

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI SINH VẬT NỘI SINH TỪ VÙNG SINH THÁI ĐẤT MẶN HUYỆN GIAO THỦY, TỈNH NAM ĐỊNH

Nguyễn Thị Minh*, Đỗ Minh Thu

Khoa Môi trường, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email: NguyenMinh@vnua.edu.vn*

Ngày gửi bài: 29.05.2017

Ngày chấp nhận: 12.09.2017

TÓM TẮT

Bài báo trình bày kết quả phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn nội sinh thông qua khả năng sinh IAA, phân giải photpho vô cơ và sinh tổng hợp xenlulaza và amylaza cao. Trên cơ sở 159 chủng vi khuẩn phân lập được từ thực vật trên vùng sinh thái đất mặn (huyện Giao Thủy, Nam Định), 8 chủng vi khuẩn nội sinh (3TDG1, 3TDG4, 3TDG5, 3LSH1, 6LXL3, 6TSH3, 8TDX và YDT3) có đặc tính tốt đã được tuyển chọn với hàm lượng IAA sinh ra đạt 30,08 - 278,55 µg/ml; vòng phân giải xenlulo > 2,2 cm, phân giải lân đạt 0,4 - 1,5 cm và vòng phân giải tinh bột > 0,5 cm. Các chủng đều có khả năng thích ứng nhiệt độ và pH rộng (20 - 40°C, pH = 5 - 9). Chế phẩm dinh dưỡng vi sinh sản xuất từ các chủng vi khuẩn tuyển chọn có tác dụng làm tăng năng suất cây mồng tơi 86,24% so với công thức chỉ dùng phân bón vô cơ.

Từ khóa: Chế phẩm dinh dưỡng vi sinh, đất mặn, IAA, phân giải lân, vi sinh vật nội sinh.

Research on Isolation and Selection of Endophytic Microorganism from Saline Soil In Giao Thuy, Nam Dinh

ABSTRACT

This paper present the isolated and selected result of the endophytic microorganisms by their ability to produce IAA, solubilize inorganic phosphorus and high cellulase and amylase synthesis. Based on 159 bacterial isolates from plants in the saline soil ecosystem (Giao Thuy district, Nam Dinh province), 8 bacterial strains with good characteristics were selected (with IAA content of 30.08 - 278.55 µg/ml; cellulose degraded diameter > 2.2 cm, 0.4 - 1.5 cm phosphorous solubilizing and starch degraded diameter > 0.5 cm) and all are high ability in temperature and pH adaptation (20-40°C, pH = 5-9). The microbial nutrition product produced from selected strains had an effect of increasing the yield of *Basella alba* L by 86.24% compared with the inorganic fertilizer formula.

Keywords: Microbial nutrition product, saline soils, IAA, phosphorus solubilizing, endophytic microorganisms.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi sinh vật nội sinh đã được chứng minh có nhiều tác động tích cực đến cây chủ, bao gồm các hoạt tính kích thích sinh trưởng, điều hòa hoạt động trao đổi chất và các tín hiệu của chất điều tiết sinh trưởng thực vật nhằm thích nghi với các điều kiện bất lợi của môi trường (Miliute *et al.*, 2015). Trên thế giới, các chế phẩm từ vi khuẩn nội sinh đã được đưa vào ứng dụng trên nhiều cây trồng khác nhau. Một số chế phẩm

dinh dưỡng vi sinh của nước ngoài sử dụng vi sinh vật nội sinh như Sumagrow của Mỹ có tác dụng làm tăng năng suất cây trồng đến 200% (Surmagrowth organization, 2014) và cải tạo được đất có vấn đề như đất bị xâm ngập mặn hiện đang lưu thông trên thị trường với giá thành rất cao. Tuy nhiên, hiện nay các nghiên cứu này ở Việt Nam vẫn còn hạn chế, đặc biệt là những chủng vi sinh vật nội sinh phát huy tốt hiệu quả trên nhiều loại cây trồng ở các điều kiện sinh thái bất lợi như vùng đất mặn. Một số

ngiên cứu về phân lập vi sinh vật nội sinh đã được thực hiện ở Việt Nam nhưng hoạt tính sinh học của chúng vẫn chưa được như mong muốn và cũng chưa được đánh giá đầy đủ. Mặt khác, Việt Nam vẫn chưa có sản phẩm thương mại nào từ vi sinh vật nội sinh có tính năng và hiệu quả tương tự như sản phẩm nhập khẩu.

Nam Định là một trong những tỉnh chịu sự tác động mạnh mẽ của hiện tượng xâm nhiễm mặn do mực nước biển dâng cao, thu hẹp diện tích đất trồng cây lương thực và thực phẩm. Diện tích đất mặn ở Nam Định là 21.241 ha, chiếm 12,85% diện tích tự nhiên của tỉnh (Trần Thị Giang Hương và cs., 2015). Đất nhiễm mặn là một trong những yếu tố gây khó khăn cho sự sinh trưởng và phát triển của nhiều loại cây trồng. Tuy nhiên, vùng sinh thái đất mặn tại Nam Định lại có mức độ đa dạng về thành phần loài khá cao do các loại cây trồng và sinh vật ở đây đã hình thành được đặc tính thích nghi với môi trường mặn. Vì vậy, nghiên cứu được tiến hành với mục đích tuyển chọn được các chủng vi sinh vật nội sinh từ đất mặn Nam Định, có tác dụng phân giải và chuyển hóa chất hữu cơ tạo dinh dưỡng dễ tiêu, sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật giúp tăng cường sự sinh trưởng phát triển của cây trồng và chống chịu cao với điều kiện bất lợi của môi trường, đặc biệt trong điều kiện biến đổi khí hậu đang xảy ra mạnh mẽ. Hơn nữa, nghiên cứu nhằm sản xuất được chế phẩm dinh dưỡng vi sinh phù hợp cho phục hồi và sử dụng đất mặn và có tiềm năng cạnh tranh với sản phẩm của nước ngoài với các chủng vi khuẩn tuyển chọn.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Mẫu cây trồng phổ biến trên vùng đất mặn xã Giao Thiện, huyện Giao Thủy, tỉnh Nam Định gồm: ngô (*Zea mays L.*), xà lách (*Lactuca sativa*), diên thanh (*Sesbania sesban*), xuyên chi (*Bidens pilosa*), cỏ gấu biển (*Cyperus stoloniferus Retz*), sài hồ (*Pluchea pteropoda Hemsl.*), mắm biển (*Avicennia marina*), rau dệu (*Alternanthera sesilis*), dương xỉ (*Cyclosorus parasiticus*), dền quánh (*Ceriops decandra*), dền

gai (*Amaranthus spinosus*), sù (*Aegiceras corniculatum (L.) Blanco*) và vẹt (*Bruguiera gymnorrhiza*).

- Dịch dinh dưỡng từ xử lý phế thải chăn nuôi lợn dạng lỏng qua hệ thống thiết bị UASB (kết quả của đề tài nghiên cứu T2015-04-05TĐ của Học viện Nông nghiệp Việt Nam) có tính chất như sau: pH 7,5; OM 9,15%; N tổng số 1,77%; P₂O₅ 0,057% và K₂O 3,93%.

- Hạt giống rau mồng tơi do công ty Tre Việt cung cấp.

2.2. Phương pháp tiến hành

2.2.1. Phân lập vi sinh vật nội sinh

Mẫu cây trồng rễ, thân và lá được rửa sạch và cắt thành những đoạn nhỏ 1 - 2 cm. Các đoạn này được khử trùng theo thứ tự trong cồn 96% 3 phút, hypochloride 1% 3 phút, hydrogen peroxide 3% 3 phút và rửa lại với nước cất vô trùng 4 lần. Sau khi khử trùng, mẫu được nghiền nhỏ trong nước cất vô trùng. 200 µl dịch nghiền của mẫu được cho vào các ống nghiệm chứa 3ml môi trường NA bán đặc rồi đem ủ ở 30°C. Sau 48 giờ (h), lớp màng mỏng gần bề mặt môi trường xuất hiện thì chúng ta có sự hiện diện của vi sinh vật nội sinh trong dịch chiết mẫu. Lấy một ít màng mỏng của các môi trường bán đặc để tách dòng vi khuẩn. Các môi trường phân lập vi sinh vật nội sinh bao gồm YMA, CA, LB, MPA, NA, Hansen và LGI. Các dòng vi khuẩn thuần nhất được bảo quản trong ống thạch nghiêng ở nhiệt độ 4°C.

2.2.2. Xác định khả năng phân giải xenlulo và tinh bột theo phương pháp khuếch tán phóng xạ trên đĩa thạch

Sự có mặt của các enzyme xenlulaza và amylaza được xác định dựa trên khả năng tạo vòng phân giải trên đĩa thạch chứa các cơ chất tương ứng là CMC và tinh bột với nồng độ 0,2% (William, 1983).

2.2.3. Xác định khả năng phân giải lân

Khả năng phân giải lân được xác định dựa trên sự hình thành vòng sáng xung quanh khuẩn lạc của các chủng cấy chấm điểm trên môi trường Pikovaskya (Puente, 1983).

2.2.4 Xác định khả năng sinh IAA

Vi khuẩn được nuôi trong môi trường bổ sung 100 mg/l tryptophan và định lượng bằng thuốc thử Salkowski (Gordon & Weber, 1951). Hỗn hợp phản ứng gồm 1 ml dịch sau ly tâm cho vào 2 ml thuốc thử Salkowski. Phản ứng được lắc đều, ủ tối trong 20 phút trước khi được đo trên máy đo quang phổ ở bước sóng 530nm. Giá trị OD của mẫu được đối chiếu với đồ thị chuẩn để tính hàm lượng IAA trong dịch nuôi cấy. Hàm lượng IAA tính theo đơn vị $\mu\text{m IAA/ml}$.

2.2.5. Xác định khả năng thích ứng pH và nhiệt độ

- Khả năng thích ứng pH khác nhau: Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh ở các pH giá trị 5, 6, 7, 8 bằng dung dịch đệm Na_2HPO_4 và KH_2PO_4 , nuôi ở 28°C.

- Khả năng chịu nhiệt của các chủng vi sinh vật: Cấy vi sinh vật trên từng môi trường chuyên tính tương ứng sau đó đem nuôi ở các mức nhiệt độ khác nhau 20°C, 30°C, 35°C và 40°C.

2.2.7. Xác định tính đối kháng

Các chủng được đánh giá tính đối kháng theo từng cặp theo phương pháp đường vuông góc Cross-Streak. Các chủng vi sinh vật được cấy thành cặp theo các đường giao nhau. Nếu xuất hiện vòng đối kháng (các chủng mọc cách nhau) thì các chủng đó không thể phối trộn vào cùng chất mang.

2.2.8. Xác định chất lượng của chế phẩm dinh dưỡng vi sinh

Chủng vi sinh vật nội sinh từ ống giống được cấy chuyển và nhân giống riêng rẽ trên môi trường dịch thể chuyên tính trên máy lắc với tốc độ 160 vòng/phút trong 48 h để tạo thành giống cấp 1. Sau kiểm tra, tiếp tục nhân giống cấp 2 trên môi trường dịch thể tương ứng với tỷ lệ giống là 5%. Sau đó các giống vi sinh vật nội sinh được phối trộn hỗn hợp với dịch dinh dưỡng từ phế thải chăn nuôi sau khi xử lý trong thiết bị UASB với tỷ lệ 1:5. Chế phẩm dinh dưỡng được kiểm tra theo TT41/2014/TT - BNNPTNT.

2.2.9. Thí nghiệm chậu vại

Thí nghiệm được bố trí theo phương pháp của Vincent gồm 2 công thức với 5 lần nhắc lại nhằm đánh giá hiệu quả của chế phẩm dinh dưỡng chứa VSV nội sinh tuyển chọn trên cây rau mồng tơi, được thực hiện tại khu thí nghiệm đồng ruộng Khoa Môi trường, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Các chậu (5 kg đất) được trồng 5 cây/chậu, chăm sóc và tưới nước như nhau với tỉ lệ phân bón như sau: Công thức 1 - cây trồng được bón phân khoáng tương đương dinh dưỡng trong chế phẩm sử dụng với lượng 0,675 g N; 0,025 g P; 0,338 g K /chậu. Công thức 2 - sử dụng chế phẩm dinh dưỡng vi sinh từ vi khuẩn nội sinh. Trong công thức này, 10 ml chế phẩm dinh dưỡng vi sinh pha với nước sạch thành 1000 ml. Bón 40 ml/chậu/lần/tuần. Sau 30 ngày chăm sóc, các chỉ tiêu theo dõi được xác định bao gồm chiều cao cây, số lá, diện tích lá (cm^2) và năng suất (g/chậu). Tính chất của đất (OC, NPK tổng số, PK dễ tiêu, VSV tổng số) trước và sau thí nghiệm và đất lấy mẫu được đánh giá theo viện Thổ nhưỡng Nông hóa.

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu thống kê được tổng hợp và xử lý theo chương trình Excel và T test.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm phân bố và tính chất của đất mặn tại Nam Định

Số liệu thống kê của Sở Tài nguyên môi trường tỉnh Nam Định năm 2011 cho thấy tổng diện tích đất tự nhiên của tỉnh Nam Định là 165.145 ha và hàng năm được tăng thêm do bồi lắng ven biển. Về thổ nhưỡng, đất Nam Định chia thành 2 vùng rõ rệt: Vùng đất cổ ở phía Bắc gồm các huyện Ý Yên, Vụ Bản, Mỹ Lộc và thành phố Nam Định; vùng đất trẻ ở phía Nam gồm các huyện Trực Ninh, Nam Trực, Xuân Trường, Hải Hậu, Nghĩa Hưng và Giao Thủy. Nhóm đất có diện tích lớn nhất là nhóm đất phù sa trẻ (Fluvisols) chiếm 81,88% diện tích tự nhiên, tiếp đến là nhóm đất mặn chiếm 14,19%, các loại đất khác có đất cát, đất phèn, đất có sản phẩm

Bảng 1. Kết quả phân tích một số chỉ tiêu đất mặn Giao Thủy

Chỉ tiêu		Giá trị
pH	pH _{KCl}	7,55
EC (t ⁰ =32,1°C) (μS/cm)	EC	3400
Hàm lượng tổng số (%)	OM	1,83
	N	0,15
	P ₂ O ₅	0,16
	K ₂ O	1,96
Dinh dưỡng dễ tiêu (mg/100g)	P ₂ O ₅	5,32
	K ₂ O	15,36

Feralitic... chiếm diện tích nhỏ. Nhìn chung, đất của Nam Định chủ yếu là đất phù sa sông bồi lắng, có nhiều tính chất tốt thích hợp cho nhiều loại thực vật phát triển.

Dựa vào sự phân bố của đất mặn trên địa bàn huyện Giao Thủy tỉnh Nam Định, nghiên cứu đã lựa chọn khu vực lấy mẫu cây và đất phục vụ cho nghiên cứu.

Kết quả cho thấy giá trị pH, EC, đạm tổng số giàu, lân tổng số trung bình, lân dễ tiêu nghèo và kali trong đất khá và hoàn toàn phù hợp với đặc điểm của nhóm đất mặn. Giá trị EC thể hiện đất lấy mẫu thuộc nhóm đất mặn trung bình. 13 loại cây trồng trên vùng sinh thái đất mặn này đã được lấy mẫu phục vụ cho việc phân lập vi sinh vật nội sinh.

3.2. Phân lập vi sinh vật nội sinh

Từ 13 loại cây thu thập được từ vùng sinh thái đất mặn trên địa bàn huyện Giao Thủy, tỉnh Nam Định, 54 chủng vi khuẩn nội sinh đã được chọn sơ bộ từ 159 chủng phân lập được trên 7 môi trường khác nhau dựa trên khả năng sinh IAA, phân giải lân và sinh enzyme thủy phân. Trong đó, 12 chủng được phân lập từ lá, 25 chủng từ thân cây, 14 chủng từ rễ và 3 chủng từ nốt sần. Các chủng phân lập được đều có chung đặc tính sinh trưởng và phát triển ở điều kiện hiếu khí, chúng hình thành lớp màng mỏng (pellicle) cách môi trường nuôi khoảng 0,5 cm sau 24 - 36 h nuôi cấy. Hầu hết các chủng có đặc điểm chung là khuẩn lạc tròn, mép khuẩn lạc trơn, nhô cao, màu trắng trong đến trắng đục và vàng nhạt khi sinh trưởng trên môi trường

thạch, đường kính khuẩn lạc từ 1 - 3 mm. 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 Diệp và Nguyễn Ái Chi (2009); Lương Thị Hồng Hiệp và Cao Ngọc Diệp (2011).

3.3. Đặc tính các chủng vi khuẩn nội sinh phân lập được

Nhìn chung, các enzyme thủy phân đóng vai trò quan trọng trong sự xâm nhiễm vào cây chủ của các vi khuẩn nội sinh. Vi khuẩn xâm nhập vào bên trong cây chủ qua sự thủy phân thành xenlulo của rễ, các nốt sần hoặc các rễ bên (El-Deeb *et al.*, 2012). Nhiều công bố đã chỉ ra khả năng sinh các enzyme thủy phân của vi khuẩn nội sinh ở các cây chủ khác nhau như cây ớt, cà chua (Amareesan *et al.*, 2014), cây đu đủ, mướp, súp (Kamilova & de Bruyne, 2013), cỏ đuôi trâu và cam thảo (Mukasheva *et al.*, 2016). Kết quả kiểm tra khả năng sinh xenlulaza và amylaza của các chủng phân lập được cho thấy 16 chủng tạo vòng phân giải tinh bột, 26 chủng tạo vòng phân giải xenlulo với đường kính vòng phân giải từ 0,5 - 3,8 cm. 9 chủng trong số này cho thấy khả năng sinh cả xenlulaza và amylaza với đường kính vòng phân giải xenlulo và tinh bột lần lượt là 0,4 - 1,4 cm và 2,2 - 3,8 cm.

Phốt pho là nguyên tố dinh dưỡng cần thiết cho sự tăng trưởng và phát triển của cây nhưng thường không hoặc ít hòa tan trong đất mặn (Kannan *et al.*, 2014). Một số chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng sinh enzyme hoặc các axit hữu cơ mà có thể hòa tan phốt pho từ các phân

Bảng 2. Khả năng phân giải xenlulo, phân giải lân và tổng hợp IAA của các chủng vi sinh vật nội sinh

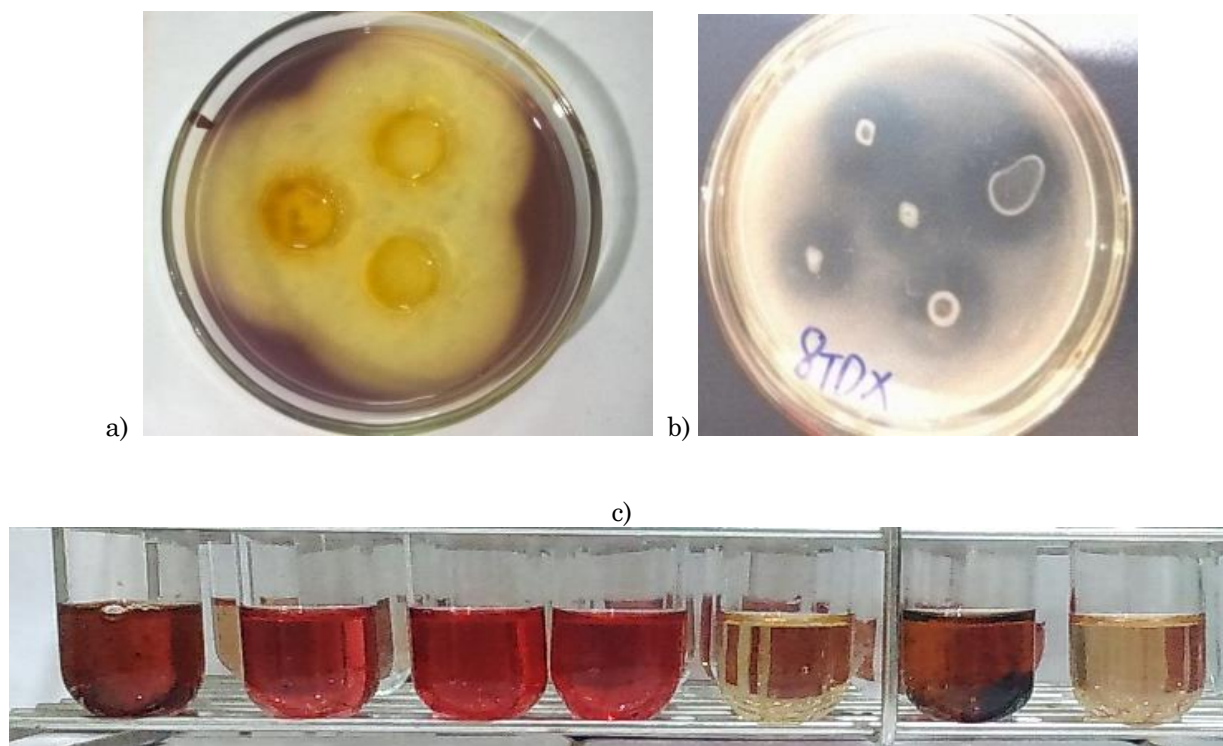
TT	Kí hiệu	Vòng phân giải (cm)			IAA ($\mu\text{g/ml}$)	STT	Kí hiệu	Vòng phân giải (cm)			IAA ($\mu\text{g/ml}$)
		Xenlulo CMC	Lân	Tinh bột				Xenlulo CMC	Lân	Tinh bột	
1	Y ĐT1	1,2	0,5	-	22,15	28	3 TX1	-	0,5	1,0	33,01
2	Y ĐT2	-	0,1	-	44,48	29	4 TD	-	1,0	-	114,60
3	Y ĐT3	-	0,4	0,8	41,03	30	6 LSH3	2,1	0,2	-	60,39
4	2 LN	3,8	-	-	45,17	31	6 LSH5	2,1	0,1	-	96,77
5	2 LX	2,2	0,5	0,5	33,45	32	6 LX	2,5	0,7	-	20,20
6	2 TX	3,8	0,1	-	49,66	33	6LXL3	-	0,5	0,6	278,55
7	3 LG2	-	-	-	93,39	34	6 RMB1	3,8	-	-	18,96
8	3 LMB	3,8	-	1,0	13,95	35	6 RRD	1,5	0,5	-	34,68
9	3 LN	-	-	-	74,52	36	6 RXL3	3,8	-	-	20,27
10	3 LSH1	2,2	0,8	1,2	30,08	37	6 TDG	-	0,2	-	102,96
11	3 RDX1	3,8	-	1,3	36,29	38	6 TRD1	1,2	0,7	-	23,15
12	3 RDX2	3,3	-	1,3	67,16	39	6 TRD2	-	0,8	-	23,82
13	3 RG1	3,8	-	-	10,46	40	6 TSH1	1,4	0,6	-	33,72
14	3 RN2	3,8	0,8	1,0	11,50	41	6 TSH2	-	0,7	-	82,20
15	3 RV1	-	-	-	95,11	42	6 TSH3	2,5	0,4	1,5	47,06
16	3 RV4	-	0,2	-	89,73	43	6 TXL2	3,8	-	-	28,23
17	3 RXL2	3,8	-	-	8,86	44	7 LMB2	2,1	-	-	76,35
18	3 TDG1	3,8	1,5	-	69,24	45	7 LX	-	0,5	-	66,55
19	3 TDG4	3,3	0,7	0,6	75,18	46	7 RX	-	0,9	-	23,97
20	3 TDG5	2,6	0,4	0,4	111,88	47	7 TDX	-	0,9	-	52,50
21	3 TDG6	-	-	-	112,73	48	7 TX1	-	0,8	-	23,62
22	3 TDG7	-	-	0,7	122,92	49	7 TX2	-	0,6	-	38,88
23	3 TSH1	-	-	-	70,75	50	8 RN	-	-	1,3	90,69
24	3 TSH4	-	0,3	-	72,35	51	8 RS1	-	0,5	-	25,52
25	3 TSH5	3,8	-	-	14,05	52	8 RX	-	0,5	-	22,33
26	3 TSH6	3,8	-	-	21,88	53	8 TDX	-	1,5	0,5	15,43
27	3 TSH7	-	-	-	81,03	54	8 TRD	-	0,7	-	58,54

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

tử vô cơ và hữu cơ, từ đó tạo nguồn dinh dưỡng dễ hấp thu cho cây trồng như *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp. (Firdous & Bhore, 2016).

32 chủng vi khuẩn phân lập được có tạo vòng phân giải phốt pho vô cơ trên đĩa môi trường với đường kính vòng phân giải từ 0,1 - 1,5 cm. Việc sử dụng các vi khuẩn phân giải lân làm tăng lượng lân dễ hấp thu cho cây, nhờ đó

năng suất cây trồng có thể được cải thiện (Bernard, 2012). Trong nghiên cứu của Damodaran *et al.* (2013) về vi khuẩn nội sinh ở đất mặn thuộc Uttar Pradesh, Ấn Độ, vòng phân giải lân của các chủng trong nghiên cứu chỉ đạt 0,6 - 0,9 cm. Khả năng hòa tan lân của chi *Bacillus* sp. phân lập từ vùng sinh thái mặn cũng đã được ghi nhận trong nhiều công bố trước đây (Son *et al.*, 2006).



Hình 1. Hình ảnh kiểm tra đặc tính các chủng a) sinh tổng hợp enzyme, b) phân giải P vô cơ, c) sinh tổng hợp IAA

Vi khuẩn sinh IAA giúp làm tăng diện tích bề mặt và chiều dài rễ; nhờ đó mà cây có thể tiếp cận nhiều hơn với dinh dưỡng trong đất (Bernard, 2012). Kết quả kiểm tra hoạt tính IAA cho thấy cả 54 chủng vi khuẩn phân lập đều có khả năng sinh IAA khi có bổ sung Trp với nồng độ 0,1%; lượng IAA của các chủng dao động trong khoảng 11,5 - 278,55 $\mu\text{g/ml}$. Trong số này, 5 chủng 3TDG5, 3TDG6, 3TDG7, 6TDG và 6LXL3 sinh IAA với hàm lượng rất cao, trên 100 $\mu\text{g/ml}$. 4 chủng 3TDG5, 3TDG6, 3TDG7, 6TDG đều được phân lập từ thân cây dền gai sinh IAA với hàm lượng lần lượt là 111,88; 112,73; 122,92 và 102,96 $\mu\text{g/ml}$. Chủng 6LXL3 phân lập từ lá cây xà lách sinh IAA cao nhất, lên đến 278,55 $\mu\text{g/ml}$. Kết quả này cho thấy một số chủng có khả năng tổng hợp IAA tốt hơn so với các chủng trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Hà và cs. (2009), chỉ đạt 5,84 - 39,64 $\mu\text{g/ml}$. Trong một nghiên cứu khác, các chủng vi sinh vật nội sinh được phân lập từ rễ cây khoai lang trên đất phèn ở huyện Hòn Đất, Kiên Giang sinh tổng

hợp IAA nằm trong khoảng 2,352 - 5,741 $\mu\text{g/ml}$ (Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Thị Mộng Huyền, 2015). Điều này cho thấy triển vọng ứng dụng của các chủng vi khuẩn nội sinh phân lập được trong nghiên cứu này.

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

Nhìn chung, các chủng vi sinh vật nội sinh phân lập được phát triển tốt trong dải nhiệt độ 20 - 40°C. Trong đó, các chủng 3TDG4, 3TDG5, 6LXL3, 6TSH3 và 8TDX phát triển tốt nhất ở 30°C và nhiệt độ thích hợp nhất cho chủng 3TDG1, 3LSH1 và YDT3 là 35°C.

Đa số các chủng phát triển tốt nhất ở điều kiện pH 7, số lượng khuẩn lạc dao động 4×10^7 - $4,5 \times 10^8$ CFU/ml. Riêng chủng 3TDG5 thích hợp nhất với pH 6, số lượng khuẩn lạc đạt 2×10^8 CFU/ml. Điều kiện môi trường axit (pH 5) và kiềm (pH 8, 9) dường như không thích hợp cho các chủng vi khuẩn phát triển (Bảng 3).

Bảng 3. Khả năng thích ứng pH và nhiệt độ các chủng VSV nội sinh

STT	Ký hiệu	Số lượng khuẩn lạc ($\times 10^7$) CFU/ ml)								
		Nhiệt độ				pH				
		20°C	30°C	35°C	40°C	5	6	7	8	9
1	Y ĐT1	12,04	16,28	38,68	11,32	-	10,82	12,04	10,41	8,37
2	Y ĐT2	1,61	1,83	5,56	3,99	-	1,86	9,64	3,22	3,33
3	Y ĐT3	27,75	19,54	48,33	23,73	0,08	7,24	13,01	8,68	5,13
4	2 LN	-	8,61	4,35	0,53	-	0,05	0,13	0,04	-
5	2 LX	-	4,75	0,66	0,32	-	5,63	6,25	1,88	-
6	2 TX	1,12	1,43	0,15	0,01	0,31	2,22	3,64	0,91	0,47
7	3 LG2	0,38	0,14	0,12	0,16	0,01	0,09	0,12	0,08	0,01
8	3 LMB	0,13	0,12	0,14	0,18	0,01	0,03	0,12	0,18	0,07
9	3 LN	-	7,22	4,18	6,05	0,04	0,85	1,90	0,44	0,17
10	3 LSH1	12,96	44,92	57,33	6,48	8,53	18,45	45,04	15,07	3,22
11	3 RDX1	0,21	0,57	0,23	0,20	0,01	0,48	0,57	0,54	0,51
12	3 RDX2	0,02	0,08	0,09	0,23	3,10	7,70	8,20	4,70	0,20
13	3 RG1	0,17	0,20	0,16	0,30	-	0,01	0,20	0,15	0,01
14	3 RN2	0,01	0,06	0,09	0,10	0,01	0,07	0,06	0,09	0,06
15	3 RV1	-	1,43	0,86	0,44	-	0,23	0,45	0,08	-
16	3 RV4	0,32	1,21	1,03	-	-	4,57	7,41	1,48	0,21
17	3 RXL2	0,25	1,88	7,73	0,15	0,01	0,18	0,32	0,15	-
18	3 TDG1	7,97	8,40	9,91	12,01	0,67	2,13	8,40	1,64	0,18
19	3 TDG4	15,33	50,45	14,27	12,87	7,74	19,36	44,92	6,96	2,56
20	3 TDG5	16,56	18,88	13,31	10,42	17,94	20,46	19,12	18,37	1,99
21	3 TDG6	1,90	4,30	4,80	5,20	1,04	5,80	4,30	2,80	1,84
22	3 TDG7	16,47	20,58	13,16	3,71	8,78	4,74	20,02	4,41	4,27
23	3 TSH1	-	1,01	0,56	0,24	-	0,46	0,78	0,18	-
24	3 TSH4	0,05	0,57	0,84	0,44	0,01	0,28	0,61	0,25	0,07
25	3 TSH5	0,02	0,26	0,12	-	-	1,70	2,30	0,18	0,05
26	3 TSH6	0,03	0,47	0,51	0,08	0,02	0,54	0,81	0,53	0,18
27	3 TSH7	-	0,23	0,39	-	-	0,13	0,12	0,08	-
28	3 TX1	0,12	0,26	0,46	0,42	0,02	0,09	0,36	0,16	-
29	4 TD	1,50	1,60	1,11	-	1,16	1,31	1,58	2,64	1,41
30	6 LSH3	0,14	0,44	2,83	0,53	0,01	0,16	0,28	0,04	-
31	6 LSH5	8,74	11,21	4,83	4,57	6,42	14,43	11,29	11,11	-
32	6 LX	0,12	0,87	0,35	-	1,44	8,62	14,01	4,73	1,23
33	6 LXL3	1,20	24,16	7,18	1,28	1,04	2,32	4,08	1,28	1,15
34	6 RMB1	-	0,63	1,03	0,81	0,02	0,14	0,42	0,23	0,06
35	6 RRD	-	0,35	0,76	0,54	0,06	0,49	1,03	0,80	0,04
36	6 RXL3	0,08	0,58	0,26	-	0,44	1,48	1,05	0,72	0,14
37	6 TDG	0,05	0,76	0,65	0,32	0,28	8,69	2,73	0,15	0,03
38	6 TRD1	0,16	1,02	0,47	5,14	-	2,70	1,19	0,86	0,12
39	6 TRD2	0,22	0,45	0,21	0,14	0,01	0,05	0,37	-	-
40	6 TSH1	0,32	0,64	0,38	0,17	0,03	0,16	0,41	0,03	-
41	6 TSH2	4,18	4,35	4,91	5,33	7,28	9,66	9,74	6,51	-
42	6 TSH3	2,55	4,90	2,23	2,18	0,02	0,48	4,96	1,70	0,01
43	6 TXL2	0,16	1,26	2,45	1,77	0,01	0,12	1,48	0,49	0,12
44	7 LMB2	0,22	2,53	0,18	-	-	0,58	0,37	0,16	-
45	7 LX	-	0,47	0,08	0,02	0,01	1,33	0,58	0,18	0,05
46	7 RX	0,08	0,16	0,06	-	-	0,94	0,81	0,43	0,14
47	7 TDX	-	2,73	2,14	1,66	-	0,27	0,03	0,01	-
48	7 TX1	0,34	1,04	5,63	4,11	0,03	1,06	0,32	0,28	0,02
49	7 TX2	0,16	0,87	0,33	0,18	-	0,45	0,17	0,02	-
50	8 RN	-	0,63	2,73	0,86	0,02	0,42	0,30	0,33	-
51	8 RS1	0,08	0,71	5,68	1,49	0,01	0,07	0,47	0,17	0,81
52	8 RX	1,28	8,86	6,82	5,41	0,02	0,56	0,26	0,14	0,03
53	8 TDX	3,43	4,18	0,64	0,61	3,55	4,18	5,53	3,41	3,21
54	8 TRD	0,02	0,83	0,05	0,02	0,02	0,83	1,10	0,84	0,17

Bảng 4. Đặc tính các chủng VSV nội sinh được tuyển chọn

Chủng	Vòng phân giải cơ chất (cm)			IAA ($\mu\text{g/ml}$)	Đặc điểm hình thái
	CMC	Lân vô cơ	Tinh bột		
3TDG1	3,8	1,5	-	69,24	Gram âm, hình que ngắn, ít chuyển động
3TDG4	3,3	0,7	-	75,18	Gram âm, hình que ngắn, ít chuyển động
3TDG5	2,6	0,5	0,4	111,88	Gram âm, hình que ngắn, ít chuyển động
3LSH1	2,2	1,2	0,8	30,08	Gram âm, hình que ngắn, ít chuyển động
6LXL3	-	0,5	0,6	278,55	Gram âm, hình que ngắn, ít chuyển động
6TSH3	2,5	1,5	0,4	47,06	Gram âm, hình que ngắn, chuyển động
8TDX	-	0,5	1,5	35,43	Gram âm, hình que ngắn, chuyển động
YDT3	-	0,8	0,4	41,03	Gram âm, hình que ngắn, chuyển động

8 chủng VSV có khả năng sinh tổng hợp IAA, phân giải lân vô cơ và sinh enzyme cao nhất, thích ứng nhiệt độ và pH rộng đã được lựa chọn từ 54 chủng ban đầu để nghiên cứu tiếp bao gồm 3TDG1, 3TDG4, 3TDG5, 3LSH1, 6LXL3, 6TSH3, 8TDX và YDT3. Bảng 4 thể hiện đặc tính các chủng được tuyển chọn.

Nhìn chung, các chủng được tuyển chọn đều là vi khuẩn Gram âm, có hình que và có khả năng chuyển động tương tự như mô tả của Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Thị Ái Chi (2009); Lương Thị Hồng Hiệp và Cao Ngọc Diệp (2011).

3.5. Kiểm tra chất lượng chế phẩm dinh dưỡng vi sinh

Các chủng vi sinh vật nội sinh có hoạt tính sinh học cao đã tuyển chọn được khảo sát tính đối kháng trên môi trường nuôi cấy NA. Kết quả cho thấy các chủng vi sinh vật nội sinh được tuyển chọn không đối kháng nhau và đều phát triển tốt. Vì vậy, có thể phối trộn các chủng vi sinh vật nội sinh này cùng nhau khi sản xuất chế phẩm dinh dưỡng vi sinh để tăng cường hiệu

quả hiệp đồng các đặc tính tốt của chúng.

Kết quả phân tích chế phẩm dinh dưỡng vi sinh chỉ rõ các chỉ tiêu đều đạt tiêu chuẩn của phân vi sinh theo thông tư 41/2014/TT - BNNPTNT (Bảng 5), vì vậy loại chế phẩm dinh dưỡng này đạt chất lượng để thử nghiệm.

3.6. Thí nghiệm đánh giá hiệu quả của chế phẩm dinh dưỡng vi sinh trên cây trồng

Thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của chế phẩm dinh dưỡng vi sinh trên cây rau mồng tơi trong 30 ngày được tiến hành với 2 công thức, mỗi công thức nhắc lại 5 lần dưới điều kiện chăm sóc như nhau. Kết quả chỉ ra rằng có sự khác nhau mang ý nghĩa thống kê giữa số liệu thu được ở cả 2 công thức thí nghiệm với khoảng tin cậy 95%. Năng suất ở CT2 sử dụng chế phẩm dinh dưỡng vi sinh cao gấp 1,88 lần (tương đương 86,24%) so với CT1. Các chỉ tiêu khác ở CT2 cũng có khác biệt so với CT1 ở mức sai số có ý nghĩa: chiều cao cây cao hơn 1,98 lần; số lá hơn 1,51 lần; diện tích lá cao gấp 2,16 lần.

Bảng 5. Chất lượng của chế phẩm dinh dưỡng vi sinh

Chỉ tiêu	Kết quả	TT 41/2014/TT - BNNPTNT
pH	7,2	6 - 8
OM%	7,62	-
N%	1,48	-
P ₂ O ₅ %	0,046	-
K ₂ O%	3,28	-
Vi sinh vật nội sinh (CFU/ml)	$2,13 \times 10^9$	$\geq 1,0 \times 10^6$

Bảng 6. Hiệu quả của chế phẩm dinh dưỡng vi sinh trên cây trồng

Công thức	Chỉ tiêu			
	Cao cây (cm)	Số lá/ cây	Diện tích lá (cm ²)	Năng suất (g/cây)
CT1	16,70a	5,02a	175,58a	35,76a
CT2	33,06b	7,60b	379,25b	67,46b

Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có một chữ cái khác nhau thì có khác biệt ở mức ý nghĩa 95%



Hình 1. Thí nghiệm đánh giá hiệu quả của CPDDVS sau 25 ngày trồng

Tuy nhiên, nếu so với hiệu quả của chế phẩm dinh dưỡng vi sinh Sumagrow của Mỹ (năng suất có thể tăng đến 200%) thì chế phẩm dinh dưỡng vi sinh của nghiên cứu này vẫn còn thấp hơn và cần phải nghiên cứu hoàn thiện để tiến tới cạnh tranh được với các sản phẩm của nước ngoài. Như vậy, sử dụng chế phẩm dinh dưỡng vi sinh đã giúp tăng khả năng sinh

trưởng, phát triển và năng suất cây trồng so với việc chỉ sử dụng phân vô cơ (Bảng 6). Kết quả đạt được trong nghiên cứu này có sự tương đồng với kết quả của Cao Ngọc Diệp và cs. (2011) đã chứng minh rằng sử dụng phân hữu cơ vi sinh có tác dụng làm tăng năng suất và chất lượng rau xanh và có thể sử dụng thay thế cho phân bón hóa học.

Bảng 7. Chất lượng đất trước và sau thí nghiệm

Chỉ tiêu	Đất trước thí nghiệm	Đất sau thí nghiệm	
		CT1	CT2
pH	7,39	7,43	7,22
Độ ẩm (%)	27,61	28,88	29,02
N%	0,19	0,20	0,22
P tổng số	1,18	1,26	1,22
P _{dt} (mg/100 g đất)	2,22	1,84	2,76
K tổng số	1,35	1,28	1,34
K _{dt} (mg/100 g)	6,94	6,66	8,95
OM (%)	2,52	2,51	2,12
Vi sinh vật tổng số	3,6x10 ⁵	8,8x10 ⁵	1,2x10 ⁸

Kết quả phân tích đất trồng cho thấy đất sau thí nghiệm ở CT2 sử dụng chế phẩm dinh dưỡng vi sinh có hàm lượng lân và kali dễ tiêu tăng so với mẫu đất trước thí nghiệm (Bảng 7). Kết quả này có thể được lý giải bởi hoạt động của các chủng nội sinh có trong chế phẩm bón vào vốn có hoạt tính enzym phân giải xenlulo, tinh bột và lân cao, đồng thời chúng có tác dụng kích thích các VSV có lợi trong đất hoạt động mạnh. Như vậy, chế phẩm vi sinh đa chức năng được nghiên cứu ngoài tác dụng kích thích khả năng sinh trưởng và phát triển của cây trồng thì hoạt động của vi sinh vật trong chế phẩm còn giúp chuyển hóa các hợp chất khó tan thành dễ tan, giúp cây trồng sử dụng dễ dàng hơn, đồng thời giúp cải thiện tính chất đất.

4. KẾT LUẬN

8 chủng vi khuẩn nội sinh (3TDG1, 3TDG4, 3TDG5, 3LSH1, 6LXL3, 6TSH3, 8TDX và YDT3) được tuyển chọn từ cây trồng vùng đất ngập mặn thuộc huyện Giao Thủy, tỉnh Nam Định có đặc tính tốt: sinh IAA cao (đạt 30,08 - 278,55 µg/ml); vòng phân giải xenlulo > 2,2 cm, phân giải lân đạt 0,4 - 1,5 cm và vòng phân giải tinh bột > 0,5 cm; đều là các chủng có khả năng thích ứng nhiệt độ và pH rộng (20 - 40°C, pH = 5 - 9).

Chế phẩm dinh dưỡng vi sinh sản xuất từ các chủng vi khuẩn nội sinh tuyển chọn có tác dụng làm tăng năng suất rau mồng tơi 86,24% so với công thức chỉ dùng phân bón vô cơ. Các chỉ tiêu khác ở công thức sử dụng chế phẩm cũng có khác biệt so với công thức đối chứng ở mức sai số có ý nghĩa: chiều cao cây cao hơn 1,98 lần; số lá hơn 1,51 lần; diện tích lá cao gấp 2,16 lần. Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng ứng dụng các chủng vi khuẩn nội sinh vào thực tế.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được sự hỗ trợ về kinh phí của đề tài trọng điểm của Học viện Nông nghiệp Việt Nam, mã số T2015-04-05TĐ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Amareesan N., Jayakumar V., and Thajuddin N. (2014). Isolation and characterization of endophytic bacteria associated with chilli (*Capsicum annuum*) grown in coastal agricultural ecosystem, Indian Journal of Biotechnology, 13: 247-255.
- Bernard R. G. (2012). Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications, Scientifica. pp. 15.
- Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 41/2014/TT-BNNPTNN - Thông tư hướng dẫn một số điều của Nghị định số 202/2013/NĐ-CP ngày 27 tháng 11 năm 2013 của Chính phủ về quản lý phân bón thuộc trách nhiệm quản lý nhà nước của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.
- 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, Vietnam, Hội nghị Công nghệ sinh học năm 2009, Hồ Chí Minh, Việt Nam, tr. 69-73.
- Cao Ngọc Diệp, Nguyễn Thanh Tùng, Nguyễn Văn Anh và Trần Thị Giang (2011). Hiệu quả của phân hữu cơ - vi sinh trên năng suất và chất lượng rau xanh trồng trên đất phèn sa tại tỉnh Long An. Tạp chí Khoa học, Trường đại học Cần Thơ, 18b: 18-28.
- Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Thị Mộng Huyền (2015). Phân lập và xác định đặc tính vi khuẩn nội sinh trong rễ cây khoai lang (*Ipomoea batatas*) trồng trên đất phèn ở huyện Hòn Đất, tỉnh KIÊN GIANG, Tạp chí Khoa học, Trường đại học Cần Thơ, 36: 6-13.
- Damodaran T., Sah V., Rai R. B., Sharma D. K., Mishra V. K., Jha S. K., and Kannan R. (2013). Isolation of salt tolerant endophytic and rhizospheric bacteria by natural selection and screening for promising plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and growth vigour in tomato under sodic environment, African Journal of Microbiology Research, 7(44): 5082-5089.
- El-Deeb B., Bazaid S., Gherbawy Y., and Elhariry H. (2012). Characterization of endophytic bacteria associated with rose plant (*Rosa damascena trigintipeta*) during flowering stage and their plant growth promoting traits, Journal of Plant Interactions, 7(3): 48-253.
- Firdous J. and Bhore S. (2016). Effect of endophytic bacterial isolates towards plant growth promoting activity, Scientific Journal of Microbiology, 5(3): 101-107.
- Gordon S. A. and Weber R. P. (1951), Colorimetric Estimation of Indoleacetic Acid, Plant Physiol., 26(1): 192-5.
- Kamilova F. and de Bruyne R. (2013). Plant Growth Promoting Microorganisms: The Road from an

- Academically Promising Result to a Commercial Product, *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, John Wiley & Sons, Inc., pp. 677-686.
- Kannan R., Damodaran T., Pandey B. K., Umamaheswari S., Rai R. B., Jha S. K., Mishra V. K., Sharma D. K., and Sah V. (2014). Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting bacteria (PGPB) associated to the sodicity tolerant polyembryonic mango (*Mangifera indica* L.) root stock and growth vigour in rice under saline sodic environment, *African Journal of Microbiology Research*, 8(7): 628-636.
- Lương Thị Hồng Hiệp và Cao Ngọc Diệp (2011). Phân lập và nhận diện vi khuẩn nội sinh trong cây cúc xuyên chi (*Wedelia trilobata* (L.) Hitchc.) bằng kỹ thuật PCR, *Tạp chí Khoa học, Trường đại học Cần Thơ*, 18a: 168-176.
- Lodewyckx C., Vangronsveld J., Porteous F., Moore E. R.B., Taghavi S., Mezgeay M., and Lelie D. (2002). Endophytic Bacteria and Their Potential Applications, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(6): 583-606.
- Miliute I., Buzaitė O., Baniulis D., and Stanys V. (2015). Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review, *Zemdirbyste-Agriculture*, 102(4): 465-478.
- Mukashveva T., Berzhanova R., Ignatova L., Omirbekova A., Brazhnikova Y., Sydykbekova R., and Shigaeva M. (2016). Bacterial endophytes of Trans-Ili Alatau region's plants as promising components of a microbial preparation for agricultural use, *Acta Biochimica Polonica*, 63(2): 321-8.
- Nguyễn Thị Thu Hà, Hà Thanh Toàn và Cao Ngọc Diệp (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, Trường đại học Cần Thơ*, 7(2): 241-250.
- Puente M.E., Bashan Y., Li C.Y., and Lebsky V.I. (2004). Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks, *Plant Biol.*, 6: 629-642.
- Son H. J., Park G. T., Cha M. S., and Heo M. S. (2006). Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere, *Bioresource Technology*, 97: 204-210.
- Sumagrow organization (2014). <http://www.sumagrow.com/>
- Trần Thị Giang Hương, Nguyễn Thị Vòng, Bùi Minh Tăng (2015). Bố trí sử dụng đất tỉnh Nam Định để thích ứng với biến đổi khí hậu. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 13(6): 921-930.
- William S. (1983). Staining reaction for detection of hemicellulose degrading., *FEMS Microbiology Letters*, 20: 253-258.
- Wilson D. (1995). Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use and definition, *Oikos*, 73(2): 274-276.