

PHÂN LẬP VÀ KHẢO SÁT MỘT SỐ ĐẶC TÍNH CỦA VI KHUẨN AZOSPIRILLUM SP. . BƯỚC ĐẦU KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA CHúng LÊN CÂY MẠ LÚA NƯỚC

Trịnh Thị Hồng

Khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia TP. Hồ Chí Minh
(Bài nhận ngày 27 tháng 11 năm 2003)

TÓM TẮT: Phân lập vi khuẩn *Azospirillum* từ đất, rễ lúa ở ruộng lúa (huyện Vĩnh An – tỉnh Đồng Nai, Thủ Đức – thành phố Hồ Chí Minh). Chúng tôi chọn được 4 chủng vi khuẩn, trong đó chủng A_1 và chủng A_4 có khả năng cố định đạm mạnh nhất, tương ứng là 128 mg/l và 136mg/l.

Tiến hành khảo sát đặc tính của chủng A_1 và A_4 để sơ bộ tạo chế phẩm phân vi sinh bằng cách cố định chúng trên chất mang (alginat, than bùn) và đã khảo sát ảnh hưởng của chúng trên hạt lúa nảy mầm đến thời kỳ cây mạ trong điều kiện phòng thí nghiệm. Kết quả cho thấy: so với cây đối chứng (không qua xử lý với chế phẩm phân vi sinh) có tổng chiều dài lá 27,6 cm và chiều dài rễ 7,25 cm, thì cây mạ lúa khi được xử lý:

- + Với chế phẩm có chất mang là alginat thì chủng A_1, A_4 : có tổng chiều dài lá là 30,4 và 33,6 cm; chiều dài rễ là 8,46 và 8,3 cm.
- + Với chế phẩm có chất mang là than bùn thì chủng A_1, A_4 : có tổng chiều dài lá là 37,6 và 36,9 cm; chiều dài rễ là 7,3 và 9,6 cm.
- + Ngoài ra, cây mạ có màu lá xanh đậm, phiến lá rộng, cây cao, số lượng rễ và trọng lượng khô của cây lớn, cây đẻ nhánh nhiều, thân cây mập và cứng hơn rõ rệt.

Đặt vấn đề

Những năm 70 của thế kỷ 20 con người đã thấy và quan tâm đến sự hội sinh giữa *Azospirillum* và rễ cây hoà bản, cỏ,.. Nhiều nghiên cứu đã được tiến hành và thu được một số kết quả khả quan.

Với thực trạng hiện nay, vấn đề lương thực luôn được đặt ra hàng đầu. Trong khi đó những thông tin về khả năng tăng năng suất cây lương thực khi sử dụng *Azospirillum* như phân bón thay thế cho phân hoá học còn khá hiếm. Ngoài ra, cơ chế cũng như bản chất của sự ảnh hưởng của *Azospirillum* lên cây lương thực mà cụ thể là cây lúa vẫn còn mù mờ. Nên với mong muốn được đóng góp vào công cuộc phát triển và cải thiện năng suất cây lúa một cách hài hoà và phù hợp với tự nhiên, không gây ô nhiễm môi trường, chúng tôi tiến hành phân lập *Azospirillum* từ một số mẫu đất trồng lúa, bảo quản, khảo sát hình thái, một số đặc điểm (sinh lý sinh hoá, ..), cũng như sơ bộ khảo sát mức độ và khả năng ảnh hưởng của chúng lên cây lúa.

Vật liệu – phương pháp

I. Vật liệu:

I.1. Nguồn phân lập:

- + Đất, rễ lúa ở ruộng lúa huyện Vĩnh An – tỉnh Đồng Nai.
- + Đất ruộng lúa Thủ Đức – thành phố Hồ Chí Minh.

I.2. Hoá chất, môi trường:

- Hoá chất: KH_2PO_4 , FeSO_4 , đỏ công-gô (2%), ..
- Môi trường: NFb (bán lỏng agar 1,75%, ..), khoai tây, Dobereiner và cộng sự, dịch thể Andrate, khử nitrat.

II. Phương pháp:

II.1. Phân lập chủng *Azospirillum*:

Azospirillum tạo khuẩn lạc màu đỏ khi nuôi cấy trên môi trường NFb rắn có bổ sung đỏ công-gô.

Tiến hành: Cho 10g mẫu vào 90ml nước cất lắc với tần số 120 vòng/phút trong 1 giờ. Để lắng hút 1 ml dịch trong cho vào môi trường NFb, ủ và lắc trong 24 giờ. Ria lên môi trường NFb rắn có bổ sung 15ml đỏ công-gô. Ủ ở nhiệt độ phòng 2-5 ngày. Quan sát và chọn khuẩn lạc có màu đỏ, tiếp tục ria lên môi trường NFb rắn chứa đỏ công-gô cho đến khi thu được những khuẩn lạc đồng nhất.

II.2. Khảo sát một vài đặc tính sinh lý, sinh hoá của chủng vi khuẩn được chọn:

a. Xác định khả năng cố định đạm: dùng phương pháp Kjeldahl.

Tiến hành: Hút 10ml dịch vi khuẩn đã nuôi cấy trên môi trường NFb bán lỏng trong 96 giờ đem vô cơ hoá. Bằng phương pháp Kjeldahl xác định đạm tổng trong 1 lít dịch nuôi cấy. Từ đó xác định được khả năng cố định đạm của từng chủng.

b. Hình thái:

Quan sát thô đại dạng khuẩn lạc khi nuôi cấy ở nhiệt độ phòng trong 5 ngày trên môi trường NFb rắn có bổ sung đỏ công-gô.

Quan sát hiển vi (trạng thái sống, Gram, tiên mao) chủng vi khuẩn được chọn từ những dạng khuẩn lạc thu được từ quá trình phân lập trên.

c. Đặc tính sinh lý sinh hoá:

• Ảnh hưởng của nhiệt độ:

Nuôi cấy chủng vi khuẩn được chọn trên môi trường Dobereiner, sau 40 giờ ở điều kiện nhiệt độ khác nhau. Lấy mẫu, xác định khả năng phát triển của vi khuẩn thể hiện gián tiếp qua độ đục của dịch nuôi cấy (sử dụng bước sóng 610 nm).

• Ảnh hưởng của pH:

Nuôi cấy chủng vi khuẩn được chọn trên môi trường Dobereiner, sau 72 giờ ở điều kiện pH khác nhau. Lấy mẫu, xác định khả năng phát triển của vi khuẩn thể hiện gián tiếp qua độ đục của dịch nuôi cấy (sử dụng bước sóng 610 nm).

• Khả năng sử dụng nguồn carbon:

+ Trên môi trường NFb bán rắn : Thay thế 5g D,L-acid malic bằng 5g nguồn carbon (glucose, sucrose, citrat, α -cetoglutarate). Quan sát sự chuyển màu môi trường sau 72 giờ ủ thông qua chất chỉ thị màu bromthymol blue sẵn có trong thành phần của môi trường.

+ Trên môi trường Andrate : Quan sát sự chuyển màu môi trường sau 24 giờ ủ do môi trường chứa chất chỉ thị màu fuchsin acid.

• Khả năng khử nitrat:

Nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường cao thịt-pepton được thêm 0,2% KNO_3 trong 4 ngày bằng ống nghiệm chứa ống Durham. Nếu:

- + Khử hoàn toàn : dùng ống Durham. Nếu vi khuẩn khử nitrat thành nitơ phân tử thì ống Durham chứa bọt khí sau một thời gian ủ.
- + Khử thành nitrit: Sử dụng phản ứng màu iod-tinh bột. Bởi vì khi thêm HCl, ZnCl/KI và tinh bột vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn 4 ngày thì nitrit oxy hoá iodur kẽm tạo ra iod. Khi đó môi trường chuyển sang màu xanh tím.

II.3. Bước đầu nuôi cấy vi khuẩn trên chất mang để làm phân vi sinh:

Tiến hành:

- + Chọn thời gian nuôi cấy mà tại đó thu được lượng sinh khối lớn nhất: dùng môi trường Doberienner, cấy dịch tế bào đã được hoạt hóa 24 giờ. Tiến hành đo trị số mật độ quang ở những thời điểm (0, 6, 12, 18, 24, 30 giờ) ở bước sóng 610nm.
- + Chuẩn bị chất mang: cho chất mang vào lọ thuỷ tinh, hấp ở 0,5 atm trong 2 giờ. Sau đó bổ sung thêm môi trường Doberier đã khử trùng theo tỷ lệ môi trường:chất mang = 1ml:10g.
- + Sơ bộ tạo chế phẩm phân vi sinh: cho 1ml dịch nuôi cấy tế bào thu được ở thời điểm được chọn trên vào 80g chất mang. Trộn đều. Ủ 7 ngày.
- + Khảo sát mật độ tế bào có trong chế phẩm sau 7 ngày: bằng phương pháp đếm khuẩn lạc.

Sử dụng giống chọn lọc được từ quá trình phân lập và chất mang là : than bùn, alginat với tỷ lệ giống: chất mang = 1ml: 80g.

Tạo được 4 chế phẩm:

- + A_1T : chủng A_1 với chất mang là than bùn.
- + A_1A : chủng A_1 với chất mang là alginat.
- + A_4T : chủng A_4 với chất mang là than bùn.
- + A_4A : chủng A_4 với chất mang là alginat.

II.4. Khảo sát ảnh hưởng của chế phẩm phân vi sinh lên cây mạ lúa:

- Khử trùng đất: hấp khử trùng đất ở 1 atm trong 2 giờ.
- Chuẩn bị hạt nảy mầm.
- Tiến hành 6 lô thí nghiệm: mỗi lô, gieo 50 hạt giống nảy mầm vào khay chứa đất đã hấp khử trùng.
 - + Đối chứng (2 lô): Không gây nhiễm và hạt ngâm với than bùn không có vi khuẩn.
 - + Bốn lô gây nhiễm tương ứng với 4 loại chế phẩm: Xử lý 1g chế phẩm cho 50 hạt trong 1 giờ 30 phút.
- Sau 15 ngày, quan sát cây mạ:
 - + Sử dụng phương pháp thống kê và phép tính trung bình cộng để tính tổng chiều dài lá, chiều dài rễ.
 - + Đánh giá sơ bộ bằng mắt thường: màu sắc lá, bề rộng phiến lá, ..

II.5. Phân lập trở lại để kiểm tra sự hiện diện của *Azospirillum sp.*:

Sau 15 ngày gây nhiễm trên hạt giống nảy mầm, chúng tôi phân lập lại từ rễ cây ở những lô được xử lý chế phẩm phân vi sinh để kiểm tra lại khả năng gây nhiễm của chế phẩm này.

Sử dụng môi trường NFb rắn có bổ sung 15ml đỏ công-gô để kiểm chứng sự hiện diện của *Azospirillum sp.* (tạo khuẩn lạc màu đỏ).

Kết quả – biện luận**1. Phân lập chủng *Azospirillum*:**

Qua quan sát thô đại dạng khuẩn trên môi trường NFb có đở công-gô xác định được 4 chủng:

Bảng 1. Dạng khuẩn lạc trên môi trường NFb có đở công-gô:

	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄
Hình dạng	Lớn, màu đỏ tươi, lồi, tròn, láng.	Nhỏ, màu đỏ tươi, lồi, tròn, láng.	Nhỏ, màu đỏ đậm, hơi lồi, tròn.	Lớn, màu đỏ tươi, gồ cao, mép nhăn.

2. Khảo sát một vài đặc tính sinh lý, sinh hoá của chủng vi khuẩn được chọn:**a. Xác định khả năng cố định đạm:**

Nuôi cấy chủng vi khuẩn trên môi trường NFb bán lỏng trong 96 giờ, lấy mẫu đem xác định hàm lượng đạm tổng. Hàm lượng đạm tổng thể hiện khả năng cố định đạm của chủng vi khuẩn. Kết quả được ghi nhận trong bảng 2.

Bảng 2. Khả năng cố định đạm của 4 chủng thu được.

	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄
Hàm lượng đạm (mg/l)	128	60	81	136

Qua kết quả thu được, chúng tôi nhận thấy chủng A₁ và A₄ có khả năng cố định đạm mạnh, trong đó chủng A₄ đạt hàm lượng cao nhất (136 mg/l). Do đó, chúng tôi chọn chủng A₁, A₄ để khảo sát tiếp.

b. Hình thái:

Quan sát hiển vi cho thấy :

- + Chủng A₁: di động, Gram âm, có 2 tiên mao ở 1 đầu.
- + Chủng A₄: di động, Gram âm, có 1 tiên mao ở 1 đầu.

c. Đặc tính sinh lý sinh hoá:• **Ảnh hưởng của nhiệt độ:**

Nuôi cấy chủng A₁, A₄ trên môi trường Doberienner ở điều kiện nhiệt độ khác nhau, chúng tôi thấy rằng chủng A₁ có giới hạn nhiệt độ 20-40⁰C, trong đó nhiệt độ tối thích là 30±1⁰C; và chủng A₄ có giới hạn nhiệt độ 30-37⁰C, trong đó nhiệt độ tối thích là 35±1⁰C.

• **Ảnh hưởng của pH:**

Nuôi cấy chủng A₁, A₄ trên môi trường Doberienner ở điều kiện pH khác nhau, chúng tôi thấy rằng: chủng A₁ 72 giờ có giới hạn pH từ 5,2-7,6, trong đó pH_{opt} = 6,8; và chủng A₄ có giới hạn pH từ 5-9, trong đó pH_{opt} = 6.

• **Khả năng sử dụng nguồn carbon:**

- + Sau 72 giờ nuôi cấy chủng vi khuẩn trên môi trường NFb bán rắn, quan sát sự chuyển màu môi trường và kết quả được thể hiện ở bảng 3.
- + Sau 24 giờ nuôi cấy chủng vi khuẩn trên môi trường Andrade, quan sát sự chuyển màu môi trường và ghi nhận kết quả trong bảng 4.

Kết quả cho thấy: cả 2 chủng A₁, A₄ đều sử dụng được glucose, sucrose khi nuôi cấy trong môi trường có đạm hoặc vô đạm.

Bảng 3. Khả năng sử dụng nguồn carbon của chủng A₁, A₄ trong môi trường bán rắn vô đạm.

	A ₁	A ₄
Glucose	+	+
Sucrose	+	+
Citrat	-	-
α-cetoglutarate	-	-

Bảng 4. Khả năng sử dụng nguồn carbon của chủng A₁, A₄ trong môi trường dinh dưỡng có đạm.

	A ₁	A ₄
Glucose	+	+
Sucrose	+	+
Myo-inositol	+	+

• **Khả năng khử nitrat:**

Sau 4 ngày nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường cao thịt-pepton được thêm 0,2% KNO₃, kết quả cho thấy:

- + Chủng A₁, A₄ không khử nitrat hoàn toàn thành nitơ phân tử vì trong ống Durham không có bọt khí.
- + Cả 2 chủng A₁, A₄ đều có khả năng khử nitrat thành nitrit vì môi trường chuyển màu rõ rệt khi thực hiện phản ứng màu iod-tinh bột.

Do chưa có điều kiện khảo sát chi tiết về một số đặc điểm phân loại đến loài nên chúng tôi chỉ sử dụng vài đặc tính trên để tạo điều kiện cho vi khuẩn tăng trưởng tối hảo nhằm nhân giống và tiến hành tạo chế phẩm phân vi sinh.

Qua khảo sát tính đặc trưng trên môi trường đổ công gô và vài đặc tính về hình dạng: di động, Gram âm, tiên mao, chúng tôi có thể kết luận chủng vi khuẩn A₁, A₄ đúng là giống *Azospirillum*.

3. Bước đầu nuôi cấy vi khuẩn trên chất mang để làm phân vi sinh:

- + Chọn được thời gian nuôi cấy để thu được sinh khối tế bào cao nhất:

Nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường Doberier, lấy mẫu và đo trị số mật độ quang ở bước sóng 610 nm tại những thời điểm khác nhau, chúng tôi ghi nhận kết quả trong bảng 5. Sự phát triển của chủng A₁, A₄ theo thời gian được thể hiện qua trị số mật độ quang

Bảng 5. Trị số mật độ quang OD₆₁₀ của chủng A₁, A₄ tại các thời điểm khác nhau.

Giờ	0	6	12	18	24	30
Chủng						
A ₁	0,003	0,0013	0,026	0,030	0,050	0,050
A ₄	0,003	0,0022	0,043	0,050	0,053	0,044

Chúng tôi nhận thấy từ 0-18 giờ trị số mật độ quang tăng dần và đạt cao nhất tại thời điểm 24 giờ, sau đó gần như không thay đổi. Điều này chứng tỏ vi khuẩn phát triển mạnh từ 24-30 giờ nuôi cấy. Do đó chúng tôi chọn thời điểm 24 giờ để có thể thu được lượng sinh khối cao nhất.

Dùng phương pháp đếm khuẩn lạc để xác định mật độ tế bào vi khuẩn. Kết quả cho thấy tại thời điểm 24 giờ mật độ tế bào chủng A₁ và A₄ tương ứng là $1,9 \times 10^6$ và $1,5 \times 10^7$ tb/ml.

- + Sơ bộ tạo chế phẩm phân vi sinh:

Cấy chủng A₁, A₄ lên chất mang là alginat, than bùn theo tỷ lệ chủng:chất mang= 1ml:80g do đó xem như lượng tế bào ban đầu trên chất mang là $2,38 \times 10^4$ tb/g đối với chủng A₁ và $1,88 \times 10^5$ tb/g đối với chủng A₄.

Chúng tôi thu được 4 dạng chế phẩm là A₁A, A₁T, A₄A, A₄T. Bằng phương pháp đếm khuẩn lạc chúng tôi xác định mật độ tế bào trên chất mang sau 7 ngày ủ (thể hiện trong bảng 6):

Bảng 6. Mật độ tế bào trong chế phẩm sau 7 ngày:

Chủng	MĐTB	Ban đầu (tb/g)	Sau 7 ngày ủ (tb/g)	
			Alginate	Than bùn
A ₁		2,38x10 ⁴	2,50 x 10 ⁸	4,00 x 10 ⁸
A ₄		1,88x10 ⁵	1,50 x 10 ⁹	2,50 x 10 ⁹

Sau 7 ngày ủ với chất mang, chế phẩm đạt mật độ tế bào cao : 4,00x10⁸-2,50x10⁹ tb/g.

4. Khảo sát ảnh hưởng của chế phẩm phân vi sinh lên cây mạ lúa:

Tiến hành 6 lô thí nghiệm gồm 2 lô đối chứng và 4 lô gây nhiễm tương ứng với 4 loại chế phẩm, mỗi lô sử dụng 50 hạt giống nảy mầm. Sau 15 ngày, quan sát và dùng phương pháp thống kê, trung bình cộng tính chiều dài lá, chiều dài rễ. Chúng tôi ghi nhận kết quả trong bảng 7:

Bảng 7. Ảnh hưởng của chế phẩm phân vi sinh lên cây mạ lúa thể hiện qua chiều dài lá, chiều dài rễ (cm) :

	Đối chứng	A ₁ T	A ₄ T	A ₁ A	A ₄ A
CD lá	27,60	37,60	39,60	30,40	33,60
CD rễ	7,250	7,30	9,60	8,46	8,30

Kết quả cho thấy, cây mạ ở 2 lô đối chứng không có sự khác biệt nào về chiều dài lá, chiều dài rễ. Điều này chứng tỏ than bùn không ảnh hưởng lên sự phát triển của cây. Còn khi gây nhiễm bằng chế phẩm phân vi sinh thì cây có sự khác biệt rõ ràng: tăng chiều dài lá, chiều dài rễ. Sự phát triển của hệ lá giúp cây quang hợp, tích lũy nhiều chất dinh dưỡng hơn, còn sự phát triển của bộ rễ giúp cây đứng vững hơn. Hiện tượng này giúp cho cây phát triển tốt hơn trong giai đoạn kế tiếp.

Ngoài ra, cây mạ có màu lá xanh đậm, phiến lá rộng, cây cao, số lượng rễ và trọng lượng khô của cây lớn, cây đẻ nhánh nhiều, thân cây mập và cứng hơn rõ rệt.

5. Phân lập trở lại để kiểm tra sự hiện diện của *Azospirillum sp.*:

Phân lập kiểm chứng trên môi trường NFb rắn có bổ sung 15ml đồ công-gô thấy xuất hiện khuẩn lạc màu đỏ đặc trưng của *Azospirillum sp.*. Chứng tỏ có sự hiện diện của *Azospirillum sp.* ở vùng rễ cây mạ được gây nhiễm.

Kết luận

Qua nghiên cứu chúng tôi thấy rằng khi sử dụng chất mang là Alginate thì cả 2 chủng đều có hiệu quả tốt, còn khi sử dụng than bùn làm chất mang thì chỉ có chủng A₄ cho thấy rõ hiệu quả: cây mạ có hệ rễ và chiều dài lá phát triển, lá xanh đậm hơn, phiến lá rộng, cây cao, số lượng rễ và trọng lượng khô của cây lớn, cây đẻ nhánh nhiều, thân cây mập và cứng hơn rõ rệt. Điều này chứng tỏ chế phẩm phân vi sinh có tác động khả quan lên sự tăng trưởng của cây lúa.

ISOLATING AND STUDYING SOME CHARACTERISTICS OF *AZOSPIRILLUM SP.* . PRELIMINARILY STUDYING THEIR EFFECTS ON RICE SPROUTS

Trinh Thi Hong

ABSTRACT: Isolating *Azospirillum* bacterium from soil and root of rice in field (Vinh An town – Dong Nai province, Thu Duc – Ho Chi Minh city). The 4 strains are collected. Among them there are A₁ and A₄ strain fixing nitrogen strongly, respectively 128 mg/l và 136mg/l.

Studying some characteristics of A₁ and A₄ for preliminarily making biofertilization product by immobilizing them on the substrate (alginat, peat) and their effect on germinative seeds to rice sprouts in the laboratory conditions. The results show the control samples (no supporting the biofertilization) have length of leaves and roots are 27.60 cm and 7.25 cm respectively. Whereas the experimental samples support:

- + With the biofertilization product containing alginat substrate, the A₁ strain has length of leaves: 30.40 cm, A₄ strain : 33.60 cm; and length of roots in order of 8.46 and 8.30 cm, respectively.
- + With the biofertilization product containing peat substrate, the A₁ strain has length of leaves: 37.60 cm, A₄ strain : 36.90 cm; and length of roots in order of 7.30 and 9.60 cm.

Beside, they have dark green leaves, wide leaf-blades, high haulms, a lot of roots, higher dry weight, more outshooting , bigger and harder haulms.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đường Hồng Dật và các tác giả khác – *Giáo trình vi sinh vật học trồng trọt*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp, 1979.
2. Nguyễn Thị Phương Chi, Nguyễn Ngọc Dũng, Hà Thị Hồng Thanh – *Sử dụng Azospirillum để sản xuất phân vi sinh cho lúa*. Tạp chí sinh học, số 17, tháng 3 năm 1995.
3. GS. TS Bezborodov A.M., và những tác giả khác – *Công nghệ sinh học và một số ứng dụng tại Việt Nam*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp, 1994.
4. Lindsay I, Sly and Stackebrandt – *Description of Skemanella parooensis gen. Nov., sp. Nov. to accommodate Conglomeromonas largomobilis subsp. largomobilis to the genus Azospirillum*. International Journal of Systemetic and Evolutionary Microbiology (1999), 49,541-544.
5. John G.Hotl, noel R. Kring, Peter H. Sneath, James T. Stanley, Stanley T. William – *Bergey's Manual of determinative Bacteriology, 9th Edition., volum 1*. Copyright 1994 William and Wilkins 428 East Presion Street Baltimore, Maryla† 121201.USA.
6. Barbara Echert, et al. – *Azospirillum doebereineriae sp. Nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C₄-grass Miscanthus*. International Journal of Systemetic and Evolutionary Microbiology (1999).
7. Yoav Bashan, et al. 1993 – *Isolation and Characterization of Plan Growth Promoting Rhizobacteria*. Methods in plant Molecular Biology and Biotechnology. P.335, 336.