

TÌM HIỂU VỀ VI KHUẨN CỐ ĐỊNH NITƠ SỐNG TỰ DO PHÂN LẬP TỪ ĐẤT TRỒNG LÚA

PHẠM THỊ NGỌC LAN

Trường đại học Khoa học, Đại học Huế

LÝ KIM BẢNG

Viện Công nghệ sinh học

Trong đất thường tồn tại nhiều nhóm vi sinh vật cố lách, góp phần nâng cao độ phì nhiêu cho đất, trong đó phải kể đến vai trò của vi khuẩn cố định nitơ, đặc biệt là nhóm cố định nitơ sống tự do như *Azotobacter*, *Azospirillum*. Các vi khuẩn này phân bố nhiều trong đất và quanh vùng rễ. Ngoài khả năng cố định đạm, chúng có thể tiết ra môi trường đất một số hoạt chất có tác dụng kích thích sinh trưởng ở thực vật [1, 5, 6].

Việc tìm hiểu vai trò của nhóm vi sinh vật này là cần thiết cho việc tăng sản lượng cây trồng trên vùng đất của tỉnh Thừa Thiên - Huế.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng

Các chủng vi khuẩn cố định nitơ sống tự do được phân lập từ đất trồng lúa ở các vùng thuộc tỉnh Thừa Thiên - Huế.

2. Phương pháp

Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cố định nitơ trên môi trường Ashby thạch đĩa theo phương pháp Koch [2]. Thành phần môi trường Ashby (g/l): glucoza 20,0; CaSO_4 0,1; KH_2PO_4 0,1; CaCO_3 5,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2; NaCl 20,0; thạch 0,2; nước 1000 ml (vô đạm); độ pH = 7,0-7,5.

Xác định ảnh hưởng của chế phẩm vi khuẩn đến khả năng nảy mầm của hạt: xử lý hạt giống bằng cách ngâm dịch vi khuẩn với các nồng độ 10^5 , 10^6 , 10^7 tế bào/ml trong 8 giờ, sau đó ủ hạt ở nhiệt độ 32°C . Sau 4 ngày, đếm số hạt nảy mầm, đo chiều dài của rễ mầm và thân mầm. Chế phẩm vi khuẩn cố định nitơ được tạo thành bằng cách nuôi cấy lách vi khuẩn trong môi trường Ashby dịch thể sau 72 giờ ở nhiệt độ $28-32^\circ\text{C}$, tốc độ lắc 150 vòng/phút.

Xác định khả năng kháng chất kháng sinh trong môi trường Ashby dịch thể cố bổ sung streptomycin với hàm lượng 0,1; 0,2; 0,3%.

Đánh giá sản lượng lúa dựa trên các yếu tố cấu thành sản lượng: số bông/m², số hạt/bông, % hạt chắc, trọng lượng 1000 hạt.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Số lượng vi khuẩn cố định nitơ hiếu khí sống tự do trong các mẫu đất trồng lúa

Từ một số mẫu đất trồng lúa ở các huyện trong tỉnh Thừa Thiên - Huế, chúng tôi đã tiến hành phân lập, đếm số lượng khuẩn lạc vi khuẩn có khả năng cố định nitơ sống tự do mọc trên môi trường Ashby thạch đĩa để xác định số lượng vi khuẩn tồn tại trong đất. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1 cho thấy số lượng vi khuẩn cố định nitơ hiếu khí sống tự do trong các mẫu đất ở những vùng khác nhau có sự biến động về số lượng không lớn lắm. Mẫu đất ở vùng Lộc Hòa phát hiện có $240,0 \times 10^3$ CFU/g đất, ở vùng Thủy Dương phát hiện có $280,1 \times 10^3$ CFU/g đất. Ngoại trừ mẫu đất phân lập từ vùng Phú Thượng có sự biến động về số lượng vi khuẩn, đạt $2,65 \times 10^6$ CFU/g đất, gấp khoảng 10 lần so với đất ở các vùng khác.

Theo Phạm Thị Ngọc Lan và Trương Văn Lung (1999), số lượng vi khuẩn cố định nitơ hiếu khí sống tự do phân lập ở đất gò đồi thấp hơn nhiều so với trong đất ruộng ướt (chỉ đạt $26,12-110,00 \times 10^3$ khuẩn lạc/g đất [4]). Với 10 mẫu đất, chúng tôi đã phân lập và thuần khiết được 108 chủng vi khuẩn cố định nitơ hiếu khí sống tự do trong đất, ký hiệu là $N_1, N_2 \dots N_{108}$.

Bảng 1

Số lượng vi khuẩn cố định nitơ hiếu khí sống tự do trong các mẫu đất trồng lúa

STT	Ký hiệu mẫu	Địa điểm phân lập	CFU/g đất ($\times 10^3$)	
			Ướt	Khô
1	A ₁	Thủy Biểu - Huế	264,0	440,0
2	A ₂	Xuân phú - Huế	244,8	414,9
3	A ₃	Phú Thượng - Phú Vang	2654,4	4281,3
4	A ₄	Hương Toàn - Hương Trà	278,4	464,0
5	A ₅	Thủy Dương - Hương Thủy	280,1	482,9
6	A ₆	Lộc Hòa - Phú Lộc	240,0	406,8
7	A ₇	Phong Chương - Phong Điền	259,2	435,6
8	A ₈	Phong Sơn - Phong Điền	258,6	423,9
9	A ₉	Văn Xá - Hương Trà	253,2	411,7
10	A ₁₀	Tứ Hạ - Hương Trà	272,2	453,7

2. Đánh giá khả năng cố định nitơ của các chủng vi khuẩn đã phân lập được

Để tìm hiểu năng lực cố định nitơ, 108 chủng vi khuẩn được cấy chuyển vào môi trường Ashby thạch nghiêng để giữ giống. Sau 4 ngày, chúng tôi tiến hành tuyển chọn để loại bỏ những chủng mọc quá yếu và giữ lại 91 chủng để tuyển chọn tiếp tục trên môi trường Ashby thạch đĩa.

Trong cùng điều kiện nuôi cấy hoàn toàn vô đạm, các chủng vi khuẩn muốn sinh trưởng, phát triển bắt buộc phải cố định nitơ phân tử từ không khí. Kích thích và bề dày của khuẩn lạc của mỗi chủng phản ánh sơ bộ khả năng cố định nitơ của chúng. Sau 4 ngày, đánh giá khả năng tích lũy sinh khối của các chủng vi khuẩn. Kết quả trình bày ở bảng 2.

Bảng 2

Khả năng cố định nitơ của các chủng vi khuẩn đã phân lập được

Năng lực	Kích thước khuẩn lạc (mm)	Số chủng phân lập	Tỷ lệ (%)
Yếu	< 4	9	9,9
Trung bình	4-7	49	53,8
Mạnh	> 7-12	31	34,1
Rất mạnh	≥ 12	2	2,2

Qua bảng 2, chúng tôi nhận thấy khả năng cố định nitơ của các chủng vi khuẩn đã phân lập được không đều; số chủng vi khuẩn cố định nitơ trung bình và mạnh tương đối nhiều (chiếm 34,1 - 53,8), nhưng tỷ lệ vi khuẩn cố định nitơ rất mạnh lại rất thấp (chiếm 2,2%). Trong số các chủng vi khuẩn có hoạt lực mạnh, chúng tôi chọn chủng N₄ (kích thước của khuẩn lạc 12 mm) và chủng N₇₄ (kích thước của khuẩn lạc 13 mm) để làm đối tượng cho những nghiên cứu tiếp theo.

3. Tuyển chọn khả năng kháng chất kháng sinh của hai chủng vi khuẩn N₄ và N₇₄

Để tìm hiểu khả năng kháng chất kháng sinh của hai chủng N₄ và N₇₄, tiến hành nuôi cấy lắc vi khuẩn trong môi trường Ashby dịch thể có bổ sung streptomycin với hàm lượng tăng dần từ 0,1-0,3%. Sau 4 ngày nuôi cấy lắc ở 28-30°C, thu dịch mẫu, so màu ở bước sóng 520 nm và dựa vào đồ thị chuẩn để tính lượng sinh khối tạo thành. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3

Khả năng kháng chất kháng sinh của hai chủng N_4 và N_{74}

Hàm lượng streptomycin (%)	Chủng vi khuẩn	Sinh khối (mg/ml)	
		Tươi	Khô
0,0	N_4	19,68±0,16	11,84±0,09
0,1		3,98±0,00	2,39±0,00
0,2		1,11±0,14	0,66±0,08
0,3		0,46±0,03	0,27±0,02
0,0	N_{74}	20,06±0,13	11,63±0,08
0,1		4,60±0,21	2,67±0,12
0,2		1,73±0,14	1,00±0,08
0,3		0,56±0,08	0,32±0,08

Kết quả thí nghiệm cho thấy với sinh khối ban đầu bổ sung vào là 0.147 mg/ml đối với chủng N_{74} và 0,262 mg/ml đối với chủng N_4 , ở hàm lượng streptomycin trong môi trường là 0,1%, sinh khối của hai chủng N_4 và N_{74} đạt 3,98-4,60 mg/ml. Khi tăng hàm lượng chất kháng sinh trong môi trường đến 0,3%, sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn giảm hẳn nhưng sinh khối vẫn đạt từ 0,46-0,56 mg/ml.

Như vậy, ở hàm lượng chất kháng sinh khá lớn trong môi trường nuôi cấy, các chủng vi khuẩn nghiên cứu vẫn có khả năng tồn tại và sinh trưởng với các mức độ khác nhau, chứ không bị ức chế và tiêu diệt hoàn toàn.

4. Đánh giá hiệu quả của việc xử lý chế phẩm vi khuẩn đối với sự nảy mầm của hạt

Tác dụng của các chế phẩm N_4 và N_{74} đến tỷ lệ nảy mầm, chiều dài của rễ mầm và thân mầm của hạt được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4 cho thấy, ở các lô hạt giống được xử lý dịch vi khuẩn với nồng độ 10^5 và 10^6 tế bào/ml, tỷ lệ nảy mầm của hạt khá cao. Nồng độ vi khuẩn 10^6 tế bào/ml cho tỷ lệ nảy mầm cao nhất, với chế phẩm N_{74} đạt 97%, chế phẩm N_4 đạt 95%, nhưng lô thí nghiệm với nồng độ vi khuẩn 10^7 tế bào/ml thì tỷ lệ nảy mầm hầu như không thay đổi so với đối chứng (83-84%).

Bảng 4

Đánh giá hiệu quả của việc xử lý hạt của giống lúa Khang Dân bằng chế phẩm vi khuẩn

Nồng độ tế bào/ml	Tỷ lệ nảy mầm	Chiều dài của rễ mầm		Chiều dài của thân mầm	
		cm	% so ĐC	cm	% so ĐC
ĐC	83	9,50 ± 0,65	100,00	9,50 ± 0,65	100,00
10^5	N_4	9,50 ± 0,48	102,63	11,84 ± 0,32	124,63
	N_{74}	12,00 ± 0,41	126,32	12,18 ± 0,43	128,21
10^6	N_4	12,13 ± 0,43	127,68	12,38 ± 0,29	130,32
	N_{74}	13,12 ± 0,66	138,11	13,57 ± 0,27	142,84
10^7	N_4	7,13 ± 0,37	75,05	11,35 ± 0,31	119,47
	N_{74}	8,50 ± 0,46	89,47	11,57 ± 0,24	121,79

Đối với chỉ tiêu chiều dài của rễ mầm, ở các lô thí nghiệm có xử lý chế phẩm vi khuẩn với nồng độ 10^5 và 10^6 tế bào/ml, đều làm tăng chiều dài của rễ mầm so với đối chứng, nhưng ở nồng độ 10^6 tế bào/ml thì hiệu quả tác động cao hơn nhiều so với nồng độ 10^5 tế bào/ml và chế phẩm N_{74} vẫn cho hiệu quả cao hơn chế phẩm N_4 ở các lô thí nghiệm. Ở nồng độ 10^7 tế bào/ml thì chiều dài của rễ mầm giảm rõ rệt (chỉ đạt 75,05-89,47% so với đối chứng).

Các số đo về chiều dài của thân mầm được xử lý bằng chế phẩm đều tăng so với đối chứng (19,47-42,84%). Theo Dương Quang Diệu và cs., khi xử lý hạt của giống lúa CR203 bằng chế phẩm *Azospirillum* với nồng độ 10^6 tế bào/ml, chiều dài của thân mầm tăng 35,21-44,31% so với đối chứng thì hiệu quả của chế phẩm N_4 và N_{74} cũng tăng khá mạnh (30,32-42,84) so với đối chứng [1].

Sự gia tăng về chiều dài của thân mầm và rễ mầm cũng được giải thích bằng sự kích thích bởi các hoạt chất do vi khuẩn tiết ra môi trường nuôi cấy, nhưng ở nồng độ tế bào vi khuẩn quá cao gây ức chế đối với mầm lúa có thể do nhiều nguyên nhân như nồng độ cao của các hoạt chất được bài tiết, sự axit hóa môi trường do vi khuẩn... Theo kết quả nghiên cứu của Trần Đăng Kế, khi xử lý hạt của giống lúa Khang Dân bởi chế phẩm vi khuẩn lam *Anabaena cylindrica* với nồng độ 10^6 tế bào/ml, chiều dài của rễ mầm tăng 11,17-22,01% so với đối chứng, còn tác động của các chế phẩm N_4 và N_{74} ở nồng độ 10^6 tế bào/ml làm tăng chiều dài của rễ mầm 27,68-38,11% so với đối chứng [3].

III. KẾT LUẬN

Từ kết quả thí nghiệm, chúng tôi rút ra một số kết luận:

1. Số lượng vi khuẩn cố định nitơ sống tự do trong các mẫu đất phân lập đạt từ 414,0 – 4281,3 CFU/g đất khô tuyệt đối.

2. Trong số 108 chủng vi khuẩn cố định nitơ phân lập được, tỷ lệ cố định yếu đạt 9,9%, trung bình 53,8%, mạnh 34,1% và rất mạnh 2,2%.

3. Tuyển chọn được hai chủng vi khuẩn N_4 và N_{74} vừa có khả năng cố định đạm mạnh vừa có khả năng kháng streptomycin cao.

4. Khi xử lý hạt của giống lúa Khang Dân với nồng độ vi khuẩn 10^5 , 10^6 , 10^7 tế bào/ml, các chỉ tiêu tỷ lệ nảy mầm, chiều dài của rễ và thân mầm đều tăng so với đối chứng, ngoại trừ chỉ tiêu chiều dài của rễ mầm ở nồng độ 10^7 tế bào/ml.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dương Quang Diệu và cs., 1994: Công nghệ sinh học và một số ứng dụng tại Việt Nam, tập II. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
2. Nguyễn Lan Dũng và cs., 1976: Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, tập II. NXB KH&KT, Hà Nội.
3. Trần Đăng Kế, 1993: Tạp chí Sinh học, 15(3): 27-30.
4. Phạm Thị Ngọc Lan, Trương Văn Lung, 1999: Bước đầu nghiên cứu vi khuẩn *Azotobacter* trong đất vùng gò đồng tỉnh Thừa Thiên - Huế. Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc. NXB KH&KT, Hà Nội, 406-410.
5. Hà Hồng Thanh và cs., 1991: Tạp chí Sinh học, 13(3): 25-27.
6. Gopaldaswamy G., Vidhyasekaran P., Chelliah S., 1989: *Oryza*, 26(4): 378-380, India.

STUDY ON NITROGEN - FIXING AEROBIC BACTERIA ISOLATED FROM RICE SOIL

PHAM THI NGOC LAN, LY KIM BANG

SUMMARY

From 10 samples of rice soil in Thuathien - Hue province, we have isolated 108 nitrogen - fixing aerobic bacterial strains and selected two strains N_4 and N_{74} having high capability. When treated the Khangdan rice cultivar seeds by suspension 10^6 cell/ml of the strains N_4 and N_{74} the rate of germination, the growth of the germs and the roots increased more than the control.

Ngày nhận bài: 20-8-2002