

BƯỚC ĐẦU PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN NỐT SẦN CỘNG SINH TRÊN RỄ LẠC Ở TỈNH THỪA THIÊN HUẾ

Trần Thị Xuân An, Nguyễn Bá Hai, Trần Thị Xuân Phương,
Lê Thị Hương Xuân, Lại Viết Thắng, Trương Thị Diệu Hạnh*

1. Đặt vấn đề

Sử dụng phân bón sinh học là một trong những biện pháp hữu hiệu nhằm nâng cao năng suất, phẩm chất cây trồng, đồng thời góp phần xây dựng một nền nông nghiệp phát triển bền vững và ổn định. Hiện nay phân sinh học được nghiên cứu và sử dụng khá phổ biến trên thế giới cũng như ở Việt Nam.

Chế phẩm vi khuẩn nốt sần (VKNS) cũng là một loại phân sinh học được sử dụng cho cây họ đậu để tăng cường khả năng cố định nitơ của vi khuẩn nốt sần nhằm nâng cao năng suất và phẩm chất cây trồng. Tuy nhiên hiệu quả của chế phẩm vi khuẩn nốt sần phụ thuộc vào nhiều yếu tố như điều kiện tự nhiên, đặc điểm canh tác của từng vùng... và đặc biệt là phụ thuộc vào hoạt tính của VKNS có trong chế phẩm.

Đề tài này được thực hiện nhằm mục đích chọn và thuần khiết một số chủng có khả năng lây nhiễm, khả năng cạnh tranh với các nhóm vi sinh vật khác cũng như có hiệu quả cao để làm vật liệu cho việc sản xuất chế phẩm phân VKNS bón cho lạc tại địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế.

2. Đối tượng, nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu: các chủng VKNS phân lập từ nốt sần rễ lạc thu thập ở một số vùng trồng lạc chính ở Thừa Thiên Huế.

2.2. Nội dung nghiên cứu

- Phân lập VKNS trên rễ lạc.
- Chọn và thuần khiết các chủng VKNS đã phân lập.
- Đánh giá khả năng lây nhiễm, khả năng cạnh tranh với các nhóm vi sinh vật khác của các chủng VKNS đã chọn, đồng thời nghiên cứu hiệu quả của việc nhiễm các chủng này đến năng suất lạc.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phân lập VKNS trên rễ lạc

- Địa điểm thu mẫu: chúng tôi đã tiến hành thu thập nốt sần ở giai đoạn lạc ra hoa rộ. Địa điểm thu mẫu là một số vùng trồng lạc chủ yếu ở Thừa Thiên Huế, bao gồm xã Quảng Thái, huyện Quảng Điền; xã Phong Chương, Phong An, huyện Phong Điền; Trung tâm Nghiên cứu cây trồng Tứ Hạ, huyện Hương Trà; phường Hương Long, phường Kim Long, thành phố

* Khoa Nông học, Trường Đại học Nông lâm Huế.

Huế; Vườn thí nghiệm Khoa Nông học, Trường Đại học Nông lâm Huế; xã Vinh Thái, Vinh Phú, huyện Phú Vang.

- Thời gian thu mẫu: vụ Đông-Xuân 2007-2008, lấy mẫu ở giai đoạn lạc ra hoa rộ.

- Môi trường để phân lập VKNS là môi trường YMA.

- Phương pháp phân lập: để phân lập VKNS chúng tôi sử dụng phương pháp Koch (nuôi cấy trên môi trường đặc).

2.3.2. Chọn các chủng vi khuẩn điển hình và sơ chế chế phẩm

- Sau khi nuôi cấy 5 ngày, quan sát các khuẩn lạc mọc trong hộp petri và chọn các chủng có đặc điểm khuẩn lạc điển hình, tiến hành thuần khiết và sơ chế chế phẩm vi khuẩn nốt sần với chất mang là than bùn có bổ sung thêm một số chất phụ gia (saccharoza, P, Mo, Fe).

2.3.3. Nhiễm chế phẩm vào hạt giống lạc trước khi gieo và đánh giá hiệu quả của các chủng VKNS

* Thời gian thí nghiệm: vụ Đông-Xuân 2007-2008 và 2008- 2009.

* Địa điểm thí nghiệm: Trung tâm Nghiên cứu cây trồng Tứ Hạ, huyện Hương Trà, tỉnh Thừa Thiên Huế.

* Công thức thí nghiệm: 7 công thức (1 công thức đối chứng - không nhiễm chế phẩm, và 6 công thức lần lượt nhiễm các chủng NH1, NH2, NH4, PC13, QT4, KL8).

* Các tiêu chí đánh giá:

- Đánh giá khả năng lây nhiễm thông qua số lượng nốt sần trên rễ lạc.

- Đánh giá hiệu quả thông qua chất lượng nốt sần và một số chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển cũng như năng suất lạc.

- Đánh giá khả năng cạnh tranh với các nhóm vi sinh vật khác thông qua số lượng vi khuẩn nốt sần và tổng số vi sinh vật trong đất trồng lạc.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Kết quả phân lập VKNS

Qua phân lập từ các mẫu nốt sần trên rễ lạc thu thập trong giai đoạn lạc ra hoa rộ ở 9 vùng trồng lạc khác nhau ở Thừa Thiên Huế, chúng tôi đã phân lập được 41 chủng, 3 địa điểm có số chủng nhiều nhất là Vườn thí nghiệm Khoa Nông học, Hương Long và Phong Chương, mỗi địa điểm phân lập được 6 chủng, tiếp đến là Quảng Thái 5 chủng, Trung tâm Nghiên cứu cây trồng Tứ Hạ 4 chủng, các vùng còn lại mỗi vùng có 3 chủng.

Kết quả sơ tuyển cho thấy, trong số 41 chủng phân lập được ở 9 vùng trồng lạc, có 23 chủng sinh trưởng phát triển yếu, kích thước khuẩn lạc rất nhỏ, đường kính chưa đạt 1,5mm, có 18 chủng có kích thước khuẩn lạc lớn hơn 1,5mm, trong đó có 6 chủng phân lập được ở Vườn thí nghiệm Khoa Nông học, 2 chủng ở Kim Long, 2 chủng ở Quảng Thái, 1 chủng ở Vinh Thái, 3 chủng ở Vinh Phú, 1 chủng ở Phong An và 3 chủng ở Phong Chương.

3.2. Đặc điểm khuẩn lạc của các chủng VKNS đã chọn lọc

Từ 18 chủng VKNS đã sơ tuyển, chúng tôi tiếp tục thuần khiết và quan sát khuẩn lạc tạo thành. Kết quả quan sát được mô tả ở bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm khuẩn lạc của một số chủng VKNS.

TT	Mã chủng	Hình dạng	Kích thước (mm)	Màu sắc	Mép vết mọc	Bề mặt
1	NH1	Tròn	5,50	Tím nhạt	Đều, viền trong suốt	Lõm giữa, nhầy nhót
2	NH2	Bầu dục	5,50	Tím nhạt	Đều, viền màu kem	Nhầy nhót
3	NH3	Tròn	2,60	Tím đậm	Đều	Nhầy nhót
4	NH4	Tròn	5,30	Tím nhạt	Đều, viền trong suốt	Nhầy nhót
5	NH5	Tròn	4,54	Tím nhạt	Đều, viền trong suốt	Hơi lõm giữa, nhầy nhót
6	NH6	Bầu dục	4,75	Tím nhạt	Không đều, viền trong suốt	Nhầy nhót
7	QT3	Tròn	4,85	Tím nhạt	Đều, viền màu kem, bên trong trắng sữa	Dẹt, nhầy nhót
8	QT4	Tròn	5,65	Tím nhạt	Đều, viền trắng sữa	Hơi dẹt, nhầy nhót
9	PC9	Tròn	4,25	Tím đậm	Đều, viền trong suốt	Hơi lõm giữa, nhầy nhót
10	PC13	Tròn	5,30	Tím nhạt	Đều, viền trong suốt	Dẹt, hơi lõm giữa, nhầy nhót
11	PC14	Tròn	5,20	Tím nhạt	Đều, viền trong suốt	Dẹt, hơi lõm giữa, nhầy nhót
12	VP1	Tròn	4,54	Tím nhạt	Đều, viền màu kem	Lồi, nhầy nhót
13	VP2	Tròn	2,50	Tím nhạt	Đều, viền màu kem	Lồi, nhầy nhót
14	VP3	Tròn	1,52	Tím đậm	Đều, viền trong suốt	Lồi, nhầy nhót
15	PĐ2	Tròn	2,92	Tím nhạt	Đều, viền màu kem, bên trong trắng sữa	Dẹt, nhầy nhót
16	VT3	Tròn	1,50	Tím nhạt	Đều	Lồi, nhầy nhót
17	KL8	Tròn	5,35	Tím nhạt	Đều, viền màu kem	Hơi lồi, nhầy nhót
18	KL7	Tròn	3,60	Tím nhạt	Đều, viền trong suốt, bên trong trắng sữa	Dẹt, hơi lõm giữa, nhầy nhót

Kết quả cho thấy, trong số 18 chủng sơ tuyển ban đầu, có 7 chủng có kích thước khuẩn lạc tương đối lớn, đường kính khuẩn lạc lớn hơn 5mm, đó là các chủng NH1, NH2, NH4, QT4, PC13, PC14 và KL8. Nhóm có đường kính khuẩn lạc đạt từ 4-5mm có 5 chủng và nhỏ hơn 4mm có 6 chủng.

Về hình dạng, hầu hết các chủng đều có hình tròn (16 chủng), 2 chủng có hình hơi bầu dục (chủng NH2 và NH6).

Về màu sắc khuẩn lạc, có 3 chủng có màu tím đậm (NH3, PC9 và VP3), 15 chủng còn lại đều có màu tím nhạt.

Về mép vết mọc, chỉ có 1 chủng có mép vết mọc không đều (chủng NH6), còn lại tất cả các chủng đều có mép vết mọc đều. Có 8 chủng có viền mép trong suốt, 4 chủng có viền mép màu kem, 1 chủng viền mép có màu trắng sữa, riêng 3 chủng có đặc điểm khác hẳn: chủng QT3 và PĐ2 có viền mép màu kem, bên trong mép có màu trắng sữa, chủng KL7 có viền mép trong suốt, bên trong trắng sữa.

Về đặc điểm của bề mặt khuẩn lạc: tất cả các chủng đều có khuẩn lạc nhầy nhót, 4 chủng có bề mặt khuẩn lạc lồi, đó là các chủng VP1, VP2, VP3 và VT3, 3 chủng có khuẩn lạc dẹt, 3 chủng bề mặt khuẩn lạc hơi lõm giữa (chủng PC13, PC14, KL7), 2 chủng QT3, PĐ2 bề mặt khuẩn lạc dẹt, chủng QT4 hơi dẹt, chủng NH5 và PC9 hơi lõm giữa, chủng NH1 lõm giữa và KL8 hơi lồi.

3.3. Đánh giá hiệu quả của việc nhiễm các chủng VKNS đến sinh trưởng phát triển và năng suất lạc

Để chọn được chủng VKNS có hiệu quả nhất đối với sinh trưởng phát triển và năng suất lạc, chúng tôi đã tiến hành phối chế 6 chế phẩm VKNS từ 6 chủng VKNS đã chọn lọc trong số 18 chủng ở trên và cho lây nhiễm

vào hạt lạc trước khi gieo. Qua theo dõi sinh trưởng phát triển và năng suất lạc, chúng tôi thu được kết quả sau.

3.3.1. Ảnh hưởng của việc nhiễm các VKNS đến một số chỉ tiêu sinh trưởng của lạc

Để đánh giá hiệu quả của các chủng VKNS chúng tôi đã tiến hành theo dõi một số chỉ tiêu sinh trưởng của lạc khi được nhiễm vi khuẩn. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của việc nhiễm các chủng VKNS đến sinh trưởng của lạc.

Chỉ tiêu Công thức	Chiều cao cây cuối cùng (cm)	Tổng số cành/cây (cành)	Chiều dài cành cấp 1 đầu tiên (cm)	Tổng số lá/thân chính (lá)	Năng suất chất xanh (tấn/ha)
Đối chứng	32,80c	6,80d	37,01d	15,13e	10,07c
NH1	36,67a	8,60a	40,43a	16,33a	10,90a
NH2	33,97d	7,80c	38,63c	16,00c	10,27b
PC13	35,03b	8,40a	40,06b	16,27ab	10,80a
NH4	35,10b	8,40a	39,75b	16,20b	10,77a
QT4	33,87d	7,93bc	39,04c	15,84d	10,50ab
KL8	34,10c	8,07b	39,12c	15,93cd	10,73a

Như vậy, 6 chủng VKNS đưa vào thí nghiệm đều có ảnh hưởng tốt đối với sinh trưởng của lạc, trong đó chủng NH1, PC13 và NH4 là nổi bật nhất.

3.3.2. Ảnh hưởng của việc nhiễm các chủng VKNS đến các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất lạc

Năng suất là chỉ tiêu phản ánh đầy đủ nhất hiệu quả của việc lây nhiễm VKNS cho lạc. Thông qua chỉ tiêu này chúng ta có thể đánh giá được khả năng cố định N_2 của các chủng VKNS cao hay thấp. Kết quả theo dõi năng suất lạc ở bảng 3 đã chứng tỏ khá rõ vai trò của VKNS trong việc nâng cao năng suất lạc

Bảng 3. Ảnh hưởng của việc nhiễm các chủng VKNS đến năng suất lạc.

Chỉ tiêu Công thức	Số quả chắc/cây (quả)	P 100 quả (gam)	P 100 hạt (gam)	NSTT (tạ/ha)	NSTT so với ĐC (%)
Đối chứng	12,80c	122,3c	53,43d	22,37e	-
NH1	16,80a	136,0a	60,20a	27,63a	124,64
NH2	14,73b	132,3b	57,87c	24,03d	107,25
PC13	15,57b	139,3a	58,57b	26,90ab	121,14
NH4	14,93b	138,3ab	58,67b	25,97bc	116,36
QT4	15,00b	137,7ab	58,57b	25,30cd	113,28
KL8	15,53b	138,3ab	58,80b	25,80bc	115,65

Trong số 6 chủng đưa vào thí nghiệm để đánh giá thì có 4 chủng (NH1, PC13, NH4 và KL8) có hiệu quả rõ rệt so với đối chứng, đặc biệt khi nhiễm chủng NH1 cho lạc thì các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất lạc đều cao hơn hẳn so với đối chứng không nhiễm và các công thức nhiễm các chủng khác.

3.4. Ảnh hưởng của việc nhiễm các chủng VKNS đến một số chỉ tiêu nốt sần trên rễ lạc

Để đánh giá khả năng lây nhiễm cũng như khả năng cố định N_2 của các chủng VKNS, chúng tôi đã theo dõi số lượng nốt sần trên rễ lạc ở thời kỳ lạc ra hoa rõ, đồng thời đánh giá chất lượng nốt sần thông qua khối lượng nốt sần và hàm lượng protein trong nốt sần, kết quả thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của việc nhiễm các chủng VKNS đến nốt sần trên rễ lạc.

Chỉ tiêu Công thức	Số lượng nốt sần/cây (nốt)	Khối lượng nốt sần/cây (gam)	Hàm lượng protein (%)
Đối chứng	185,00e	0,21f	16,87
NH1	317,00a	0,50a	24,60
NH2	258,70c	0,34e	19,56
PC13	301,00ab	0,46b	21,56
NH4	295,50bc	0,40c	21,64
QT4	244,00c	0,34e	20,70
KL8	221,60d	0,35d	22,99

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, khi nhiễm các chủng VKNS vào hạt giống lạc trước khi gieo đều làm tăng khả năng lây nhiễm của VKNS vào rễ lạc. Hai chủng có khả năng lây nhiễm cao hơn cả là NH1 và PC13. Mặt khác, chất lượng nốt sần trên rễ lạc ở các công thức được nhiễm chủng NH1 là tốt nhất, tiếp đến là 3 chủng PC13, NH4 và KL8.

3.5. Ảnh hưởng của việc nhiễm các chủng VKNS đến số lượng vi sinh vật trong đất trồng lạc

Để đánh giá khả năng cạnh tranh của các chủng VKNS với các nhóm vi sinh vật khác chúng tôi tiến hành phân lập tổng số vi sinh vật hiếu khí (VSVHK) cũng như VKNS trong đất sau khi thu hoạch lạc, kết quả được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của việc nhiễm các chủng VKNS đến số lượng vi sinh vật trong đất trồng lạc.

Chỉ tiêu Công thức	Tổng số VSVHK (x 10^9 CFU/g đất)	VKNS (x 10^6 CFU/g đất)	Tỷ lệ VKNS/VSVHK (%)
Đối chứng	228,0	155,0	0,068
NH1	319,0	240,0	0,075
NH2	292,0	207,3	0,071
PC13	305,0	215,0	0,071
NH4	310,0	220,0	0,071
QT4	308,3	221,0	0,072
KL8	295,5	212,0	0,072

Kết quả thu được chứng tỏ rằng các chủng VKNS trong thí nghiệm đều có khả năng cạnh tranh cao so với các nhóm vi sinh vật khác trong môi trường, trong đó chủng NH1 là chủng có khả năng cạnh tranh cao nhất, tiếp đến là chủng QT4 và KL8, và thấp hơn cả là 3 chủng NH2, PC13 và NH4.

4. Kết luận và đề nghị

- Số lượng chủng VKNS phân lập được từ rễ lạc thu thập ở 9 địa điểm thuộc các vùng trồng lạc ở Thừa Thiên Huế khá phong phú, gồm có

41 chủng. Các vùng có số chủng tương đối nhiều là Hương Long, Phong Chương, Quảng Thái và Trung tâm Nghiên cứu cây trồng Tứ Hạ.

- Trong số 41 chủng VKNS phân lập từ nốt sần trên rễ lạc trồng ở Thừa Thiên Huế có 18 chủng có đặc điểm khuẩn lạc tương đối điển hình.

- Từ 18 chủng đã sơ tuyển có 6 chủng NH1, NH2, PC13, NH4, QT4, KL8 có tốc độ sinh trưởng mạnh mẽ khi nuôi cấy trên môi trường YMA (kích thước khuẩn lạc lớn hơn 5mm sau khi nuôi cấy 4 ngày).

- 6 chủng NH1, NH2, PC13, NH4, QT4, KL8 đều có khả năng xâm nhiễm vào rễ lạc khá tốt, có khả năng cạnh tranh với các nhóm vi sinh vật khác trong môi trường và có hiệu quả cao đối với sinh trưởng, phát triển cũng như năng suất cây lạc, đặc biệt là 3 chủng NH1, PC13 và KL8.

Như vậy, 3 chủng NH1, PC13 và KL8 là 3 chủng có nhiều đặc điểm tốt, cần tiếp tục nghiên cứu đầy đủ hơn về khả năng chống đỡ những thay đổi của điều kiện ngoại cảnh, tính bền vững về đặc tính di truyền, có khả năng thích ứng với độ phì của đất cũng như khả năng tồn dư lâu dài trong đất của 3 chủng này. Trước mắt có thể đưa 3 chủng này vào thử nghiệm phối chế phân VKNS bón cho lạc tại các vùng trồng lạc ở tỉnh Thừa Thiên Huế.

T T X A và cộng sự

TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH

1. Nguyễn Xuân Đường, Nguyễn Xuân Thành. *Giáo trình sinh học đất*. Nxb Nông nghiệp, Hà Nội, 1999.
2. Nguyễn Ngọc Quyên. "Nghiên cứu lựa chọn chủng *Bradyrhizobium japonicum* để sản xuất Nitrazin và ứng dụng cho cây đậu tương ở một số tỉnh miền Bắc Việt Nam". Luận án Tiến sĩ khoa học nông nghiệp, 1993.
3. Chu Thị Thơm (chủ biên). *Tìm hiểu về chế phẩm vi sinh vật dùng trong nông nghiệp*. Nxb Lao động, Hà Nội, 2006.
4. Chu Thị Thơm (chủ biên). *Kỹ thuật sản xuất, chế biến và sử dụng phân bón*. Nxb Lao động, Hà Nội, 2006.
5. Trần Cẩm Vân, Nguyễn Xuân Dũng, Lý Kim Bảng. "Khả năng hình thành nốt sần và một số đặc tính sinh học của chủng *Rhizobium* cộng sinh với cây họ Đậu cải tạo đất", Tạp chí *Sinh học* (3/1995).

TÓM TẮT

Trong số 41 chủng vi khuẩn nốt sần phân lập được từ nốt sần rễ lạc tại một số vùng trồng lạc chủ yếu ở tỉnh Thừa Thiên Huế, có 18 chủng có đặc điểm khuẩn lạc tương đối điển hình. Trong 18 chủng này có 6 chủng NH1, NH2, PC13, NH4, QT4, KL8 có tốc độ sinh trưởng mạnh mẽ, khả năng lây nhiễm cao, có khả năng cạnh tranh với các nhóm vi sinh vật khác trong môi trường, đồng thời có hiệu quả tốt đối với sinh trưởng và năng suất lạc, trong đó nổi bật nhất là 3 chủng NH1, PC13 và KL8.

ABSTRACT

ISOLATING AND EVALUATING INITIALLY SOME RHIZOBIA STRAINS WHICH ARE SYMBIOSIS INSIDE ROOT NODULES OF PEANUTS IN THỪA THIÊN HUẾ PROVINCE

We isolated 41 rhizobia strains from the samples of root nodules of peanuts in certain main peanuts growing in Thừa Thiên Huế province. Eighteen of them are typical rhizobia strains. We achieved 6 strains named NH1, NH2, PC13, NH4, QT4, KL8 which have a strong growth rate, highly infectious possibility and effective competition with other bacteria groups in soil environment. They are very useful in enhancing growth, developing and productivity of peanuts. Specially, the most three remarkable strains are NH1, PC13, KL8.