chí Khoa học, Trường đại học Cần Thơ, 21a: 37-44.

Nguyễn Thị Huỳnh Như, Nguyễn Hữu Hiệp, Nguyễn Minh Đời, Trần Nguyễn Nhật Khoa, Thái Trần Phương Minh (2013). Phân lập các dòng vi khuẩn nội sinh có khả năng tổng hợp IAA và cố định đạm trên cây chuối. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học, 27: 24-31.

Nguyễn Văn Giang, Trần Thị Đào, Trịnh Thị Thúy An (2016). Phân lập và đánh giá đặc điểm sinh học của một số chủng vi khuẩn nội sinh từ rễ cây nha đam (Aoe vera). Tạp chí khoa học Nông nghiệp Việt Nam, 14(5): 772-778.

Peter Kampfer, Reiner M. Kroppensted and Wolfgang Dott E (1991). A numerical classification of the genera Streptomyces and Streptoverticillium using miniaturized physiological tests, Journal of General Microbiology, 137: 1831-1891.

Phạm Quang Thu, Lê Khánh Vân (2005), Bước đầu tuyển chọn vi sinh vật phân giải phốt phát khó tan để sản xuất phân vi sinh phục vụ cho Lâm nghiệp, đề tài KHCN 02-06 Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

Trần Thanh Phong (2012). "Đánh giá khả năng cố định đạm của vi khuẩn nội sinh đến năng suất và chất lượng của trái khóm trồng tại huyện Tân Phước, tỉnh Tiền Giang". Truy cập ngày 4/5/2016 tại http://gs.ctu.edu.vn/tomtat_LATS/VSVH_TTPhong.pdf.

Zinniel DK, P Lambrecht, NB Harris, Z Feng, D Kuczmarski, P Higley, CA Ishimaru, A Arunakumari, RG Barletta and AK Vidaver (2002). Isolation andcharacterization of endophytic colonizingbacteria from agronomic crops and prairieplants. Appl. Environ. Microbiol., 68: 2198-2208.