

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Lê Thị Huệ

**NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG GIỮ ẨM VÀ GIẢM MẶN CHO
CÁT SAN HÔ BẰNG VI KHUẨN CHỊU MẶN, SINH EPS
(EXOPOLYSACCHARIDE) PHÂN LẬP Ở TRƯỜNG SA**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Hà Nội - 2025

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Người hướng dẫn khoa học:

1. Người hướng dẫn khoa học 1: GS.TS. Lê Mai Hương
2. Người hướng dẫn khoa học 2: TS. Vũ Duy Nhân

Phản biện 1: PGS.TS. Trương Quốc Phong

Phản biện 2: PGS.TS. Phạm Bích Ngọc

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện, họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi giờ , ngày tháng năm 2025

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Quần đảo Trường Sa có vị trí chiến lược quan trọng nhưng điều kiện tự nhiên khắc nghiệt với khí hậu khô hạn, thiếu nước ngọt, đất cát san hô nghèo dinh dưỡng, kiềm hóa và nhiễm mặn, gây trở ngại lớn cho phát triển nông nghiệp phục vụ đời sống trên đảo. Trong bối cảnh biến đổi khí hậu và xâm nhập mặn gia tăng, nhu cầu cải tạo đất cát san hô thành đất canh tác bền vững là rất cấp thiết. Hiện nay, các giải pháp sinh học thân thiện môi trường, đặc biệt là ứng dụng vi khuẩn sinh exopolysaccharide (EPS), đang được quan tâm nhờ khả năng giữ nước, kết dính đất và hấp phụ muối. Tuy nhiên, tại Việt Nam, nghiên cứu về vi khuẩn bản địa sinh EPS nhằm cải tạo đất cát san hô vẫn còn hạn chế.

Từ thực tiễn đó, luận án "Nghiên cứu khả năng giữ ẩm và giảm mặn cho cát san hô bằng vi khuẩn chịu mặn, sinh EPS (exopolysaccharide) phân lập ở Trường Sa" được thực hiện, nhằm phân lập, tuyển chọn và phân tích đặc điểm sinh học – di truyền của các chủng vi khuẩn chịu mặn sinh EPS, đồng thời đánh giá hiệu quả cải tạo đất cát san hô thông qua khả năng giữ ẩm và giảm mặn, góp phần phát triển nông nghiệp bền vững tại vùng đảo xa bờ.

2. Mục tiêu nghiên cứu

- 1. Phân lập, tuyển chọn và phân tích được đặc điểm hệ gen chủng vi khuẩn chịu mặn, sinh EPS từ Quần đảo Trường Sa.
- 2. Đánh giá được khả năng giữ nước và giảm mặn của EPS từ chủng vi khuẩn tuyển chọn.
- 3. Bước đầu đánh giá được tiềm năng ứng dụng của chủng vi khuẩn tuyển chọn trong việc cải tạo cát san hô ở quy mô chậu vại.

3. Nội dung nghiên cứu

1. Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn bản địa từ Trường Sa có khả năng chịu mặn và sinh exopolysaccharide.

2. Giải trình tự hệ gen và dự đoán các con đường sinh tổng hợp exopolysaccharide và các gen liên quan đến khả năng chịu mặn ở chủng vi khuẩn tuyển chọn.

3. Nghiên cứu môi trường và điều kiện nuôi cấy thu nhận exopolysaccharide từ chủng vi khuẩn tuyển chọn.

4. Tinh sạch và xác định cấu trúc exopolysaccharide của chủng vi khuẩn tuyển chọn.

5. Đánh giá khả năng giữ nước và giảm mặn của exopolysaccharide từ chủng vi khuẩn tuyển chọn.

6. Thử nghiệm hiệu quả cải tạo cát san hô của chủng vi khuẩn chịu mặn, sinh exopolysaccharide ở quy mô chậu vại.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Tổng quan về đất khô hạn, mặn

Biến đổi khí hậu toàn cầu đang làm gia tăng diện tích đất khô hạn và nhiễm mặn, đe dọa nghiêm trọng an ninh lương thực. Các vùng đất này chiếm khoảng 40% bề mặt Trái đất, đặc trưng bởi lượng mưa thấp, bốc hơi mạnh, nghèo dinh dưỡng và tích lũy ion Na^+ , Cl^- . Nguyên nhân xuất phát từ cả tự nhiên (phong hóa, xâm nhập mặn) và nhân sinh (tưới tiêu, sử dụng nước mặn), dẫn đến tăng áp suất thẩm thấu, giảm hấp thu nước – dinh dưỡng và gây độc ion cho cây trồng.

1.2. Tình hình đất khô hạn, mặn ở Việt Nam

Tại Việt Nam, tình trạng đất khô hạn và mặn tập trung chủ yếu ở Đồng bằng sông Cửu Long, các tỉnh ven biển miền Trung và các đảo xa bờ như quần đảo Trường Sa. Đặc biệt, đất cát san hô ở Trường Sa là dạng đất đặc thù có nguồn gốc sinh vật biển, chứa đến 95% CaCO_3 , pH kiềm cao (8–9), cấu trúc hạt thô, độ xốp lớn nhưng khả năng giữ nước và dinh dưỡng rất thấp ($\text{CEC} < 5 \text{ meq}/100 \text{ g}$, độ ẩm $< 5\%$). Các yếu tố như bốc hơi nước mạnh, mưa thất thường, nước ngầm nhiễm mặn và hệ vi sinh vật đất nghèo nàn khiến đất

cát san hô ở các đảo nổi ở Trường Sa không phù hợp cho sản xuất nông nghiệp nếu không có các biện pháp cải tạo thích hợp.

1.3. Tổng quan về các phương pháp cải tạo đất khô hạn, mặn

Các phương pháp cải tạo đất khô hạn, mặn đã được nghiên cứu, bao gồm: (i) biện pháp cơ học như rửa mặn, che phủ; (ii) Các biện pháp sinh học và ứng dụng công nghệ sinh học như bổ sung mùn hữu cơ, biochar, vi sinh vật hữu ích, vi sinh vật sinh EPS để tăng hàm lượng dinh dưỡng và độ ẩm cho đất; (iii) biện pháp hóa lý như sử dụng thạch cao, bentonite kết hợp với che phủ đất để thay thế Na^+ và tăng khả năng giữ ẩm; và (iv) các biện pháp kết hợp khác có sự kết hợp đồng thời các biện pháp sinh học, hóa học và vật lý nhằm tối ưu hóa hiệu quả cải tạo, đảm bảo tính bền vững về lâu dài.

Tại Việt Nam, thách thức về đất bạc màu, nhiễm mặn, và khô hạn đang trở nên nghiêm trọng hơn dưới ảnh hưởng của biến đổi khí hậu, xâm nhập mặn và khai thác đất không hợp lý. Gần đây, nhiều hướng tiếp cận cải tạo đất đã được thử nghiệm và triển khai trên thực địa, bao gồm giải pháp lý-hóa, bổ sung vật liệu hữu cơ, kết hợp chế phẩm sinh học trong đó có vi sinh vật sinh EPS đã cho các kết quả thử nghiệm khả quan.

1.4. Tổng quan về vi khuẩn chịu mặn, sinh exopolysaccharide và ứng dụng trong cải tạo đất khô hạn mặn

Vi khuẩn chịu mặn là các vi khuẩn có thể phát triển trong cả điều kiện không có muối và nồng độ mặn cao, thường phân lập được từ đất mặn, đảo san hô, hồ muối... Chúng không chỉ sống được trong môi trường có nồng độ NaCl cao mà còn sản sinh các chất có hoạt tính sinh học để tăng khả năng chống chịu stress như EPS. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy EPS từ vi khuẩn chịu mặn có thể giúp giảm độc ion Na^+ , cải thiện đặc tính vật lý đất và hỗ trợ cây trồng vượt qua stress mặn. Vi khuẩn có khả năng chịu mặn nhờ 4 cơ chế đã được biết đến: (1) Cơ chế điều hòa áp suất thẩm thấu thông qua việc thải Na^+ ra ngoài tế bào, tích tụ K^+/Cl^- bên trong nội bào; (2) Ổn định cấu trúc bên ngoài tế bào nhờ cấu trúc thành tế bào có tính axit trên bề mặt; (3) Sự

tích tụ chất tan tương thích; (4) sinh EPS để tạo lớp màng biofilm bao bọc bên ngoài tế bào giúp tăng khả năng chống chịu stress.

Vi khuẩn sinh EPS phân bố rộng rãi và thuộc cả nhóm Gram âm và Gram dương, trong đó *Bacillus velezensis* được xem là loài có tiềm năng lớn nhờ khả năng sinh tổng hợp EPS phong phú với nhiều dạng khác nhau như levan, glucomannan và EPS axit với hàm lượng từ 0,504–75,5 g/L. EPS từ *B. velezensis* có cấu trúc đa dạng, gồm 2–4 loại monosaccharide. Loài này đã được biết đến với nhiều vai trò như tăng khả năng giữ nước, hấp phụ muối, kim loại nặng, tạo gel, thúc đẩy tăng trưởng cây dưới stress mặn,... do đó hứa hẹn nhiều tiềm năng trong cải tạo đất khô hạn mặn. Một số loài vi sinh vật sinh EPS như *Bacillus safensis*, *Paenibacillus polymyxa*, và *Rhizobium meliloti* đã được nghiên cứu và sử dụng trong các chương trình cải tạo đất trên khắp thế giới. Tại Việt Nam, chủ yếu tập trung vào các loại nấm men như *Lipomyces* sinh EPS để cải tạo đất.

EPS là polysaccharide ngoại bào được tiết ra trong quá trình sinh trưởng của vi sinh vật, giúp bảo vệ tế bào khỏi stress môi trường, đồng thời đóng vai trò then chốt trong hình thành biofilm và tương tác giữa các sinh vật trong đất. EPS có thể tồn tại dưới dạng homopolysaccharide (HoPS) hoặc heteropolysaccharide (HePS), được tổng hợp thông qua bốn con đường sinh học chính: Wzx/Wzy, ABC transporter, synthase và sucrase ngoại bào. Quá trình tổng hợp EPS có mối liên hệ chặt chẽ với hấp thụ và chuyển hóa đường, thường bắt đầu từ các con đường chuyển hóa trung tâm như glycolysis hoặc pentose phosphate. Thành phần, cấu trúc và hoạt tính sinh học của EPS có thể bị chi phối bởi điều kiện môi trường (đặc biệt là nguồn đường) và đặc điểm di truyền của vi khuẩn.

1.5. Giải trình tự toàn bộ hệ gen

Giải trình tự toàn bộ hệ gen (whole-genome sequencing–WGS) là kỹ thuật giải trình tự dữ liệu lớn của toàn bộ hệ gen của 1 cá thể. Đây là công

cụ then chốt trong sinh học hệ gen, di truyền học, y học cá thể hóa và vi sinh vật học ứng dụng.

Trong những năm gần đây, công nghệ WGS đã trở thành công cụ thiết yếu trong nghiên cứu vi sinh vật chịu mặn, đặc biệt trong việc khai thác tiềm năng di truyền phục vụ cải tạo đất và phát triển chế phẩm sinh học. Tại Việt Nam và trên thế giới, WGS đã được ứng dụng để phân tích sâu các chủng vi khuẩn chịu mặn nhằm làm rõ cơ chế chịu mặn, khả năng thích ứng và vai trò kích thích sinh trưởng thực vật. Các loài vi khuẩn có khả năng sinh EPS như *Bacillus velezensis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* spp. và *Rhizobium* spp. đã được giải trình tự toàn bộ hệ gen nhằm mục tiêu xác định các cụm gen mã hóa tổng hợp EPS, phân tích tính an toàn, tiềm năng chuyển hóa, phân tích khả năng thích nghi với điều kiện bất lợi, và tiềm năng ứng dụng trong nông nghiệp, công nghiệp và y sinh. Do đó WGS hứa hẹn giúp khám phá các tiềm năng di truyền độc đáo của chủng vi khuẩn chịu mặn, sinh EPS giúp định hướng ứng dụng chủng cho phù hợp.

Tổng quan cho thấy cát san hô Trường Sa là loại đất khô hạn, mặn, có tính đặc thù, nghèo dinh dưỡng, khó cải tạo bằng các biện pháp hóa học truyền thống. Hướng tiếp cận sinh học sử dụng vi khuẩn bản địa sinh EPS được đánh giá có tiềm năng cao nhờ khả năng tạo polymer ngoại bào giúp cải thiện cấu trúc đất, tăng giữ ẩm và giảm mặn tự nhiên. Tuy nhiên, các nghiên cứu trong nước còn hạn chế, đặc biệt thiếu dữ liệu di truyền ở mức hệ gen về cơ chế tổng hợp EPS và thích nghi mặn. Luận án này nhằm lấp đầy khoảng trống đó thông qua phân lập, giải trình tự hệ gen và đánh giá ứng dụng của chủng vi khuẩn sinh EPS bản địa từ cát san hô Trường Sa, góp phần phát triển giải pháp vi sinh bền vững cho cải tạo đất mặn – khô vùng biển đảo Việt Nam.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: 9 mẫu đất thu thập từ 3 đảo: Trường Sa Đông (kí hiệu TSD); Đá Tây A (kí hiệu DTA); Trường Sa Lớn (kí hiệu TSL).

Cát san hô sử dụng để thử nghiệm được lấy từ đảo Trường Sa Lớn ngày 29/4/2024 bởi V. D. N.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp lấy mẫu đất

Mẫu đất được lấy theo TCVN 7538 - 2:2005 (ISO 10381-2:2002) về Chất lượng đất - Lấy mẫu - Phần 2: Hướng dẫn kỹ thuật lấy mẫu.

2.2.2. Nhóm phương pháp vi sinh

2.2.2.1. Phân lập, sàng lọc các chủng vi khuẩn chịu mặn, sinh exopolysaccharide

Dựa trên kết quả khảo sát thực tế, đất ở các đảo nổi Trường Sa có độ mặn NaCl 0,45–1,27%, một số đảo khan hiếm nước ngọt nên cây trồng được tưới bằng nước lợ. Do mục tiêu tuyển chọn vi khuẩn chịu mặn sinh EPS phục vụ cải tạo cát san hô, quá trình phân lập được tiến hành trên môi trường LB bổ sung 3% NaCl (tương đương độ mặn trung bình của nước biển). Mẫu đất (10 g) được pha loãng tuần tự trong 90 mL dung dịch muối sinh lý vô trùng (10^{-1} – 10^{-5}), trải 100 μ L lên đĩa thạch LB 3% NaCl, ủ ở 30 °C trong 45–48 giờ. Mật độ vi sinh vật được xác định theo TCVN 11039-1:2015. Các khuẩn lạc khác biệt về hình thái được ghi nhận, trong đó những khuẩn lạc bóng, ướt, rỉ nhầy và kéo sợi > 5 mm được chọn là chủng sinh EPS. Các chủng này được cấy chuyển trên đĩa thạch LB 3% NaCl đến khi thuần và kiểm tra khả năng sinh EPS bằng phương pháp kéo sợi.

2.2.2.2. Phương pháp tuyển chọn chủng vi khuẩn chịu mặn, có khả năng sinh tổng hợp exopolysaccharide hàm lượng cao

Tiến hành dựa theo phương pháp của Deka và cs (2019) và Cheng và cs (2020), các chủng được nuôi cấy trong môi trường LB có nồng độ NaCl

3% sau đó tách chiết thu EPS và đánh giá lựa chọn chủng cho hàm lượng cao nhất.

2.2.2.3. Khảo sát khả năng sử dụng các nguồn carbon của chủng vi khuẩn tuyển chọn

Sử dụng Bộ kit API 50CHB (BioMérieux, Pháp) để khảo sát khả năng lên men 49 nguồn carbon của chủng vi khuẩn *Bacillus* khảo sát.

2.2.2.4. Đánh giá khả năng chịu mặn và kim loại nặng của chủng vi khuẩn tuyển chọn

Chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi cấy trong môi trường LB có bổ sung muối NaCl/MgSO₄ từ 0–17,5% (w/v) (A), nồng độ kim loại nặng Cd, Hg, Cr, Co, As 1–128 µg/mL (B) và Pb, Zn, Fe từ 150–1050 µg/mL để đánh giá khả năng khả năng phát triển của chủng vi khuẩn (dịch nuôi cấy đục hoặc xuất hiện màng biofilm màu trắng đục trên bề mặt giếng).

2.2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của môi trường và điều kiện nuôi cấy riêng lẻ đến khả năng sinh exopolysaccharide

Chủng tuyển chọn được nuôi cấy trong 6 môi trường LB, NB, YPM, ISP2, YM, TB để lựa chọn ra môi trường cho khả năng sinh EPS tốt nhất. Sau đó khảo sát ảnh hưởng của các nguồn carbon, nitơ, muối khoáng, điều kiện nhiệt độ, pH, tốc độ lắc, tỉ lệ tiếp giống để thu được hàm lượng EPS cao.

2.2.2.6. Tối ưu hóa các yếu tố môi trường ảnh hưởng đến sinh tổng hợp exopolysaccharide

Ba yếu tố môi trường ảnh hưởng lớn tới khả năng sinh EPS được lựa chọn để tiến hành tối ưu hóa theo phương pháp đáp ứng bề mặt.

2.2.3. Phương pháp phân loại vi khuẩn

Phân loại dựa vào đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và dựa trên trình tự đoạn gen 16S rRNA của vi khuẩn sau khi so sánh với trình tự trên Genbank.

2.2.4. Phương pháp giải trình tự toàn bộ hệ gen

Chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi cấy, tách thu DNA và gửi đến Công ty Novogen AIT (Singapore) để giải trình tự toàn bộ hệ gen trên nền tảng Illumina Novaseq 6000 giải mã hai chiều với kích thước đoạn đọc 150 bp.

2.2.5. Nhóm phương pháp phân tích tin sinh học

Gồm các phương pháp: Xử lý các bản đọc thô và lắp ráp de novo; Xây dựng cây phát sinh loài; Chú thích chức năng và so sánh cụm gen.

2.2.6. Nhóm phương pháp hóa sinh

2.2.6.1. Phương pháp tách chiết exopolysaccharide

Quy trình chiết xuất EPS được tiến hành dựa trên phương pháp của Vu và cs (2021).

2.2.6.2. Phương pháp tinh sạch exopolysaccharide

Quy trình tinh sạch EPS được thực hiện dựa theo phương pháp đã được công bố bởi Zhao và cs (2019), sử dụng trichloroacetic acid để loại protein, acetone lạnh để rửa thu EPS, túi thẩm tích để loại đường đơn và muối, tinh sạch qua cột Sephadex G-75 và đông khô thu EPS tinh sạch.

2.2.6.3. Phương pháp xác định hàm lượng carbohydrate

Theo phương pháp của Dubois (1956) dựa trên đường chuẩn D-glucose.

2.2.6.4. Phương pháp định lượng protein tổng số

Theo phương pháp Bradford, dựa trên đường chuẩn BSA.

2.2.6.5. Xác định khối lượng phân tử và cấu trúc exopolysaccharide

- Phương pháp phân tích cấu trúc bề mặt của EPS dựa trên ảnh chụp SEM.
- Phân tích thành phần nguyên tố của EPS bằng EDS.
- Ước tính khối lượng phân tử EPS dựa vào độ nhớt nội tại.
- Xác định thành phần monnosaccharide của EPS: sử dụng phương pháp HPLC mẫu thủy phân EPS.

- Phân tích phổ hồng ngoại biến đổi Fourier FT-IR tại Học viện Kỹ thuật Quân sự.

2.2.6.6. Đánh giá ảnh hưởng của một số nguồn đường tới thành phần monnosaccharide của exopolysaccharide

Xác định hàm lượng, thành phần EPS trong môi trường gần giống môi trường tối ưu, khác là có glucose/sucrose ở các nồng độ 0; 1%; 5%.

2.2.6.7. Phương pháp đo thế zeta

Sử dụng thiết bị Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK) tại Viện Khoa Học Vật Liệu, viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, sử dụng phương pháp tán xạ laser động .

2.2.6.8. Xác định đặc điểm exopolysaccharide trong điều kiện stress

Xác định hàm lượng và thành phần EPS được nuôi trong môi trường stress muối NaCl và/hoặc kim loại nặng.

2.2.7. Nhóm phương pháp thử nghiệm

2.2.7.1. Phương pháp đánh giá khả năng giảm độ mặn của nước tự do trong đất

Thiết kế 5 thí nghiệm (TN) sử dụng cát san hô bổ sung bentonite 3% và 10% giá thể hữu cơ tạo đất hỗn hợp. TN1: đất hỗn hợp + nước (đối chứng âm); TN2: đất hỗn hợp + môi trường tối ưu (đối chứng mặn); TN3: đất hỗn hợp + 70 mg EPS + NaCl; TN4: đất hỗn hợp + dịch nuôi chủng vi khuẩn sinh EPS trong điều kiện tối ưu. Sau 24 giờ ủ, tiến hành chiết trong 250 mL nước và đo độ mặn của các mẫu đất.

2.2.7.2. Phương pháp xác định khả năng giữ nước của exopolysaccharide

50 mg EPS thô (tách chiết từ dịch nuôi chủng vi khuẩn trong điều kiện tối ưu) được ngâm trong nước để đánh giá khả năng hấp phụ nước trong 1, 2 và 4 giờ.

2.2.7.3. Xác định khả năng giữ nước của đất được xử lý bằng exopolysaccharide và dịch nuôi chủng vi khuẩn sinh exopolysaccharide

Thiết kế thí nghiệm dựa trên công bố của Vardharajula [128]:

TN1. 50 g đất cát san hô và 10 mL nước cất.

TN2. 50 g đất hỗn hợp và 10 mL nước cất.

TN3. Thêm 50 g đất hỗn hợp vào 10 mL dung dịch nuôi cấy chủng tuyển chọn (10^9 CFU/mL).

TN4. 50 g đất hỗn hợp bổ sung 10 mL nước cất và 70 mg EPS thô.

TN5. 50 g đất hỗn hợp bổ sung 10 mL nước cất và 140 mg EPS thô.

Các mẫu đất tương ứng trong 5 TN trên đã được xác định khả năng giữ nước, tốc độ thoát nước và khả năng kết tụ. Tiến hành dựa trên "Phương pháp đếm giọt" của Brischke và cs (2019).

2.2.7.4. Đánh giá hiệu quả giữ nước và giảm mặn cho cây mỏng toi của chủng vi khuẩn chịu mặn, sinh exopolysaccharide quy mô chậu vại

Tiến hành dựa theo phương pháp của Cheng và cs (2020) và Kasotia và cs (2016). Thử nghiệm được thực hiện tại nhà lưới, Khoa Nông học, Học Viện Nông nghiệp Việt Nam.

Với 7 TN: TN1: cát san hô; TN2: cát san hô + giá thể; TN3: cát san hô + giá thể + vi khuẩn sinh EPS; TN4: cát san hô + giá thể + bentonite; TN5: cát san hô + giá thể + bentonite + vi khuẩn; TN6: cát san hô + giá thể + bentonite + tưới NaCl; TN7: cát san hô + giá thể + bentonite + vi khuẩn + tưới NaCl. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 chậu và trồng 1 cây mỏng toi/1 chậu. Mỗi chậu được tưới 50 mL nước hoặc dịch NaCl 1% (ở TN 6 và 7), tưới 3 ngày/lần vào 16 giờ. Sau 30 ngày, tiến hành thu mẫu và phân tích mẫu. Phân tích các chỉ tiêu sinh trưởng, chất lượng rau (SPAD), khả năng giữ nước, kết tụ đất, hàm lượng carbohydrate và độ mặn đất.

2.2.8. Phân tích thống kê

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại ba lần. Sự khác biệt về mặt thống kê được xác định bằng One-way ANOVA và so sánh từng cặp Tukey sử dụng phần mềm Minitab Statistical Software. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được xem xét khi giá trị $p < 0,05$.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn bản địa từ Trường Sa có khả năng chịu mặn và sinh exopolysaccharide

3.1.1. Kết quả phân lập, sàng lọc các chủng vi khuẩn chịu mặn, sinh exopolysaccharide

Từ 9 mẫu đất thuộc 3 đảo ở Trường Sa đã phân lập, tuyển chọn được 10 chủng vi khuẩn chịu được mặn 3% NaCl và sinh EPS trong đó có 4 chủng vi khuẩn từ đảo Trường Sa Đông, 4 chủng từ đảo Trường Sa Lớn, và 2 chủng từ đảo Đá Tây A.

3.1.2. Kết quả tuyển chọn chủng vi khuẩn chịu mặn, có khả năng sinh tổng hợp exopolysaccharide hàm lượng cao

Tuyển chọn được 4 chủng DTA1, TSL6, TSD5, và TSL5 cho khả năng sinh EPS cao hơn hẳn các chủng vi khuẩn khác ($p < 0,05$) trong đó chủng DTA1 cho khả năng sinh EPS cao nhất (1,31 g/L).

3.1.3. Kết quả định danh chủng vi khuẩn chịu mặn, sinh exopolysaccharide hàm lượng cao

Chủng TSD5, DTA1, TSL5, TSL6 phân lập được có trình tự gen 16S rRNA tương đồng nhất với lần lượt các chủng *Bacillus velezensis* NR116240 (99,86%), *B. velezensis* NR075005 (99,79%); *Priestia megaterium* MG491526 (100%) và *B. velezensis* NR075005 (99,82%). Trong số các chủng vi khuẩn trên, chủng *B. velezensis* DTA1 cho hàm lượng EPS cao nhất và sinh trưởng tốt nên được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp.

3.1.4. Một số đặc tính sinh học của chủng DTA1

3.1.4.1. Khả năng sử dụng các nguồn carbon

Chủng DTA1 có thể sử dụng được 28 trong tổng số 49 nguồn carbon được thử nghiệm, đặc biệt các đường D-glucose, D-fructose, D-mannose, D-cellobiose, D-saccharose và esculin được chuyển hóa mạnh.

3.1.4.2. Đánh giá khả năng chịu mặn và kim loại nặng của chủng DTA1

Chủng DTA1 có thể chịu được mặn tới 12,5% NaCl; 10% MgSO₄; chịu kim loại nặng lên đến 900 µg/mL Pb và Zn; 600 µg/mL đối với Fe; Cr và As đến 64 µg/mL, với Cd là 32 µg/mL; Hg và Co thấp hơn rõ rệt, tương ứng là 2 µg/mL và 4 µg/mL.

3.2. Giải trình tự hệ gen và dự đoán các con đường sinh tổng hợp exopolysaccharide và các gen liên quan đến khả năng chịu mặn ở chủng DTA1

3.2.1. Kết quả kiểm tra chất lượng DNA genome chủng DTA1

DNA genome của chủng DTA1 đáp ứng đầy đủ các tiêu chí về nồng độ, độ tinh sạch, hàm lượng và tính toàn vẹn cần thiết cho quá trình giải trình tự toàn bộ hệ gen.

3.2.2. Đặc điểm chung của bộ gen chủng DTA1

Kết quả phân tích WGS cho thấy kích thước của bộ gen *B. velezensis* DTA1 được lắp ráp là 3.901.259 bp với tỷ lệ GC là 46,5%, tương đương với bộ gen tham chiếu, *Bacillus velezensis* FZB42.

3.2.3. Phân tích phát sinh loài và xác định vị trí phân loại của chủng DTA1

Kết hợp kết quả phân tích dựa trên trình tự gen 16SrRNA ở trên và core genome khẳng định chủng DTA1 thuộc loài *B. velezensis*.

3.2.4. Hệ thống vận chuyển đường của *B. velezensis* DTA1

Tổng cộng có 22 protein vận chuyển hệ thống phosphotransferase (PTS) cho các loại đường khác nhau được phát hiện trong bộ gen của chủng DTA1, được phân loại thành 11 hệ thống PTS.

Đối với hệ thống vận chuyển permease đặc hiệu đường, các protein đặc hiệu cho arabinose, maltose và các protein vận chuyển permease đa đường đã được tìm thấy. Bên cạnh đó, tiểu đơn vị vận chuyển ABC tạo điều kiện cho sự hấp thụ maltose/maltodextrin cũng đã được phát hiện.

Dự đoán *B. velezensis* DTA1 có thể sử dụng cellobiose, glucoside, glucose, mannose/mannitol, fructose, sucrose, arabinose và N-acetylglucosamine, đặc biệt là cellobiose, sucrose và arabinose.

3.2.5. Con đường sinh tổng hợp đường nucleotide của *B. velezensis* DTA1

Có 29 gen trong bộ gen DTA1 mã hóa các enzyme quan trọng giúp chuyển đổi dễ dàng hơn các nguồn carbon khác nhau thành 8 loại đường nucleotide chủng DTA1 có khả năng tổng hợp bao gồm: UDP-N-acetylglucosamine, UDP-N-acetylgalactosamine, UDP-N-acetylmannosamine, dTDP-glucose, dTDP-rhamnose, UDP-glucose, UDP-glucuronate và UDP-galactose. 9 loại đường, bao gồm cellobiose, glucoside, glucose, mannose, mannitol, fructose, sucrose, arabinose và N-acetylglucosamine được dự đoán là chủng DTA1 có thể sử dụng được thông qua phân tích WGS và qua thử nghiệm API® 50CHB.

3.2.6. Con đường sinh tổng hợp exopolysaccharide ở *Bacillus velezensis* DTA1

Hai cụm gen liên quan đến các con đường sinh tổng hợp EPS, con đường phụ thuộc Wzx/Wzy và quá trình tổng hợp ngoại bào bởi enzyme levansucrase, đã được phát hiện trong bộ gen DTA1.

3.2.7. Các gen liên quan tới khả năng chống chịu stress ở *B. velezensis* DTA1

Chủng DTA1 chứa nhiều gen liên quan đến stress thẩm thấu (*degU*, *degS*, *sodA*, *dnaK*, ...), stress kim loại nặng (*czcD*, *cadA*, *chrA*, *chrB*, *ydpP*, *mneP*, *mntP*, *mgtE*, *corA* và *asrB*), stress oxy hóa (*nsrR*, *tpx*, *bcp* và *hmpA*). Các gen này góp phần giúp chủng vi khuẩn thích nghi với stress mặn và kim loại nặng.

3.3. Nghiên cứu môi trường và điều kiện nuôi cấy thu nhận exopolysaccharide từ chủng *B. velezensis* DTA1

3.3.1. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của từng yếu tố môi trường và điều kiện nuôi cấy tới khả năng sinh exopolysaccharide

Quá trình khảo sát từng yếu tố đơn đã chọn được môi trường TB có bổ sung sucrose 5%; NaCl 3%, pH 8, nuôi lắc ở 150 vòng/phút, nhiệt độ 30 °C và thu mẫu sau 72 giờ cho hàm lượng EPS cao nhất đạt khoảng 27,30 g/L.

Chủng thể hiện khả năng thích nghi và sinh EPS rộng với các điều kiện pH (4–10), nhiệt độ (5–50 °C) và muối (0–12,5%), chủng ưa kiềm, sinh EPS mạnh trong môi trường kiềm—phù hợp với điều kiện đất san hô mặn kiềm ngoài đảo. Vì giá trị pH, nồng độ NaCl và nồng độ sucrose là 3 yếu tố môi trường có ảnh hưởng lớn tới khả năng sinh EPS nên được lựa chọn để tối ưu khả năng sinh EPS.

3.3.2. Tối ưu khả năng sinh exopolysaccharide bằng phương pháp đáp ứng bề mặt

Sử dụng phương pháp RSM, một phương trình đa thức bậc hai đã được phát triển để mô tả ảnh hưởng của các biến độc lập (X_1 -NaCl, X_2 -pH và X_3 -sucrose) và tương tác của chúng tới hàm lượng EPS. Hàm lượng EPS có thể được biểu thị như sau:

$$Y = 27,16 + 2,95X_1 + 2,94X_2 + 3,96X_3 - 1,3X_1X_2 + 2,56X_1X_3 - 2,01X_2X_3 - 6,7X_1^2 - 2,28X_2^2 + 1,7X_3^2$$

Các điều kiện tối ưu được dự đoán là: nồng độ NaCl ở mức 32,7 g/L (tức 3,27%), pH ở mức 8,46 và nồng độ sucrose ở mức 72,6 g/L (tức 7,26%), dẫn đến hàm lượng EPS dự đoán là 32,78 g/L. Việc xác nhận những điều kiện tối ưu này bằng thực nghiệm thu được hàm lượng EPS là 32,80 g/L, chứng tỏ mức độ phù hợp cao với dự đoán của mô hình là 32,78 g/L. Kết quả xác nhận độ tin cậy mạnh của chiến lược tối ưu hóa.

3.3.3. Ảnh hưởng của một số nguồn đường đến thành phần monosaccharide trong exopolysaccharide của B. velezensis DTA1

Kết quả nghiên cứu trên Bảng 3.1 cho thấy nguồn đường có ảnh hưởng rõ rệt đến năng suất cũng như thành phần monosaccharide trong EPS do *B. velezensis* DTA1 sinh tổng hợp. EPSDTA1 gồm 3–5 loại monosaccharide (cao hơn hẳn các công bố trước đó về EPS ở *B. velezensis* chỉ gồm 2–4 loại). Khi sử dụng glucose, EPS gồm 3 loại monosaccharide, chủ yếu chứa mannose. Tuy vậy khi bổ sung sucrose, đặc biệt là ở nồng độ 5%, không chỉ giúp tăng năng suất EPS mà còn làm xuất hiện thêm 2 monosaccharide đặc

trung như fructose và N-acetylglucosamine. Qua đây cho thấy sự điều hướng sinh tổng hợp EPS phụ thuộc mạnh vào nguồn đường cung cấp. Ngoài ra còn chứng tỏ khi môi trường bổ sung sucrose đã kích thích sinh EPS theo 2 con đường phụ thuộc Wzx/Wzy và levansucrase.

Bảng 3.1. Đặc điểm của EPS từ các chủng *B. velezensis*

Chủng <i>Bacillus velezensis</i>	Nguồn đường (%)	Năng suất EPS (g/L)	Tỷ lệ thành phần monosaccharide trong EPS (dựa trên kết quả phân tích HPLC)	Tài liệu tham khảo
DTA1 (TB, pH 8,46, NaCl 3,27% có/không bổ sung đường)	Glucose 1	21,42±0,32 ^c	Glucose : rhamnose : mannose (1,00 : 9,56 : 59,94)	Nghiên cứu này
	Glucose 5	23,29±0,34 ^b	Glucose : rhamnose : mannose (1,00 : 3,70 : 745,16)	
	Sucrose 1	23,93±0,30 ^b	Glucose: rhamnose: fructose: mannose: N-acetylglucosamine (1,00 : 17,81 : 2,23 : 1,86 : 24,45)	
	Sucrose 5	30,39±0,42 ^a	Glucose : rhamnose : fructose : mannose : N-acetylglucosamine (2,61 : 12,86 : 7,09 : 1,00 : 12,30)	
	Không có	16,35±0,30 ^d	Glucose : rhamnose : mannose (1,00 : 5,49 : 3,92)	
TSD5	Không thêm đường	1,02	Glucose : rhamnose : mannose (1,00 : 1,83 : 14,20)	Le et al. (2025)
VTX20	Sucrose 20	75,5±4,8	Fructose, glucose	Vu et al. (2021)
AG6	Sucrose 10	5,79	Xylose : galactose : axit galacturonic (2,0 : 0,5: 2,0)	Alharbi et al. (2023)

HY23	Không có	2,8	Mannose : glucose (82 : 18)	Zou et al. (2024)
KY471306	Mật mía 12	7,88	Glucose, mannose và galactose	Moghannem et al. (2018)
MHM3	Sucrose 5	5,80	Axit glucuronic, glucose, fructose và rhamnose (4,00:2,00:1,00:0,13)	Mahgoub et al. (2018)
OM03	Glucose 5	0,594	Mannose (63,52%) và glucose	Chirakkara, Abraham (2023)

3.4. Tinh sạch và xác định cấu trúc exopolysaccharide từ *Bacillus velezensis* DTA1

3.4.1. Tinh sạch EPSDTA1

Hiệu suất tinh sạch EPS từ chủng *B. velezensis* DTA1 nuôi trong môi trường tối ưu qua cột Sephadex là 51,25%, EPS thu được có độ sạch 97,07%.

3.4.2. Kết quả chụp SEM cấu trúc bề mặt exopolysaccharide

EPSDTA1 tại độ phóng đại $\times 500$ và $\times 1000$ cho thấy cấu trúc đặc trưng với những sợi dài, đan xen lẫn nhau và liên kết thành mạng lưới không gian dày đặc. Cấu trúc mạng lưới dày đặc đóng vai trò quan trọng trong việc tạo độ nhớt cao và khả năng giữ nước của EPS.

3.4.3. Ước lượng khối lượng phân tử EPSDTA1

Trọng lượng phân tử EPS được ước tính dựa trên độ nhớt nội tại (được xác định là 0,9556 dL/g). Khối lượng phân tử của EPS được xác định là khoảng $1,9 \times 10^5$ Da.

3.4.4. Thành phần monosaccharide của EPSDTA1

Phân tích HPLC mẫu EPSDTA1 tinh sạch cho thấy sự hiện diện của 5 loại monosaccharide: glucose : rhamnose : fructose : mannose : N-acetylglucosamine (tỉ lệ: 2,59 : 12,75 : 8,49 : 1,00 : 12,18). Các đường đơn

này chứa nhiều các nhóm chức ưa nước và có khả năng hấp phụ kim loại như hydroxyl, carbonyl, amide.

3.4.5. Kết quả phân tích các nhóm chức qua phổ FT-IR

Phân tích phổ FT-IR cho thấy EPSDTA1 có chứa nhiều nhóm chức hydroxyl, carbonyl và carboxyl, là các nhóm có hoạt tính sinh học cao. Các nhóm chức này không chỉ tăng khả năng giữ nước, mà còn tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình hấp phụ muối và ion kim loại, đặc biệt là các ion gây độc như Pb^{2+} , Cd^{2+} hay ion mặn như Na^{+} .

Kết quả phân tích phổ FT-IR khá tương đồng với kết quả phân tích HPLC và SEM cho thấy EPSDTA1 có tiềm năng lớn trong việc giữ nước, giảm mặn và ô nhiễm kim loại.

3.5. Đánh giá khả năng giữ nước và giảm mặn của EPSDTA1

3.5.1. Đánh giá khả năng hấp phụ muối, kim loại của EPSDTA1

3.5.1.1. Thế zeta của EPSDTA1

EPSDTA1 có thế zeta âm cao, đạt -30 mV, hứa hẹn có khả năng hấp phụ cation mạnh.

3.5.1.2. Đặc tính exopolysaccharide dưới điều kiện stress

Tuy khả năng sinh trưởng giảm nhưng năng suất EPS cũng như hàm lượng đường và protein tăng rõ rệt ở điều kiện stress so với đối chứng (Bảng 3.2).

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của điều kiện stress muối và/hoặc kim loại nặng đến sự phát triển và sản xuất EPS của chủng DTA1.

Môi trường TB, pH 8,46, sucrose 7,26 %	OD600	Năng suất EPS (g/L)	Hàm lượng đường (%) trong EPS)	Hàm lượng protein (%) trong EPS)
Đối chứng	22,93±0,35 ^a	19,27±0,26 ^c	19,34±0,46 ^c	12,06±0,33 ^c
Thêm 3% NaCl	20,61±0,26 ^b	30,78±0,38 ^a	40,81±0,56 ^a	25,90±0,88 ^b

Thêm 1% NaCl, 1 $\mu\text{g/mL}$ Co(NO ₃) ₂ , 1 $\mu\text{g/mL}$ Cd(NO ₃) ₂	18,27 $\pm$ 0,34 ^c	29,33 $\pm$ 0,39 ^b	37,83 $\pm$ 0,52 ^b	26,58 $\pm$ 0,54 ^b
Thêm 1% NaCl và 1 $\mu\text{g/mL}$ /muối FeSO ₄ , CuSO ₄ , Ag ₂ SO ₄ , ZnCl ₂ , MgCl ₂ , MnSO ₄	16,89 $\pm$ 0,39 ^d	28,73 $\pm$ 0,41 ^b	41,29 $\pm$ 0,52 ^a	28,26 $\pm$ 0,55 ^a

Ở điều kiện không stress, EPS gồm các hạt đường kính 1–5 μm , với mức độ kết dính giữa các hạt thấp. Trong khi đó, EPS từ môi trường có bổ sung 3% NaCl thể hiện cấu trúc liên kết chặt chẽ hơn, các hạt được bao phủ bởi lớp vật liệu keo kết dính, phủ gần như kín ranh giới giữa các hạt. Kết quả phân tích phổ EDS cho thấy hàm lượng Na tăng từ 0,73% lên 9,03%, và Cl tăng từ 0,52% lên 2,04% khi EPS được tạo ra trong môi trường stress mặn so với đối chứng. Điều này chứng tỏ EPS có khả năng hấp phụ ion Na⁺ và Cl⁻ từ môi trường, đặc biệt là Na⁺, có thể do tương tác với các nhóm chức mang điện tích âm (hydroxyl, carboxyl, carbonyl, amin, và phosphonate) trên cấu trúc polymer.

Kết quả phân tích EDS mẫu EPS từ môi trường stress muối và kim loại nặng ghi nhận sự hiện diện của các cation kim loại có trong môi trường nuôi cấy như Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, cũng như các ion kim loại nặng Co²⁺, Cd²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺/Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ và Ag⁺, cho thấy khả năng hấp phụ tốt các cation của EPSDTA1.

3.5.1.3. Khả năng giảm độ mặn của nước tự do trong đất của EPSDTA1

Kết quả thí nghiệm như dự đoán ở trên, việc bổ sung EPS hoặc dịch nuôi cấy chủng *B. velezensis* DTA1 đã làm giảm đáng kể hàm lượng muối hòa tan trong nước tự do của đất. Đặc biệt là ở TN3, 1 mg EPS có khả năng hấp phụ 0,25 mg muối. Điều này như được dự đoán qua phân tích cấu trúc EPSDTA1 với nhiều nhóm chức phân cực và/hoặc mang điện tích âm và thế zeta rất âm (-30 mV) nên có khả năng liên kết với cation và phân tích EDS

cũng đã xác minh EPSDTA1 hấp phụ được Na^+ và Cl^- do đó giúp giảm mặn trong dung dịch đất.

3.5.2. Nghiên cứu khả năng giữ nước của EPSDTA1 và chủng *Bacillus velezensis* DTA1 trên cát san hô Trường Sa.

3.5.2.1. Khả năng giữ nước của exopolysaccharide

Khả năng giữ nước của EPSDTA1 tăng nhanh trong 2 giờ đầu, từ 1001,8% (1 h) lên 1762,2% (2 h), tương đương 1 g EPS hấp thụ 17,62 g nước, sau đó đạt trạng thái bão hòa ($p > 0,05$). Giá trị này vượt trội so với một số công bố trước (496–882%), cho thấy EPSDTA1 vai trò của cấu trúc mạng lưới, khối lượng phân tử cao và giàu nhóm ưa nước, giúp tăng khả năng hấp thụ và giữ nước.

3.5.2.2. Khả năng giữ nước của đất được xử lý bằng EPSDTA1 và dịch nuôi cấy chủng *B. velezensis* DTA1

Kết quả đánh giá ở 5 TN cho thấy EPSDTA1 và dịch nuôi cấy chứa *B. velezensis* DTA1 cải thiện rõ rệt khả năng giữ nước của cát san hô. Khi bổ sung EPS, tốc độ thoát nước giảm 4,95–7,83 lần so với đối chứng và WHC tăng 1,6–2 lần, đạt tối đa 66,31% (so với 33,17% ở TN1). Đặc biệt, 1 g EPS có thể giữ tới 158,7 g nước trong đất – cao hơn so với một số báo cáo trước đây về EPS. Cơ chế chính là EPS nhờ kích thước lớn, cấu trúc dạng mạng lưới mang nhiều nhóm chức ưa nước, hoạt động như chất kết dính, tạo kết tụ ổn định, nhờ đó nâng cao khả năng giữ ẩm lâu dài và cải thiện cấu trúc đất. Đặc biệt, sự kết hợp giữa giá thể hữu cơ, bentonite và EPS đã giúp tăng vượt trội khả năng giữ nước của cát san hô (gấp 2 lần).

3.6. Thử nghiệm hiệu quả cải tạo cát san hô thành đất canh tác của chủng *B. velezensis* DTA1 ở quy mô chậu vại

Để khẳng định giá trị ứng dụng của chủng *B. velezensis* DTA1 trong cải tạo cát san hô, nghiên cứu đã tiến hành thử nghiệm quy mô chậu vại trên rau mồng tơi trong điều kiện Nhà lưới tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

3.6.1. Xác định khả năng sinh exopolysaccharide và tạo kết tụ trong đất

3.6.1.1. Kết quả xác định hàm lượng carbohydrate trong đất

Hàm lượng carbohydrate (đại diện cho EPS) trong đất có sự khác biệt rõ rệt giữa các công thức. Đất cát san hô đối chứng (TN1) chỉ đạt 212,77 $\mu\text{g/g}$, trong khi bổ sung giá thể hữu cơ (TN2, TN4) nâng giá trị lên 633,75–642,24 $\mu\text{g/g}$ nhờ nguồn carbon sẵn có. Khi bổ sung thêm *B. velezensis* DTA1 (TN3, TN5), hàm lượng tăng mạnh (960,79–1045,34 $\mu\text{g/g}$), vượt xa ảnh hưởng của giá thể, đặc biệt ở TN5 cao gấp 4,91 lần TN1. Trong điều kiện stress mặn (TN7), giá trị đạt 1120,8 $\mu\text{g/g}$, cao hơn 5,27 lần TN1 và 1,54 lần TN6, cho thấy vai trò của chủng DTA1 kích thích sinh EPS mạnh trong điều kiện stress để thích ứng môi trường.

3.6.1.2. Khả năng tạo kết tụ đất

Hình ảnh bề mặt 7 mẫu đất thử nghiệm dưới kính hiển vi soi nổi cho thấy mẫu đất ở các TN1,2,4,6 gồm các hạt khá rời rạc kích thước $<2000\mu\text{m}$, trong khi đó ở TN3, 5 và 7 (có bổ sung chủng DTA1 sinh EPS) các hạt trong đất có sự liên kết với nhau tạo các khối kết tụ $>2000\mu\text{m}$, đặc biệt ở TN5,7 khối kết tụ lên tới khoảng $8000\mu\text{m}$. Sự kết tụ này, được lí giải do quá trình sản sinh EPS trong đất của chủng DTA1 tạo ra, cũng là yếu tố giúp tăng khả năng giữ nước trong các khối này.

3.6.2. Đánh giá khả năng giữ nước của đất tại thời điểm thu hoạch rau

Kết quả theo dõi độ ẩm đất cho thấy cát san hô đối chứng (TN1) có khả năng giữ nước kém nhất, trong khi các công thức bổ sung giá thể, bentonite và đặc biệt là *B. velezensis* DTA1 sinh EPS (TN3, TN5, TN7) duy trì độ ẩm cao hơn rõ rệt ($p < 0,05$). Ở TN7 (kết hợp giá thể + bentonite + EPS + muối), độ ẩm đạt mức cao nhất tại cả 3 thời điểm (38,33%–31,0%), gấp 2–2,5 lần so với TN1, phản ánh hiệu ứng cộng hưởng giữa EPS, bentonite và NaCl trong giữ nước và duy trì ẩm. Kết quả khẳng định tiềm năng ứng dụng tổ hợp này trong cải tạo đất cát san hô khô hạn, mặn ven biển và trên đảo.

3.6.3. Đánh giá khả năng giảm mặn của đất sau thu hoạch rau

Kết quả đo hàm lượng muối trong đất sau thu hoạch cho thấy ở lô TN7 (tưới nước muối, có bổ sung *B. velezensis* DTA1 sinh EPS) nồng độ muối thấp hơn đối chứng TN6 (tưới nước muối, không có *B. velezensis* DTA1), mặc dù khác biệt chưa đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Xu hướng này phù hợp với các kết quả trước, khi EPSDTA1 thể hiện khả năng hấp phụ muối và giúp giảm nồng độ muối tự do trong đất.

3.6.4. Đánh giá một số chỉ tiêu sinh trưởng của rau mùng toi

Kết quả thử nghiệm trồng rau mùng toi trên đất cát san hô trên Bảng 3.3 cho thấy khi bổ sung giá thể, bentonite, vi khuẩn *B. velezensis* DTA1 đều cho thấy hiệu quả tăng trưởng của rau nhất là khi bổ sung đồng thời cả 3 loại trên (TN5) giúp cải thiện rõ rệt sinh trưởng cây, với hệ rễ phát triển mạnh, thân cao, tán rộng và sinh khối cao nhất. Các công thức TN3 và TN4 (chỉ bổ sung EPS hoặc bentonite cùng giá thể) cũng cho kết quả khả quan hơn so với chỉ dùng giá thể (TN2) hoặc không cải tạo (TN1). Trong điều kiện tưới mặn, việc bổ sung chủng DTA1 (TN7) giúp cây xanh và khỏe hơn rõ rệt so với lô không có chủng DTA1 (TN6), dù chưa khác biệt có ý nghĩa thống kê. Kết quả này cho thấy chủng *B. velezensis* DTA1 sinh EPS không chỉ giúp cải thiện cấu trúc đất và giữ nước mà còn góp phần tăng cường khả năng chống chịu mặn cho cây trồng trên đất cát san hô.

Bảng 3.3. Kết quả phân tích một số chỉ tiêu rau mùng toi ở 7 thí nghiệm đánh giá khả năng giữ nước và giảm mặn của vi khuẩn sinh EPS trên quy mô chậu vại.

Thí nghiệm	Dài rễ (cm)	Rộng bầu rễ (cm)	Khối lượng bầu rễ (g)	Chiều cao thân lá (cm)	Khối lượng thân lá (g)	Số lượng lá (cái)
TN1	13,6±1,93 ^b	7,83±1,04 ^{a,b,c}	61,6±22,5 ^c	14,67±2,25 ^{a,b}	10,67±0,87 ^d	8±1 ^{a,b}
TN2	15±1,5 ^{a,b}	6,83±1,61 ^{b,c}	64,9±20,1 ^{b,c}	16,33±2,75 ^{a,b}	14,73±1,21 ^c	7±1,73 ^{b,c}
TN3	23,43±5,69 ^a	10,67±0,58 ^{a,b}	184,7±52,8 ^{a,b}	20,33±4,54 ^{a,b}	22,83±0,93 ^{a,b}	10±1 ^a
TN4	15,93±2,7 ^{a,b}	9,67±1,63 ^{a,b,c}	173,4±46,6 ^{b,c}	18,83±2,84 ^{a,b}	20,67±0,9 ^b	10,33±0,58 ^a
TN5	16,5±4,27 ^{a,b}	12,83±3,62 ^a	302,1±85,3 ^a	26,43±10,97 ^a	25,23±1,01 ^a	10,33±0,58 ^a

TN6	8,63±4,05 ^b	5,33±1,26 ^c	60,17±8,98 ^c	12,23±0,93 ^b	10,2±0,85 ^d	5,33±0,58 ^c
TN7	10,33±2,52 ^b	4,67±1,26 ^c	96,03±6,56 ^{b,c}	14,77±1,75 ^{a,b}	11,63±1,03 ^d	6,33±0,58 ^{b,c}

3.6.5. Đánh giá chỉ số SPAD

Chỉ số SPAD phản ánh hàm lượng diệp lục và tình trạng dinh dưỡng nitơ, là chỉ thị quan trọng để đánh giá chất lượng rau và hiệu quả cải tạo đất. Kết quả 7 lô thử nghiệm cho thấy sau 15 và 30 ngày đa số chỉ số SPAD tăng theo thời gian (trừ ở TN6,7 bị stress mặn). Việc bổ sung giá thể (TN2) hoặc kết hợp giá thể với *B. velezensis* DTA1 (TN3) hay bentonite (TN4) và nhất là kết hợp cả 3 yếu tố đều cho kết quả vượt trội đối chứng không bổ sung. Công thức kết hợp giá thể, bentonite và vi khuẩn *B. velezensis* DTA1 (TN5) đạt SPAD cao nhất 45,67, vượt 1,26–1,60 lần so với đối chứng TN1. Dưới điều kiện mặn, SPAD ở TN6 giảm mạnh từ 32,93 (ngày 15) xuống 26,73 (ngày 30), nhưng ở TN7 có vi khuẩn sinh EPS, SPAD vẫn duy trì ở mức 36,03 và 34,00, cao hơn rõ rệt so với TN6. Những kết quả này cho thấy hiệu quả cộng hưởng giữa giá thể, bentonite và chủng *B. velezensis* DTA1 sinh EPS trong cải thiện dinh dưỡng lá, tăng hàm lượng diệp lục và giảm tác động bất lợi của stress mặn.

Ngoài ra, thử nghiệm quy mô đồng ruộng nhỏ tại Nhà lưới (Trạm Nghiên cứu và Thử nghiệm Biển Đầm Bảy thuộc đảo Hòn Tre, tỉnh Khánh Hòa) cho thấy công thức cải tạo cát san hô kết hợp vi khuẩn sinh EPS, phân giải lân, cố định đạm cùng giá thể hữu cơ và bentonite giúp cải thiện rõ rệt cấu trúc, dinh dưỡng đất và nâng năng suất rau lên gấp 4–5 lần so với cát san hô, tương đương đất canh tác thường.

Các kết quả trên góp phần khẳng định vai trò của EPS/chủng *B. velezensis* DTA1 sinh EPS trong việc nâng cao khả năng giữ nước, giúp giảm mặn cho đất, góp phần tăng sức chống chịu stress cho cây, tăng sản lượng rau, đặc biệt khi kết hợp với giá thể hữu cơ và bentonite.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Đã tuyển chọn được chủng vi khuẩn bản địa *Bacillus velezensis* DTA1 (thuộc nhóm an toàn sinh học cấp 1) từ đất đảo Trường Sa, có khả năng chịu mặn lên tới 12,5% NaCl, chịu được stress mặn, kim loại nặng.

2. Giải trình tự toàn bộ hệ gen cho thấy chủng DTA1 mang đầy đủ hai cụm gen sinh tổng hợp EPS (theo con đường Wzx/Wzy và levansucrase) cùng nhiều gen chống chịu stress muối, oxy hóa và kim loại, làm sáng tỏ cơ chế di truyền liên quan đến khả năng thích nghi và sinh EPS.

3. Chủng *Bacillus velezensis* DTA1 sử dụng đa dạng nguồn carbon, sinh trưởng và sinh EPS ổn định trong khoảng rộng điều kiện muối, pH, nhiệt độ, đạt năng suất 32,80 g/L ở điều kiện tối ưu (7,26% sucrose, 3,27% NaCl, pH 8,46, 30 °C, 72 giờ). Nghiên cứu lần đầu chứng minh sucrose kích hoạt đồng thời 2 con đường tổng hợp EPS (Wzx/Wzy và levansucrase), tạo polymer gồm 5 monosaccharide với cấu trúc đa dạng và vượt trội hơn so với các điều kiện nuôi cấy không có sucrose cũng như so với các chủng *B. velezensis* khác (2–4 loại).

4. EPS tinh sạch có khối lượng phân tử $1,9 \times 10^5$ Da, cấu trúc dạng mạng lưới đan xen, gồm các loại monosaccharide (glucose, rhamnose, fructose, mannose, N-acetylglucosamine) mang nhiều nhóm chức ưa nước và có khả năng hấp phụ ion kim loại.

5. EPSDTA1 có khả năng hấp phụ muối 0,25 g/g EPS, giữ nước tới 158,7 g/g EPS, và khi bổ sung vào cát san hô giúp tăng khả năng giữ nước 1,6–2 lần, tăng kết tụ và giảm mặn cho đất.

6. Thử nghiệm trồng rau mùng tơi quy mô chậu vai khẳng định hiệu quả của chủng *Bacillus velezensis* DTA1, đặc biệt khi kết hợp với giá thể hữu cơ và bentonite, giúp tăng hàm lượng carbohydrate đất 4,9–5,3 lần, khả năng giữ nước 2–2,5 lần và năng suất rau 2,36 lần so với đối chứng cát san

hồ; đồng thời giảm độ mặn và duy trì chỉ số SPAD cao hơn 1,26–1,60 lần ngay cả trong điều kiện stress mặn.

KIẾN NGHỊ

1. Tiếp tục nghiên cứu các đặc tính sinh học và đánh giá an toàn sinh học chủng *B. velezensis* DTA1 trên động vật và phát triển chế phẩm vi sinh vật sinh EPS cải tạo đất.

2. Thử nghiệm hiệu quả cải tạo đất cát san hô để trồng nhiều loại cây xanh và rau khác.

3. Triển khai thử nghiệm ở quy mô đồng ruộng tại các đảo san hô Trường Sa và các vùng đất khô hạn, nhiễm mặn.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Luận án là công trình nghiên cứu đầu tiên về chủng vi khuẩn bản địa Trường Sa *Bacillus velezensis* DTA1 từ cấp độ hệ gen đến đặc tính sinh học, khả năng chống chịu stress và tiềm năng ứng dụng đa dạng của chủng vi khuẩn trong cải tạo đất khô hạn, mặn, cũng như xử lý ô nhiễm kim loại nặng.

2. Phát hiện mới về cơ chế sinh tổng hợp EPS độc đáo: ở chủng *B. velezensis* DTA1, nguồn đường quyết định hàm lượng và cấu trúc EPS; đặc biệt, chỉ môi trường có sucrose mới kích hoạt đồng thời hai con đường (phụ thuộc Wzx/Wzy và levansucrase), tạo ra EPS chứa 5 loại monosaccharide – vượt trội so với 2–4 loại ở các chủng *B. velezensis* đã công bố.

3. Lần đầu tiên, luận án chứng minh chủng *B. velezensis* DTA1 chịu mặn, sinh EPS có khả năng cải thiện tính chất đất (giữ nước, kết tụ đất), nâng cao năng suất, chất lượng (qua chỉ số SPAD) và khả năng chịu mặn của rau mùng toi, đặc biệt khi phối hợp với giá thể hữu cơ và bentonite.

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Lê Thị Huệ***, Vũ Duy Nhân, Lê Mai Hương, Đỗ Thị Tuyền (2024), Tuyển chọn chủng vi khuẩn chịu mặn, có khả năng sinh exopolysaccharide từ các đảo san hô ở Khánh Hòa, *TNU Journal of Science and Technology*, 229(13), tr. 386 – 393. doi.org/10.34238/tnu-jst.10566. (ACI)
2. **Thị Huệ Lê***, Duy Nhan Vu, Thi Hoai Phuong Nguyen, Mai Huong Le, Cong Tinh Nguyen, Thi Tuyen Do, Van Thang Le, Mai Phuong Pham, Dinh Duy Vu* (2025), Amending coral soil using exopolysaccharide from salt-tolerant *Bacillus velezensis* TSD5 bacteria from an atoll in Vietnam, *Journal of Applied Biology & Biotechnology* 13(5), pp. 151-162. doi: 10.7324/JABB.2025.229116. (Scopus, Q3)
3. **Thị Huệ Lê***, Hoang Tuan Dinh, Duy Nhan Vu, Mai Huong Le, Cong Tinh Nguyen, Quang Cuong Hoang (2025), Characterization and exopolysaccharide production of *Bacillus velezensis* DTA1 from Vietnamese atoll soil, *Journal of degraded and mining lands management*, 12(4), pp. 8305 - 8314, doi:10.15243/jdmlm.2025.124.8305. (Scopus, Q3)
4. **Lê H.T.***, Tran T.T.T.*, Nguyen S.T., La D.D., Vu N.D., Le M.H., Nguyen H.T. (2025), Genomic insights into salt-tolerant, exopolysaccharide-producing *Bacillus velezensis* DTA1 isolated from coral island soil in Vietnam: Implications for soil remediation, *One Ecosystem*, 10, pp. e158806. doi: 10.3897/oneeco.10.e158806. (ESCI, Scopus, Q1)