

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Vũ Minh Tiến

**NGHIÊN CỨU TỐI ƯU ĐIỀU KIỆN LÊN MEN THU SINH KHỐI VÀ
ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG CHUYỂN HÓA PHOSPHATE CỦA CHỦNG
VI KHUẨN CHỊU MẶN *Pseudomonas* sp. TSD-B5.7 TRONG ĐẤT
CÁT NHIỄM MẶN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2025

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Vũ Minh Tiến

**NGHIÊN CỨU TỐI ƯU ĐIỀU KIỆN LÊN MEN THU SINH KHỐI VÀ
ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG CHUYỂN HÓA PHOSPHATE CỦA CHỦNG
VI KHUẨN CHỊU MẶN *Pseudomonas* sp. TSD-B5.7 TRONG ĐẤT
CÁT NHIỄM MẶN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. Vũ Duy Nhân

A blue ink signature of TS. Vũ Duy Nhân.

2. GS.TS. Lê Mai Hương

A blue ink signature of GS.TS. Lê Mai Hương.

Hà Nội - 2025

LỜI CAM ĐOAN

*Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu: “Nghiên cứu tối ưu điều kiện lên men thu sinh khối và đánh giá khả năng chuyển hóa phosphate của chủng vi khuẩn chịu mặn *Pseudomonas* sp. TSD-B5.7 trong đất cát nhiễm mặn” là sản phẩm nghiên cứu do tôi tiến hành dựa trên việc khảo sát, thu thập và phân tích các tài liệu, số liệu mà bản thân trực tiếp tìm hiểu. Kết quả nghiên cứu phản ánh đúng thực tế, bảo đảm tính trung thực, khách quan và chưa từng được công bố trong bất cứ công trình khoa học nào trước đây. Tôi cam kết chịu trách nhiệm toàn diện trước pháp luật về tính trung thực và độ tin cậy của các số liệu cũng như kết quả được trình bày trong luận văn..*

Hà Nội, ngày 24 tháng 11 năm 2025

Tác giả luận văn



Vũ Minh Tiến

LỜI CẢM ƠN

Sau quá trình triển khai nghiên cứu, tôi đã hoàn tất nội dung của luận văn “Nghiên cứu tối ưu điều kiện lên men thu sinh khối và đánh giá khả năng chuyển hóa phosphate của chủng vi khuẩn chịu mặn *Pseudomonas sp.* TSD-B5.7 trong đất cát nhiễm mặn”. Luận văn này được hoàn thiện không chỉ nhờ sự cố gắng của cá nhân tôi, mà còn nhờ sự đồng hành và giúp đỡ nhiệt tình của các cá nhân cũng như tập thể liên quan.

Lời đầu tiên, tôi xin trân trọng gửi lời cảm ơn sâu sắc tới thầy hướng dẫn TS. Vũ Duy Nhân, phòng sinh hóa, phân viện công nghệ sinh học, Trung tâm Nhiệt đới Việt-Nga và GS.TS Lê Mai Hương viện Hóa Học-Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã nhiệt tình hướng dẫn, cung cấp định hướng nghiên cứu và tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành luận văn này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến Ban Lãnh đạo, Phòng Đào tạo cùng toàn thể giảng viên Khoa sinh học, Học viện Khoa học và Công nghệ, những người đã tận tâm giảng dạy và truyền đạt cho tôi những tri thức quý báu trong suốt thời gian học tập.

Đồng thời, tôi xin bày tỏ sự biết ơn chân thành tới Ban Tổng Giám đốc Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga cũng như TS. Nguyễn Thu Hoài cùng toàn thể cán bộ Phòng Sinh hóa, Phân viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga đã dành nhiều sự hỗ trợ quý báu cho tôi trong quá trình thực hiện luận văn.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn đến đề tài “*Nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học để cải tạo cát san hô thành đất canh tác bằng màng sinh học polysaccharide, vật liệu kết dính bentonite và vi sinh vật hữu ích*” nằm trong khuôn khổ Đề tài nghiên cứu KH&CN cấp Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga, đã hỗ trợ kinh phí, cung cấp điều kiện cần thiết và cho phép tôi khai thác các kết quả nghiên cứu để phục vụ cho luận văn.

Sau cùng, tôi bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới gia đình và bạn bè, những người đã luôn ủng hộ, khích lệ và là điểm tựa tinh thần vững chắc cho tôi trong suốt quá trình học tập cũng như thực hiện luận văn cũng như cảm ơn chân thành tới tập thể lớp BIO23A nói riêng, đã quan tâm, hỗ trợ và tạo mọi điều kiện thuận lợi giúp tôi hoàn thành công việc trong thời gian qua.

Hà Nội, ngày 24 tháng 11 năm 2025

Tác giả luận văn



Vũ Minh Tiến

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT.....	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vii
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	viii
MỞ ĐẦU.....	1
Chương 1: TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. Đặc điểm của đất cát nhiễm mặn và điều kiện tự nhiên tại khu vực biển đảo.....	3
1.1.1. Ảnh hưởng của đất nhiễm mặn đối với sự sinh trưởng của cây trồng	3
1.1.2. Đặc điểm khí hậu và thổ nhưỡng tại khu vực biển đảo	4
1.1.3. Giải pháp khắc phục đất nhiễm mặn	6
1.2. Vi sinh vật chuyển hóa phosphate trong đất	9
1.2.1. Vai trò của phosphate trong đất.....	9
1.2.2. Phosphate hữu cơ.....	10
1.2.3. Phosphate vô cơ	11
1.3. Một số nghiên cứu về vi sinh vật chịu mặn phân giải phosphate	11
1.3.1. Vi sinh vật chịu mặn và ứng dụng trong nông nghiệp	11
1.3.2. Vi sinh vật chịu mặn có khả năng phân giải phosphate	13
1.3.3. Một số đặc điểm chung chi vi khuẩn <i>Pseudomonas</i>	15
1.4. Tình hình nghiên cứu về chi vi khuẩn chịu mặn <i>Pseudomonas</i> trong đất nhiễm mặn.....	20
1.4.1. Các nghiên cứu đã thực hiện về chi <i>Pseudomonas</i> trong đất nhiễm mặn và ứng dụng trong cây trồng.	20
1.4.2. Nghiên cứu tối ưu (pH, nhiệt độ, độ mặn, nguồn cacbon, nguồn nitrogen) ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của chi <i>Pseudomonas</i>	22
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	24
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	24
2.1.1. Đối tượng.....	24
2.1.2. Hóa chất, dụng cụ, thiết bị.....	24
2.1.3. Thiết bị, máy móc.....	24
2.1.4. Môi trường nuôi cấy	25
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	26
2.2.1. Phương pháp lựa chọn môi trường và tối ưu điều kiện lên men	26

2.2.2. Xây dựng quy trình lên men thu nhận sinh khối	29
2.2.3. Phương pháp xác định khả năng chuyển hóa Phosphate.....	31
2.2.4. Phương pháp đánh giá hiệu quả chuyển hóa phosphate trong đất	32
2.2.5. Đánh giá khả năng nảy mầm của hạt.....	33
2.2.6. Đánh giá được sự phát triển của một số loài rau xanh bổ sung chế phẩm vi khuẩn phân giải Phosphate so với khi sử dụng các chế phẩm khác sẽ được tiến hành theo các thử nghiệm:	34
2.2.7. Xử lý thống kê số liệu.....	37
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	38
3.1. Nghiên cứu lựa chọn môi trường và tối ưu các điều kiện lên men của chủng vi khuẩn <i>Pseudomonas putida</i> TSD-B5.7 chịu mặn phân giải phosphate	38
3.1.1. Nguồn gốc và thông tin định danh chủng vi khuẩn TSD-B5.7	38
3.1.2. Ảnh hưởng của môi trường đến quá trình lên men thu sinh khối	40
3.1.3. Ảnh hưởng các nguồn cacbon đến quá trình lên men thu sinh khối	41
3.1.4. Ảnh hưởng của nồng độ Saccharose	42
3.1.5. Ảnh hưởng các nguồn Nitơ đến quá trình lên men thu sinh khối	43
3.1.6. Ảnh hưởng của nồng độ cao nấm men	44
3.2. Ảnh hưởng điều kiện nuôi cấy tới quá trình lên men thu sinh khối.....	45
3.2.1. Ảnh hưởng nhiệt độ nuôi cấy	45
3.2.2. Ảnh hưởng của giá trị pH ban đầu	46
3.2.3. Ảnh hưởng của tốc độ lắc.....	46
3.2.4. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống ban đầu.....	47
3.2.5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy	48
3.2.6. Tối ưu điều kiện lên men chủng vi khuẩn phân giải phosphate.	49
3.2.7. Ảnh hưởng của các điều kiện lên men ở quy mô 7 lít/mẻ.....	55
3.2.8. Nghiên cứu lên men thu sinh khối chủng vi khuẩn <i>Pseudomonas putida</i> TSD – B5.7 chịu mặn phân giải phosphate.....	56
3.3. Thử nghiệm đánh giá được hiệu quả làm tăng hàm lượng phosphate hữu hiệu trên đất cát san hô	61
3.3.1. Ảnh hưởng của vi sinh vật phân giải phosphat đến sinh trưởng của cây rau mồng tơi	61

3.3.2 Thay đổi hàm lượng Phosphate trong đất trồng cây.....	66
3.4 Thử nghiệm đánh giá sự phát triển của một số loài rau xanh khi sử dụng độc lập chế phẩm vi sinh vật phân giải Phosphate.	67
3.4.1 Ảnh hưởng của vi khuẩn và môi trường đất lên khả năng nảy mầm của hạt.	67
3.4.2 Hiệu quả cải tạo đất qua thực tế trồng thử nghiệm rau cải.....	69
3.4.3. Hiệu quả cải tạo đất qua thực tế trồng thử nghiệm rau mồng tơi	73
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	76
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	78
PHỤ LỤC.....	1

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Nghĩa Tiếng Anh	Nghĩa Tiếng Việt
CFU	Colony forming unit	Đơn vị hình thành khuẩn lạc
OD	Optical density	Mật độ quang
PK		Môi trường Pikovskaya's cải tiến
PVK	Pikovskaya's	Môi trường Pikovskaya's
PGP		Phân giải phosphate
QCVN		Quy chuẩn Việt Nam
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid	Axit ribônuclêic ribôxôm
TCVN		Tiêu chuẩn Việt Nam
TSD		Tên đảo Trường Sa Đông
VK		Vi khuẩn
VSV		Vi sinh vật

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Dụng cụ và thiết bị được sử dụng	25
Bảng 2.2. Ma trận thực nghiệm Box-Benhken ba yếu tố và mật độ tế bào chủng TSD-B5.7	29
Bảng 2.3. Ảnh hưởng vi khuẩn phân giải Phosphate	33
Bảng 2.4. Kí hiệu mẫu thí nghiệm	34
Bảng 2.5. Ảnh hưởng của chế phẩm vi khuẩn phân giải Phosphate tới cây trồng ...	36
Bảng 3.1. Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của chủng vi khuẩn TSD-B5.7	38
Bảng 3.2. Thông tin định danh của chủng vi khuẩn TSD-B5.7	39
Bảng 3.3. Ma trận thực nghiệm Box – Benhnken 3 yếu tố và giá trị thực nghiệm OD ₆₀₀ nm ở các điều kiện khác nhau	50
Bảng 3.4. Kết quả phân tích ANOVA tối ưu các yếu tố	51
Bảng 3.5. Kết quả phân tích phù hợp của mô hình	52
Bảng 3.6. Sự thay đổi hàm lượng P trong đất trồng rau mồng tơi	66
Bảng 3.7. Theo dõi tỉ lệ nảy mầm trên hạt rau cải	67
Bảng 3.8. Các chỉ tiêu sinh trưởng của rau cải sử dụng độc lập chế phẩm vi khuẩn phân giải phosphate	70
Bảng 3.9. Các chỉ tiêu sinh trưởng của rau mồng tơi	73

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Chu trình phosphate trong đất [17]	9
Hình 3.1 Đánh giá khả năng chịu mặn của chủng TSD-B5.7	39
Hình 3.2. Ảnh hưởng một số môi trường tới mật độ tế bào chủng vi khuẩn TSD-B5.7	40
Hình 3.3. Ảnh hưởng nguồn cacbon đến mật độ tế bào.....	41
Hình 3.4. Ảnh hưởng của nồng độ saccharose đến mật độ tế bào	42
Hình 3.5. Ảnh hưởng nguồn Nito đến mật độ tế bào	43
Hình 3.6. Ảnh hưởng của nồng độ cao nấm men đến mật độ tế bào	44
Hình 3.7. Ảnh hưởng nhiệt độ nuôi cấy đến mật độ tế bào	45
Hình 3.8. Ảnh hưởng giá trị pH ban đầu đến mật độ tế bào	46
Hình 3.9. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến mật độ tế bào	47
Hình 3.10. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống đến mật độ tế bào	48
Hình 3.11. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến mật độ tế bào.....	49
Hình 3.12. Đường tương quan giữa giá trị thực nghiệm và dự đoán	52
Hình 3.13. Đồ thị nhiễu loạn của các thông số đầu vào.....	53
Hình 3.14. Biểu diễn bề mặt đáp ứng của giá trị OD 600. A – Thay đổi nhiệt độ (°C) và thời gian (h); B – Thay đổi của nhiệt độ (°C) và độ pH; C – Thay đổi thời gian (h) và độ pH	53
Hình 3.15. Các giá trị tối ưu cho quy trình theo tính toán	54
Hình 3.16. Ảnh hưởng lượng cấp khí đến mật độ tế bào	55
Hình 3.17. Ảnh hưởng thời gian lên men.....	56
Hình 3.18. Sơ đồ quy trình lên men thu sinh khối chủng vi khuẩn chịu mặn phân giải phosphate.....	57
Hình 3.19. A. Hình thái khuẩn lạc của chủng TSD-B5.7 sau 48 giờ cấy trên môi trường Pikovskaya's agar; B Hình thái tế bào chủng TSD-B5.7 dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 1000 lần.	58
Hình 3.20. Hình ảnh lên men nhân sinh khối trên thiết bị lên men 10 L.....	60
Hình 3.21. Ảnh hưởng của vi sinh vật phân giải phosphate đến sinh trưởng của cây rau mồng tơi tại thời điểm tuần thứ 5.....	61
Hình 3.22. Ảnh hưởng của chủng vi khuẩn phân giải phosphate đến chiều cao của cây rau mồng tơi	62

Hình 3.23. Ảnh hưởng của chủng vi khuẩn phân giải phosphate đến khả năng ra lá của cây rau mồng tơi	63
Hình 3.24. Ảnh hưởng của chủng vi khuẩn phân giải phosphate đến chỉ số SPAD của cây rau mồng tơi.....	64
Hình 3.25. Ảnh hưởng của chủng vi khuẩn phân giải phosphate đến năng suất của cây rau.....	65
Hình 3.26. Hình ảnh rau cải và mồng tơi tại thời điểm thu hoạch.....	70
Hình 3.27. Hình ảnh rau mồng tơi tại thời điểm thu hoạch	73

MỞ ĐẦU

Các đảo thuộc Quần đảo Trường Sa, có điều kiện địa lý – khí hậu đặc thù với nền đất chủ yếu là cát san hô. Loại vật liệu có đặc điểm cơ học thô (80-85 % là cát), độ xốp thấp (37-38 %), pH cao (8-9), có hàm lượng dinh dưỡng thấp và khả năng giữ nước hạn chế với độ trữ ẩm đồng ruộng chỉ đạt khoảng 16-17 %. Những đặc tính này khiến cát san hô không đạt được những tiêu chuẩn cơ bản của đất nông nghiệp, gây trở ngại lớn cho hoạt động trồng trọt, ổn định nguồn thực phẩm tươi sống và xây dựng sinh kế ổn định và bền vững cho cộng đồng dân cư trên đảo. Trong bối cảnh nhu cầu tự chủ lương thực tại chỗ ngày càng cấp thiết, việc cải tạo cát san hô thành đất trồng mang giá trị to lớn, không chỉ về mặt kinh tế và xã hội mà còn ở phương diện quốc phòng – an ninh.

Hiện nay, để khắc phục những đặc tính của nền đất trên chúng ta có thể áp dụng đồng thời các giải pháp cơ học, hóa học, sinh học và áp dụng các biện pháp thủy nông nhằm cải thiện độ phì nhiêu của đất canh tác. Biện pháp cơ học là phương pháp phối trộn những loại giá thể nhằm thay đổi cấu trúc của đất. Biện pháp hóa học là bổ sung nhanh chóng các loại hóa chất, nhằm bổ sung thêm các nguyên tố đa lượng, hoặc vi lượng trong đất. Các phương pháp sinh học là bổ sung các chủng vi sinh vật có lợi vào đất, nhằm tận dụng những thành phần vô cơ trong đất, chuyển hóa thành những thành phần dễ hấp thu cho cây trồng.

Phospho nằm trong số những nguyên tố không thể thiếu trong đời sống của cây trồng chỉ sau Nito. Như vậy cung cấp nguyên tố này cho cây trồng là điều không thể thiếu. Mặc dù tổng hàm lượng P trong đất có thể rất cao, phần lớn (ước tính lên tới 95-99%) tồn tại ở các dạng khó tan, không khả dụng cho thực vật. Trong đất kiềm và trung tính, ion phosphate (PO_4^{3-}) dễ dàng kết tủa với Ca^{2+} tạo thành các hợp chất canxi phosphate. Ngược lại, trong đất chua, chúng bị cố định bởi các ion Al^{3+} và Fe^{3+} . Dạng phosphate mà cây trồng có thể hấp thu hiệu quả nhất là các ion orthophosphate tự do (H_2PO_4^- và HPO_4^{2-}), nhưng nồng độ của chúng trong đất thường rất thấp. Do đó việc sử dụng các vi sinh vật phân giải phosphate (Phosphate Solubilizing Microorganisms - PSMs) đã được công nhận là một phương án lựa chọn hiệu quả. Các PSMs này, bao gồm các loài vi khuẩn và nấm với khả năng hòa tan các hợp chất P khó tan thông qua nhiều cơ chế, chủ yếu là việc tiết ra các axit hữu cơ (ví dụ: gluconic, citric, malic) làm giảm độ pH và sản xuất các enzyme phosphatase giúp khoáng hóa P hữu cơ. Nhờ đó, chúng không chỉ làm tăng lượng P hữu hiệu trong đất mà còn nâng cao hiệu quả sử dụng P từ phân bón, giảm thất thoát và chi phí sản xuất.

Tuy nhiên, một thách thức lớn hiện nay là hiệu quả của các chế phẩm PSM

thương mại thường bị suy giảm đáng kể khi áp dụng vào các hệ sinh thái có điều kiện khắc nghiệt. Các vùng đất cát khu vực ven biển và hải đảo Việt Nam được xem là một ví dụ điển hình với đặc trưng là độ mặn cao, khô hạn thường xuyên và nghèo dinh dưỡng trầm trọng. Độ mặn lớn tạo nên áp lực thẩm thấu và độc tính ion, ức chế sự sinh trưởng và khả năng trao đổi chất của hầu hết các chủng vi sinh vật có nguồn gốc từ đất liền. Do đó, việc nghiên cứu và lựa chọn được chủng PSMs bản địa, có khả năng chịu mặn và hoạt tính phân giải P cao, giữ vai trò then chốt và cần thiết để phát triển bền vững các sản phẩm sinh học chuyên biệt, phù hợp với điều kiện đặc thù này.

Từ những cơ sở trên, đề tài **“Nghiên cứu tối ưu điều kiện lên men thu sinh khối và đánh giá khả năng chuyển hóa phosphate của chủng vi khuẩn chịu mặn *Pseudomonas* sp. TSD-B5.7 trong đất cát nhiễm mặn”** được thực hiện nhằm nghiên cứu xây dựng điều kiện nhân sinh khối để phục vụ chế tạo chế phẩm chủng vi khuẩn chịu mặn phân giải phosphate. Bước đầu đánh giá hiệu quả tích lũy hàm lượng phosphate hữu hiệu trong đất ở điều kiện thử nghiệm thực tế của chủng vi khuẩn này.

Mục tiêu của đề tài:

- Xác lập và tối ưu hóa các điều kiện lên men của chủng vi khuẩn chịu mặn phân giải phosphate TSD-B5.7.
- Bước đầu đánh giá được hiệu quả làm tăng hàm lượng phosphate hữu hiệu trên đất cát san hô và sự phát triển của một số loài rau xanh khi sử dụng chế phẩm vi khuẩn chịu mặn phân giải Phosphate.

Nội dung nghiên cứu:

- Nghiên cứu lựa chọn môi trường và tối ưu điều kiện lên men của chủng vi khuẩn chịu mặn phân giải phosphate được tuyển chọn bằng phương pháp thực nghiệm Box benken.
- Nghiên cứu xây dựng quy trình lên men thu sinh khối chủng vi khuẩn chịu mặn phân giải phosphate.
- Thử nghiệm đánh giá được hiệu quả làm tăng hàm lượng phosphate hữu hiệu trên đất cát san hô.
- Thử nghiệm đánh giá sự phát triển của một số loài rau xanh khi sử dụng độc lập chủng vi khuẩn chịu mặn phân giải Phosphate.

Chương 1: TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Đặc điểm của đất cát nhiễm mặn và điều kiện tự nhiên tại khu vực biển đảo

1.1.1. Ảnh hưởng của đất nhiễm mặn đối với sự sinh trưởng của cây trồng

Đất nhiễm mặn là loại đất có chứa hàm lượng muối cao. Trong phạm vi nghiên cứu của luận văn này, sự tích lũy muối biển do điều kiện thời tiết, sóng biển, thủy triều,... là tác nhân chính gây ra tính chất mặn của đất. Theo nhiều nghiên cứu về đặc điểm thổ nhưỡng của các đảo khơi của Việt Nam, loại đất cát thô sơ ven đảo chiếm tỉ lệ diện tích lớn và có khả năng sẽ tăng dần diện tích nhờ công tác bồi đắp, xây dựng đảo.

Độ mặn của môi trường là một yếu tố có tác động đáng kể đến sự sinh trưởng của thực vật. Hàm lượng muối cao trong đất vô tình tạo ra một môi trường nhược trương, dẫn đến sự gia tăng áp suất thẩm thấu trong dung dịch đất. Do đó khả năng hấp thu nước của cây trồng bị cản trở đáng kể. Ngay cả trong điều kiện đất đủ ẩm nhưng có lượng muối cao, cây trồng cũng khó có thể hấp thu được nước. Độ mặn môi trường cũng phá vỡ sự cân bằng nước trong cây trồng, nó ảnh hưởng tới con đường vận chuyển chất dinh dưỡng, mất nước trong cây trồng. Dinh dưỡng cây trồng cũng sẽ gặp nhiều trở ngại nếu cây sinh sống trong môi trường mặn. Những thành phần khoáng đa lượng như Kali, Canxi,... sẽ bị cạnh tranh bởi các ion muối Na^+ , Cl^- . Như vậy, điều kiện mặn làm giảm khả năng cung cấp các chất dinh dưỡng thiết yếu cho cây trồng.

Độ mặn cao cũng ảnh hưởng nhiều đến sinh lý cây trồng. Nồng độ ion muối cao có trong môi trường sẽ gây ức chế đối với quá trình phát triển, quang hợp và hô hấp. Mặt khác, độ mặn cao cũng gây độc, gây tổn hại cho các cơ quan trên cây trồng. Một vài triệu chứng có thể dễ nhận biết là vàng lá, cháy lá, rụng lá và chết cây.

Ngoài cây trồng, hệ vi sinh vật đất có lợi có đời sống tương tác tích cực với cây trồng cũng bị tác động mạnh bởi độ mặn trong đất. Các vi sinh vật có thể chịu tác động đầu tiên khi có sự xâm nhập mặn vào đất. Những chức năng như phân giải chất hữu cơ, cố định Nitơ tự do,... sẽ gặp nhiều trở ngại.

Tại Việt Nam, có nhiều loài thực vật có thể tiến hóa và sinh tồn trong những môi trường mang hàm lượng muối rất cao. Có thể kể đến như loài Sú Vẹt thuộc họ Đước (*Rhizophoraceae*), loài Đước (*Rhizophora apiculata* Blume),... Chúng là những loài cây sống trực tiếp trên các đầm lầy ven biển và thường xuyên tiếp xúc với nước biển có độ mặn rất cao. Tuy nhiên, những đặc điểm tiến hóa này thường không có trên các giống cây trồng nông nghiệp, đặc biệt là các loại rau xanh, loại rau rất cần

thiết cho nguồn thức ăn trên đảo.

1.1.2. Đặc điểm khí hậu và thổ nhưỡng tại khu vực biển đảo

Nằm ở phía Tây khu vực Đông Nam Á, Việt Nam có vị trí địa lý tiếp giáp trực tiếp với Biển Đông. Trên vùng biển trung tâm của Biển Đông, hướng về phía Đông Nam nước ta là quần đảo cát san hô thuộc tỉnh Khánh Hòa

Nghiên cứu địa tầng chỉ ra rằng các đảo phát triển trên nền móng rạn san hô phức tạp. Cấu trúc địa tầng cơ bản gồm ba lớp: đá vôi san hô (lớp đáy), đá vụn thô gắn kết (lớp giữa) và trầm tích bờ rời (lớp bề mặt). Có thể thấy, tầng địa chất ở trên cùng có vai trò chính tới các hoạt động trên đảo. Các trầm tích bờ rời có cấu trúc gồm có các hạt cát, cuội, sạn, sỏi có kích thước và độ mài mòn khác nhau. Thành phần chính của các loại hạt này chủ yếu là Canxi Cacbonat. Nguồn gốc của chúng là các mảnh vôi, khung xương của sinh vật biển. Qua các quá trình địa chất, chu trình sống, và các hoạt động bồi đắp đảo, các mảnh xương, khung xương san hô được phá vỡ, chìm lắng xuống đáy biển và được đưa trở lại bề mặt dưới dạng các trầm tích bờ rời

Các đảo luôn phải đối mặt với điều kiện thổ nhưỡng khô cằn và nhiễm mặn, gây khó khăn đáng kể cho việc trồng trọt rau và cây xanh. Mặc dù người dân đã tìm cách cải tạo đất hoặc vận chuyển đất từ đất liền ra, diện tích canh tác vẫn rất hạn chế và chủng loại cây trồng không phong phú, thường canh tác chủ yếu là rau muống.

Khí hậu tại vùng biển đảo mang đặc trưng nhiệt đới gió mùa hải dương, được chia thành hai mùa: mùa hè từ tháng 5 đến tháng 9 và mùa đông kéo dài từ tháng 10 đến tháng 4 năm sau. Nhiệt độ tại đây cao quanh năm, trung bình khoảng 27.7 °C, dao động từ 27 °C - 29 °C với biên độ nhiệt không quá 4 °C. Có 2 mùa mưa và khô, chế độ gió biến đổi theo mùa Đông và mùa Hè, mưa và gió mùa Đông Bắc từ tháng 11 năm trước đến tháng 2 năm sau mang hơi muối mặn làm cho đất bị nhiễm mặn.

1.1.2.1. Đặc điểm hóa lý của cát san hô

Cát san hô là một loại vật liệu trầm tích có nguồn gốc sinh học đặc biệt, hình thành từ sự phân rã cơ học và hóa học của san hô, vỏ sò, vỏ ốc và các sinh vật biển có cấu tạo đá vôi. Loại vật liệu này phổ biến ở các đảo san hô và rạn viền ở vùng nhiệt đới, bao gồm quần đảo Trường Sa. Do cấu trúc đặc trưng và thành phần khoáng hóa sinh học, cát san hô có những tính chất lý học khác biệt so với đất khoáng thông thường, ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng sử dụng trong nông nghiệp và các hoạt động cải tạo đất.

Cát san hô chủ yếu bao gồm canxi cacbonat (CaCO_3), chiếm từ 70–95% khối lượng, tùy thuộc vào nguồn gốc và mức độ phong hóa. Hàm lượng CaCO_3 cao làm

cho đất có tính kiềm mạnh có pH dao động từ 8,2 đến 9,3 gây tác động đến quá trình hấp thụ các chất dinh dưỡng như lân (P), sắt (Fe), mangan (Mn) và kẽm (Zn) của cây trồng. Các nghiên cứu chỉ ra rằng đất có pH cao và hàm lượng CaCO_3 lớn gây ra thách thức trong việc xác định chính xác khả năng trao đổi cation (CEC) và ảnh hưởng đến tính khả dụng của các dưỡng chất cho cây trồng.

Hàm lượng hữu cơ của cát san hô thường rất thấp. Hàm lượng chất hữu cơ thấp khiến đất kém khả năng giữ nước và dinh dưỡng gây bất lợi tới sự phát triển của vi sinh vật đất cũng như cây trồng.

Cấu trúc và kết cấu: Cát san hô có kết cấu hạt thô, rời rạc, không kết dính tự nhiên, do thiếu keo sét và chất hữu cơ. Các hạt cát có bề mặt xộp nhưng không liên kết bền vững, dẫn đến nền đất không hình thành được kết cấu ổn định. Kết cấu rời khiến đất dễ bị xói mòn, sụt lún cục bộ và không giữ được độ ẩm hoặc chất dinh dưỡng. Theo Trần Anh Tuấn (2014) cát san hô có độ rỗng trung bình 50 - 58 %, cao hơn nhiều so với đất nông nghiệp thông thường nhưng lại thiếu liên kết nội tại giữa các hạt [1].

- Kích thước hạt: Kích thước hạt phổ biến của cát san hô dao động từ 0,5 - 2,0 mm, thuộc nhóm cát thô đến cát trung bình theo phân loại USDA. Nghiên cứu của Zhang và cộng sự (2018) chỉ ra rằng cấu trúc hạt này làm cho cát san hô có hệ số thấm nước cao gấp 10–30 lần so với đất thịt pha cát [2].

- Độ giữ nước: Khả năng giữ nước của cát san hô là rất thấp, thường < 5% thể tích đất. Theo Zhang (2023) cho thấy chỉ 2 - 4% nước được lưu lại sau 24 giờ từ lúc tưới, gây khô hạn nhanh ở tầng rễ [2].

- Sức trao đổi cation (CEC): Chỉ số biểu thị khả năng giữ lại và trao đổi các ion dinh dưỡng của đất – của cát san hô là rất thấp, chỉ < 5 meq/100g. Điều này khiến phân bón dễ bị rửa trôi, dẫn đến cây trồng thiếu dinh dưỡng ngay cả khi được bổ sung phân đều đặn. Vessey (2003) cũng ghi nhận hiện tượng cây trồng trên nền đất cát san hô cần bón phân với tần suất gấp 2–3 lần so với đất thường nhưng hiệu suất hấp thụ vẫn thấp hơn [3].

1.1.2.2. Đặc điểm sinh học của cát san hô

Cát san hô về bản chất là chất liệu trơ, có nguồn gốc khác với các loại đất hình thành trực tiếp trên lục địa nên gần như không chứa hệ sinh vật đất phong phú như các loại đất tự nhiên khác. Hệ vi sinh vật trong cát san hô thường nghèo nàn, chủ yếu là các nhóm vi khuẩn có khả năng chịu kiềm và chịu mặn. Điều này là do cát san hô

thường có pH cao (kiềm nhẹ đến trung bình) và môi trường thiếu hữu cơ nên sẽ khắc nghiệt cho các loài vi sinh vật có lợi sinh trưởng.

Sự thiếu hụt về đa dạng vi sinh vật chức năng, đặc biệt là các nhóm vi sinh vật có khả năng cố định đạm (như *Azotobacter*) và phân giải phosphate (như *Bacillus megaterium*), dẫn đến khả năng cung cấp dinh dưỡng tự nhiên của cát san hô rất kém. Ngoài ra, việc thiếu lớp đệm sinh học – tức tầng vi sinh vật bám quanh hạt đất – làm cho kết cấu cát san hô dễ bị phá vỡ dưới tác động của gió, mưa và tưới nước, gây hiện tượng rửa trôi, mất ổn định cơ học và làm suy giảm nhanh chóng hiệu quả cải tạo nếu không có biện pháp bảo vệ phù hợp.

Do hoạt động phân giải chất hữu cơ gần như không xảy ra trong môi trường cát san hô, các loại phân hữu cơ nếu được bổ sung cũng khó được khoáng hóa để chuyển hóa thành dinh dưỡng dễ tiêu cho cây trồng. Hệ quả là sự tích tụ vật chất hữu cơ chưa phân hủy xảy ra, gây lãng phí tài nguyên đầu vào và có thể dẫn đến các phản ứng phụ bất lợi cho cây nếu tích lũy kéo dài.

Từ những phân tích trên có thể thấy rằng, các hạn chế sinh học của cát san hô bao gồm sự thiếu hụt hệ vi sinh vật chức năng, khả năng phân giải hữu cơ kém và sự bất ổn trong cấu trúc đất là những rào cản lớn đối với mục tiêu canh tác bền vững tại các đảo san hô xa bờ như Trường Sa. Do đó, bên cạnh các giải pháp cơ học và hóa học, việc ứng dụng vi sinh vật có ích thông qua các chế phẩm vi sinh đa chức năng đang được xem là hướng đi quan trọng và bền vững nhằm phục hồi sinh thái đất, tăng cường khả năng cung cấp dinh dưỡng và nâng cao hiệu quả sử dụng tài nguyên tại chỗ.

Tổng quan điều kiện tự nhiên và thổ nhưỡng đã cho thấy rõ những giới hạn sinh thái đặc thù của quần đảo Trường Sa nơi có nền địa chất chủ yếu là cát san hô, nghèo chất hữu cơ, khả năng giữ nước và dinh dưỡng thấp, đồng thời chịu ảnh hưởng mạnh mẽ của khí hậu khô nóng và gió mùa biển. Những điều kiện này đặt ra thách thức không nhỏ cho bất kỳ nỗ lực phát triển nông nghiệp nào tại khu vực đảo xa bờ này. Chính vì vậy, để bảo đảm an ninh lương thực cho cán bộ, chiến sĩ và cư dân sinh sống trên đảo, việc khảo sát thực trạng canh tác và đánh giá các giải pháp cải tạo đất hiện hữu là bước tiếp theo mang ý nghĩa thiết yếu và thực tiễn.

1.1.3. Giải pháp khắc phục đất nhiễm mặn

Hiện nay, có hai phương hướng tiếp cận để khắc phục với tình trạng đất nhiễm mặn.

Phương pháp hiện đại tập trung vào việc tìm kiếm giống cây trồng có khả năng chịu mặn cao thông qua ứng dụng các kỹ thuật công nghệ gen và sàng lọc giống. Quá trình này gồm việc phân lập và chuyển các gen quy định tính trạng chịu mặn từ các loài thực vật với khả năng thích ứng tự nhiên trong điều kiện môi trường khắc nghiệt vào các giống cây trồng chủ lực. Mục tiêu cốt lõi là tạo ra các giống cây trồng không chỉ duy trì được hiệu quả năng suất và chất lượng nông sản dưới điều kiện mặn mà còn thể hiện khả năng chống chịu vượt trội [4].

Tại Việt Nam, những thành tựu đáng kể trong lĩnh vực được thể hiện rõ qua sự phát triển của các giống lúa như ST24 và ST25. Các giống lúa này được đánh giá cao về khả năng chịu mặn cao, đồng thời mang lại năng suất ổn định, góp phần thiết yếu vào việc duy trì và củng cố an ninh lương thực tại các vùng đồng bằng ngập mặn, đặc biệt là Đồng bằng sông Cửu Long [5]. Cơ chế chịu mặn của các giống lúa này thường liên quan đến các đặc điểm sinh lý phức tạp như khả năng điều hòa áp suất thẩm thấu nội bào, tích lũy các chất hòa tan tương thích (ví dụ: proline, glycine betaine) và cơ chế loại bỏ hoặc cô lập ion Na^{2+} dư thừa trong không bào, nhằm hạn chế độc tính của muối ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất của tế bào [6]. So với các giống lúa truyền thống, các giống lúa ST24 và ST25 thể hiện sự cải thiện đáng kể về ngưỡng chịu mặn và duy trì năng suất cao hơn, điều này là một bước tiến quan trọng trong công tác chọn tạo giống.

Tuy nhiên, quá trình triển khai các giải pháp công nghệ cao này vẫn còn gặp phải nhiều khó khăn và hạn chế. Thứ nhất, kinh phí đầu tư cho nghiên cứu, phát triển và ứng dụng công nghệ gen là rất lớn, đòi hỏi nguồn lực tài chính đáng kể từ cả nhà nước và các tổ chức nghiên cứu. Thứ hai, sự phức tạp về kỹ thuật yêu cầu đội ngũ chuyên gia có trình độ chuyên môn cao, cơ sở hạ tầng phòng thí nghiệm hiện đại và quy trình thực hiện nghiêm ngặt. Điều này có thể dẫn đến hiệu quả ứng dụng thấp và thậm chí không khả thi tại các vùng biển đảo khắc nghiệt, hẻo lánh hoặc các quốc gia đang phát triển có điều kiện kinh tế và công nghệ hạn chế [7]. Hơn nữa, việc chấp nhận của cộng đồng đối với cây trồng biến đổi gen (GMO) cũng là một yếu tố xã hội cần được xem xét cẩn trọng.

Phương Pháp Truyền Thống: Khai thác tiềm năng vi sinh vật và nguyên liệu tự nhiên ngược lại với phương pháp hiện đại, các giải pháp truyền thống mang tính ứng dụng cao hơn, đơn giản, dễ thực hiện và có khả năng tận dụng các nguồn nguyên liệu sẵn có tại địa phương hoặc các phụ phẩm từ sản xuất nông nghiệp. Trọng tâm của phương pháp này là việc ứng dụng các tương tác sinh học có lợi giữa vi sinh vật và đất, vi sinh vật và cây trồng, cũng như tương tác phức tạp giữa hệ vi sinh vật của đất và cây trồng để cải thiện môi trường đất nhiễm mặn.

Ứng dụng vi sinh vật Trong cải thiện đất nhiễm mặn.

Vi sinh vật đóng vai trò thiết yếu trong việc cải thiện các đặc tính hóa lý của đất, tăng cường chu trình dinh dưỡng và khả năng giữ nước, đặc biệt quan trọng trong điều kiện đất bị ảnh hưởng bởi mặn. Các nghiên cứu đã chỉ ra một số chủng vi sinh vật có khả năng sản xuất các hợp chất sinh học có lợi như exopolysaccharides (EPS), enzyme, và các chất điều hòa sinh trưởng thực vật, góp phần giảm thiểu tác động tiêu cực của mặn lên đất và cây trồng [8].

Một nghiên cứu tiêu biểu tại Việt Nam là việc sử dụng nấm men *Lipomyces* để tạo ra một lớp màng nhầy nhằm cải thiện chất lượng đất. Nguyễn Kiều Băng Tâm và cộng sự (2018) đã nghiên cứu được chế phẩm từ chủng nấm men này không chỉ giúp đất giữ nước tốt hơn mà còn cải thiện độ tơi xốp và điều chỉnh độ pH của đất [9]. Các polysaccharid ngoại bào (EPS) do nấm men sản xuất giúp liên kết các hạt đất, tạo nên các cấu trúc ổn định hơn (aggregate), từ đó tăng cường khả năng giữ ẩm, cải thiện độ thoáng khí và thoát nước của đất. Kết quả thử nghiệm trên đồi chè đã cho thấy sự cải thiện rõ rệt về năng suất và sự phát triển khỏe mạnh của cây trồng, đặc biệt có ý nghĩa đối với các khu vực đồi núi, nơi đất thường gặp vấn đề về độ dốc và khả năng giữ nước kém do kết cấu đất [10]. Đối chiếu với những phương pháp cải tạo vật lý truyền thống như cày xới sâu hay trộn vật liệu hữu cơ, việc sử dụng nấm men *Lipomyces* mang lại hiệu quả cải thiện cấu trúc đất bền vững hơn và ít tốn kém hơn.

Một công trình nghiên cứu nổi bật khác do Nguyễn Thu Hà và cộng sự (2021) tiến hành tại Viện Thổ nhưỡng Nông hóa, thuộc Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. Nghiên cứu này tập trung vào việc tạo ra chế phẩm vi sinh tổng hợp với sự kết hợp của nhiều nhóm vi sinh vật có các chức năng đa dạng, bao gồm:

Vi sinh vật chuyển đổi nitơ từ không khí: Cung cấp nguồn đạm tự nhiên cho cây trồng, giảm thiểu sự phụ thuộc vào phân bón hóa học [11].

Vi sinh vật chuyển hóa photphat khó tan: Chuyển đổi các hợp chất photpho khó tan trong đất thành dạng cây trồng có thể hấp thu được, tăng cường khả năng hấp thu photpho [12].

Vi sinh vật hòa tan kali từ khoáng chất trong đất: Giải phóng kali, một chất dinh dưỡng thiết yếu cho sự phát triển của cây trồng từ các khoáng vật không tan [13].

Vi sinh vật sản xuất polysaccharide giữ ẩm tự nhiên: Tăng cường khả năng giữ nước của đất, cải thiện cấu trúc đất và giảm bay hơi nước [14].

Hiệu quả của chế phẩm này đã được chứng minh rõ ràng: khi được áp dụng vào đất, nó làm tăng đáng kể hàm lượng dinh dưỡng sẵn có, thúc đẩy sự phát triển của các quần thể vi sinh vật có lợi, đồng thời nâng cao năng suất và sinh khối của cây

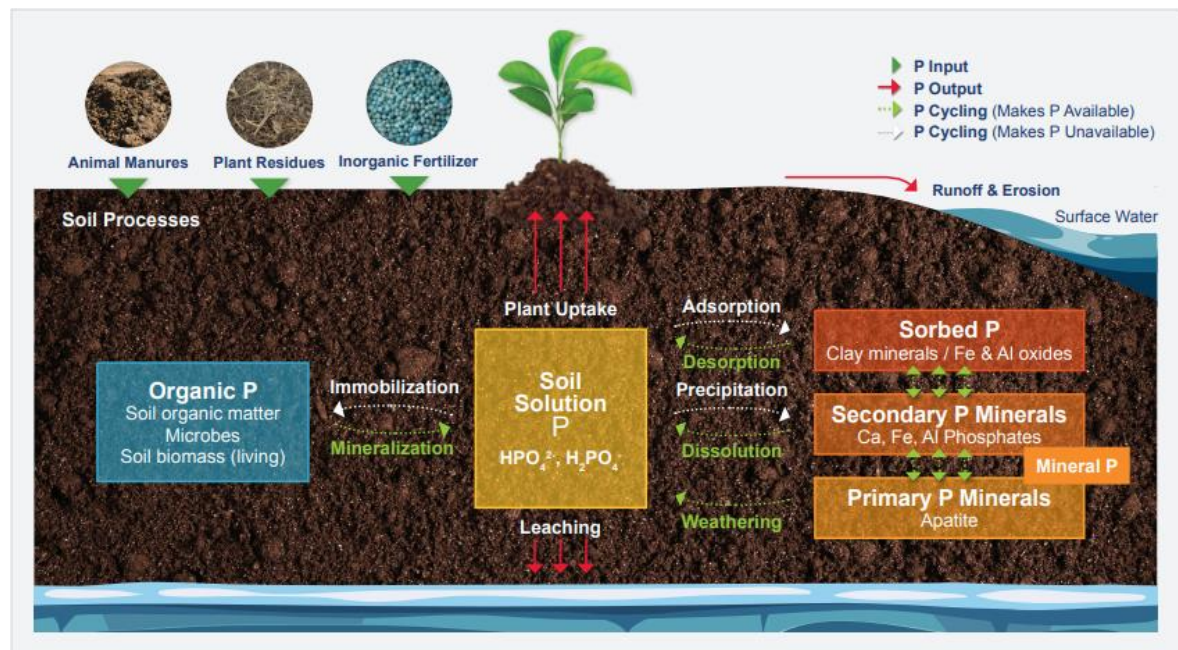
trồng [15]. Với các nghiên cứu trước đây thường chỉ tập trung vào một loại vi sinh vật hoặc một chức năng đơn lẻ, chế phẩm của Nguyễn Thu Hà (2021) mang tính tổng hợp hơn, khai thác tối đa các tương tác cộng sinh và chức năng đa dạng của quần thể vi sinh vật để đạt được hiệu quả cải tạo đất toàn diện hơn. Ví dụ, trong khi một số nghiên cứu chỉ tập trung vào vi khuẩn cố định nitơ, nghiên cứu này tích hợp nhiều chủng vi sinh vật để giải quyết đồng thời các vấn đề về dinh dưỡng, đặc điểm cấu trúc và khả năng giữ nước của đất mặn.

1.2. Vi sinh vật chuyển hóa phosphate trong đất

1.2.1. Vai trò của phosphate trong đất

Phosphate là một dạng muối được tạo thành bởi một hay nhiều gốc (PO_4). Có thể nói rằng dạng phosphate phổ biến nhất ngoài tự nhiên là các hợp chất dựa trên trên anion (PO_4). Cấu trúc này bao gồm 4 nguyên tử Oxy sắp xếp gần như tạo thành một tứ diện dựa với nguyên tử P nằm ở trung tâm. Những hợp chất như vậy thường được gọi là monophosphate. Và chúng trở thành dạng phosphate ổn định nhất và duy nhất trong tự nhiên [16].

Chu trình Phosphate cũng được coi là chu trình khó xoay chuyển và có thời gian lâu nhất trong tự nhiên. Chu trình này bao gồm sự kết hợp của cả ba chu trình Địa - Hóa - Sinh. Nó giữ vai trò thiết yếu trong mô tả sự biến đổi và vận chuyển của phosphate trong tự nhiên qua Thạch quyển - Thủy quyển - Sinh Quyển.



Hình 1.1. Chu trình phosphate trong đất [17]

Phosphate ngoài tự nhiên thường tồn tại dưới dạng khoáng thạch. Sự phong hóa của tự nhiên (Mưa - Gió - Nhiệt độ) xói mòn và các phản ứng hóa học theo thời gian

làm giải phóng các ion PO_4 và các khoáng chất của chúng và trong đất và nước.

Thực vật là những sinh vật tự dưỡng và phosphate là nguyên tố đa lượng thiết yếu cho sự phát triển của chúng. Phosphate (PO_4) được cây hấp thu thông qua rễ. Trong cơ thể thực vật, phosphate được tổng hợp nên những phân tử quan trọng DNA, RNA, ATP, phospholipid – những phân tử quyết định trong sự sống của thực vật. Điều đặc biệt, thực vật chỉ hấp thu được dạng phosphate PO_4 .

Thực vật tích trữ nguyên tố phosphate dưới các dạng phân tử hữu cơ. Các loài động vật ăn thực vật và trực tiếp hấp thu lượng phosphate trong đó. Tiếp đó, các loài động vật ăn thịt hấp thu phosphate nhờ ăn các loài động vật ăn thực vật. Nguyên tố phosphate sau đó được tích lũy trong các mô và xương của động vật.

Khi kết thúc vòng đời, các thành phần hữu cơ từ thực vật và động vật sẽ bị phân hủy bởi các dạng nấm, vi khuẩn. Quá trình này từ từ giải phóng các dạng phosphate hữu cơ trở lại môi trường đất. Tiếp sau đó, một nhóm các vi sinh vật đất thực hiện quy trình khoáng hóa, chuyển đổi các dạng hữu cơ thành vô cơ mà cây có thể hấp thu được. Từ đó tiếp tục chu trình sinh hóa của phosphate.

Một phần dạng hòa tan của phosphate trong đất và nước có thể bị cuốn trôi theo dòng chảy vào các thủy vực, sông và biển. Theo thời gian, phosphate bị kết tủa và tích tụ trong các lớp trầm tích dưới đáy. Trải qua hàng trăm triệu năm để hình thành các loại đá phosphate mới, hoàn thành chu trình địa chất của phosphate. Các hoạt động kiến tạo địa chất cũng có thể đưa các lớp đá phosphate từ đáy biển trở lại bề mặt và tiếp tục chu trình trong tự nhiên.

Có thể nói rằng, chu trình phosphate là một chu trình khá chậm so với chu trình cacbon hay nitrogen. Phosphate di truyền trong tự nhiên không có giai đoạn khí. Hơn nữa, phosphate dễ bị cố định bởi ion như sắt, nhôm, canxi trong đất làm giảm khả năng hấp thu của cây.

1.2.2. Phosphate hữu cơ

Dựa theo những đặc điểm trong chu trình phosphate, các loại phân bón đặc trưng được tạo ra nhằm phục vụ công tác chăm sóc và đảm bảo dinh dưỡng lâu dài cho cây trồng. Phosphate hữu cơ được tạo nên dựa theo bước phân hủy chậm của xác động vật, thực vật nhờ các loại vi sinh vật. Như tên gọi, phosphate hữu cơ dựa trên nguồn gốc các chất hữu cơ còn lại từ thực vật và động vật (xương, phân) các phụ phẩm trong hoạt động công nghiệp. Vai trò chính của phosphate hữu cơ là dự trữ nguồn dinh dưỡng phosphate cho cây trồng. Quá trình phân hủy chậm, cộng với quá trình khoáng hóa sẽ giải phóng phosphate thành dạng phosphate vô cơ trong thời gian dài, cùng

cấp dinh dưỡng ổn định ổn định cho cây trồng.

1.2.3. Phosphate vô cơ

Phosphate vô cơ là dạng Phosphate được tổng hợp dựa trên kết quả của sự khoáng hóa nhờ vi sinh vật trong chu trình phosphate. Đây được xem là dạng Phosphate vô cơ đơn giản nhất và là dạng chính để cây có thể hấp thu được. Các dạng lân vô cơ trong đất bao gồm Orthophosphate (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^-) và Phosphate khoáng (dạng lân khi được cố định trong các ion kim loại như Canxi, Sắt, Nhôm,... Tuy nhiên, thực vật chỉ hấp thu tốt dạng lân Orthophosphate (H_2PO_4^-). Vì vậy, các loại phân lân được tạo ra sẽ chủ yếu dựa trên gốc H_2PO_4^- , còn được gọi là Phosphate dễ tiêu. Một số loại phân bón cung cấp phosphate cho cây trồng ở dạng vô cơ có thể kể đến là Super lân ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$): Dễ tan trong nước, cung cấp lân dễ tiêu cho cây, DAP (Diammonium phosphate) và MAP (Monoammonium phosphate): Phân phức hợp chứa cả lân và đạm, MKP (Mono potassium phosphate): Phân phức hợp chứa lân và kali.

1.3. Một số nghiên cứu về vi sinh vật chịu mặn phân giải phosphate

1.3.1. Vi sinh vật chịu mặn và ứng dụng trong nông nghiệp

Trong tự nhiên, tồn tại một số môi trường sống mang tính khắc nghiệt như nhiệt độ cực cao, nồng độ chất tan rất lớn,... Hầu hết các sinh vật sống không tồn tại được trong những điều kiện môi trường như vậy. Tuy nhiên, một số các chủng vi sinh vật mang những đặc điểm tiến hóa theo thời gian có khả năng chịu được những điều kiện mặn. Vi sinh vật chịu mặn (halophilic microorganisms) là nhóm các chủng vi sinh vật có khả năng phát triển trong điều kiện mặn cao. Xét về độ tương thích, chúng được xếp làm 3 nhóm: Vi khuẩn có khả năng chịu mặn kém (môi trường có nồng độ muối 1 % - 8 %), Vi khuẩn có khả năng chịu mặn trung bình (môi trường có nồng độ muối 8 % - 15 %), Vi khuẩn chịu mặn cao (môi trường có nồng độ muối trên 15 %). Một số nghiên cứu đã tìm ra được các cơ chế thích nghi với điều kiện mặn. Roberts và cộng sự (2005) công bố nghiên cứu về hoạt động điều chỉnh áp suất thẩm thấu bằng việc tổng hợp các hợp chất hữu cơ ngoại bào: proline, betaine hoặc trehalose. Oren (2013) nghiên cứu về cách thức điều chỉnh thành phần lipid màng tế bào, giúp duy trì tính ổn định của màng trong điều kiện có áp suất thẩm thấu cao. Kunte và cộng sự (2002) cũng nghiên cứu về các enzyme từ các vi sinh vật chịu mặn có cấu trúc đặc biệt giúp chúng hoạt động ổn định trong môi trường có nồng độ muối cao [18, 19, 20].

Qua thời gian, nhiều chủng vi sinh vật chịu mặn dần được giới khoa học phát hiện và mô tả chi tiết. Phổ biến nhất có thể kể đến: Chi *Bacillus*: Vi khuẩn Gram dương, dạng que, có khả năng tạo nội bào tử và có khả năng chịu đựng điều kiện môi trường khắc nghiệt. Một số loài: *Bacillus subtilis* và *Bacillus velezensis* có thể sinh trưởng trong điều kiện mặn cao. Chi *Halobacterium*: Nhóm vi khuẩn cổ (Archaea) ưa mặn, có thể sống ở môi trường với độ mặn cực kỳ cao như các hồ muối hoặc khu vực khai thác muối. Chi *Halomonas*: Vi khuẩn gram âm, phát triển mạnh trong điều kiện mặn, thường được tìm thấy ở vùng ven biển và môi trường nước mặn. Một số loài có khả năng sản xuất các hợp chất sinh học có giá trị công nghiệp [19, 21].

Cùng với tiến bộ của khoa học và công nghiệp, nền nông nghiệp hiện đại cần có những giải pháp thay thế cho những hoạt động canh tác gây ảnh hưởng tiêu cực tới môi trường. Do đó, việc áp dụng các vi khuẩn có ích cho môi trường đang là tiềm năng đối với các phương pháp nông nghiệp hiện đại và bền vững. Một số ứng dụng nổi bật của các vi sinh vật trong lĩnh vực nông nghiệp có thể kể đến là: Cải tạo đất nhiễm mặn, Thúc đẩy sự phát triển của cây trồng, Kiểm soát dịch bệnh trong nông nghiệp,...

Ứng dụng trong cải tạo đất nhiễm mặn, độ mặn của môi trường tác động rất lớn tới hệ vi sinh trong đất điều kiện này ảnh hưởng trực tiếp và gián tiếp tới cây trồng. Một số loại vi khuẩn có khả năng phân hủy hay chuyển hóa muối và giảm độ mặn trong đất thành các dạng ít gây hại hoặc thúc đẩy quá trình rửa mặn tự nhiên của đất. Đồng thời tổ hợp các chi *Bacillus*, *Halomonas* và *Pseudomonas* có thể tạo ra hợp chất polymer ngoại bào exopolysaccharide (EPS), giúp giữ ẩm và tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của các vi sinh vật khác, góp phần cải tạo đất [22].

Trong quá trình sinh trưởng của vi sinh vật sinh ra nhiều hợp chất mang giá trị dinh dưỡng lớn. Một số vi khuẩn như *Azospirillum*, *Rhizobium* có thể cố định nitơ từ không khí, bổ sung nguồn dinh dưỡng thiết yếu cho cây. Các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* và *Pseudomonas* tiết được enzyme giúp chuyển hóa các hợp chất photphat khó tan, tăng khả năng hấp thu lân của cây. Một số loài vi khuẩn như *B. velezensis* có thể sản xuất auxin, gibberellin và cytokinin – các hormone thực vật quan trọng giúp phát triển rễ và thân cây.

Một tác động ảnh hưởng đáng kể đến khả năng chống chịu dịch bệnh ở cây là các hợp chất kháng sinh tự nhiên được sản xuất bởi vi sinh vật. *B. subtilis*, *B. velezensis* sản xuất các hợp chất kháng khuẩn như surfactin, iturin, fengycin giúp tiêu diệt hoặc ức chế nấm bệnh trong đất. Tính cạnh tranh môi trường sống cũng là một yếu tố phòng ngừa sự xâm hại của vi khuẩn và nấm bệnh. Các vi khuẩn có lợi có thể

chiếm lĩnh vùng rễ, ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn và nấm gây bệnh như *Fusarium*, *Phytophthora* [18, 23].

1.3.2. Vi sinh vật chịu mặn có khả năng phân giải phosphate

Cùng với nitơ, phospho đặc biệt thiết yếu cho sinh trưởng và phát triển của cây trồng bởi chúng đóng vai trò chính trong việc tạo nên cấu trúc nên nhiều bộ phận quan trọng đối với sự sống như DNA, RNA. Phospho thường hiện diện trong đất dưới dạng Phosphate khó tan, giảm khả năng hấp thu từ đất tới rễ cây trồng. Tuy nhiên, trong tự nhiên có tồn tại nhóm VSV chuyển đổi trạng thái phosphate này thành những dạng phosphate hòa tan. Nhờ vào đó, cây trồng có thể dễ dàng hấp thu phosphate cùng với sự hấp thu của nước và các khoáng chất cần thiết khác [24].

Các vi sinh vật có khả năng phân giải phosphate thuộc nhóm vi sinh vật có lợi, chuyển hóa được các hợp chất phospho hữu cơ và vô cơ ít hòa tan thành dạng có thể hấp thu cho cây. Các loại vi sinh vật trong đất đã được báo cáo về khả năng hòa tan phospho bằng cơ chế hòa tan và khoáng hóa bao gồm *Pseudomonas* spp., *Agrobacterium* spp. và *Bacillus circulans* [24].

Vi khuẩn phân giải phosphate thông qua nhiều cơ chế khác nhau: do khả năng sinh axit, chelat hóa và khoáng hóa.

Khả năng sinh axit: Cơ chế chính của việc chuyển hóa phosphate trong đất liên quan đến sự hạ thấp pH, do axit hữu cơ được tạo ra hoặc các ion H^+ được giải phóng. Phosphate trong đất kiềm có xu hướng hình thành canxi phosphate không tan và mức hòa tan của chúng được cải thiện khi độ pH của đất giảm xuống. Vi sinh vật sinh axit hữu cơ từ đó giảm độ pH trong đất dẫn đến sự hòa tan phosphate. Mỗi loài vi sinh vật có khả năng sinh ra các loại và hàm lượng axit hữu cơ khác nhau, trong đó hiệu quả hòa tan phụ thuộc vào đặc tính và độ mạnh của axit. Chúng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* và *Bacillus amyloliquefaciens* có khả năng hòa tan phosphate hiệu quả thông qua việc sản xuất phối hợp nhiều axit hữu cơ, bao gồm lactic, isovaleric, isobutyric và acetic [24].

Quá trình chelat hóa: Một số loại axit hữu cơ do vi sinh vật phân giải phosphate tiết ra có thể hòa tan phosphate khó tan thông qua quá trình chelat hóa với các cation làm giảm sự cạnh tranh hấp phụ phosphate trong đất, trong đó các nhóm hydroxyl và carboxyl của phức axit-chelate-cation liên kết với phosphate, do đó chuyển nó thành các dạng hòa tan. Axit 2-ketogluconic được ghi nhận có khả năng tạo phức chelat bền vững với Ca^{2+} [24].

Quá trình khoáng hóa: Thực vật và động vật chứa nhiều hợp chất phosphate hữu cơ, bao gồm axit nucleic, phospholipid, axit phytic, polyphosphate và phosphonate,.... Các vi sinh vật trong đất khoáng hóa các hợp chất phosphate hữu cơ này thông qua việc sản xuất enzyme phosphatase, chẳng hạn như phytase, thủy phân các dạng hữu cơ và giải phóng phosphate vô cơ, nguồn dinh dưỡng mà thực vật có thể hấp thu.”.

Việc ứng dụng vi sinh vật hòa tan phosphate dưới dạng chế phẩm sinh học được coi là một giải pháp triển vọng trong cải tạo đất bạc màu và nâng cao năng suất nông nghiệp. Trong đó, loài *Bacillus thuringiensis* có khả năng hòa tan phosphate hiệu quả từ đó thúc đẩy sự phát triển chiều dài rễ lúa trong thí nghiệm. Việc kết hợp sử dụng đồng thời hai chủng *Azotobacter chroococcum* và *Bacillus subtilis* đã mang lại hiệu quả đáng kể trong việc cải thiện năng suất cây lúa mì. Khả năng sinh trưởng của bắp cải tăng khi đất được bón phân chứa hai loài nấm *Aspergillus niger* và *Penicillium aculeatum* [24].

Bên cạnh đó, việc kết hợp các chủng vi sinh vật phân giải phosphate để cải tạo đất nông nghiệp bị nhiễm mặn – kiềm được đánh giá là giải pháp mang lại hiệu quả đồng thời đảm bảo an toàn cho môi trường và sức khỏe con người khác với những tác động tiêu cực thường gặp khi lạm dụng phân bón tổng hợp. Chủng chịu mặn *Kushneria* sp. YCWA18 có khả năng hòa tan cả phosphate vô cơ và phosphate hữu cơ có thể được sử dụng để cải tạo đất nông nghiệp nhiễm kiềm mặn [24].

Các chủng *Aerococcus* sp. PSBCRG1-1, *Pseudomonas aeruginosa* PSBI3-1, *A.terreus* PSFCRG2-1 và *Aspergillus* sp. PSFNRH-2 đều được chứng minh là có thể hòa tan tricalcium phosphate ở các nồng độ NaCl khác nhau. *Burkholderia cepacia* có khả năng hòa tan phosphate thúc đẩy sự phát triển của cây ngô ở nồng độ NaCl lên đến 5%. Những chủng vi sinh vật này đều có tiềm năng là phân bón vi sinh trong nông nghiệp bị nhiễm mặn.

Theo nghiên cứu của Cao Ngọc Diệp và cộng sự (2010) việc bổ sung *Pseudomonas* spp. khả năng chuyển hóa các hợp chất phosphate khó tan cho cây đậu nành đã góp phần nâng cao chất lượng hạt, thể hiện qua sự gia tăng hàm lượng protein và lipid. Bên cạnh đó, khi kết hợp vi khuẩn cố định đạm *Bradyrhizobium japonicum* với *Pseudomonas* spp., số lượng nốt sần, khối lượng khô của nốt sần rễ, đồng thời nâng cao rõ rệt khả năng hấp thu dinh dưỡng của cây đậu nành, đồng thời lượng phân lân vô cơ sử dụng được cắt giảm đáng kể. Ngoài ra nghiên cứu cũng chỉ ra rằng hai chủng vi khuẩn *Pseudomonas putida* TAL01 và *Bacillus subtilis* TAL04 có khả năng hòa tan phosphate khó tan, cung cấp khoảng 50% lượng phosphate khả dụng cho cây lúa trên đất thịt pha cát tại thành phố Tuy Hòa, tỉnh Phú Yên [24]

1.3.3. Một số đặc điểm chung chi vi khuẩn *Pseudomonas*

Chi *Pseudomonas* là nhóm vi khuẩn Gram âm, có hình dạng que và di động nhờ một hoặc nhiều tiên mao ở cực, thuộc lớp *Gammaproteobacteria*. Đây là chi vi khuẩn phổ biến và đa dạng sinh học, tồn tại trong nhiều loại môi trường khác nhau, bao gồm đất, nước ngọt, nước biển, thực vật thậm chí từ các môi trường cực đoan như đất khô hạn, nước mặn, vùng ô nhiễm dầu hoặc chất độc hữu cơ. Một số loài thuộc chi này, ví dụ như: *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, và *P. putida*, không chỉ nổi bật về mặt sinh lý và chuyển hóa mà còn thể hiện khả năng thích nghi cao với các điều kiện môi trường khắc nghiệt, bao gồm cả tình trạng mặn hóa [25].

Về mặt sinh thái, nhiều loài *Pseudomonas* tham gia tích cực vào các quá trình chuyển hóa và phân giải các hợp chất hữu cơ trong môi trường tự nhiên. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung vào khả năng chuyển đổi phosphate từ dạng muối vô cơ khó tan sang dạng phosphate khả dụng đảm bảo dinh dưỡng cho thực vật. Các nghiên cứu trên thế giới về chi *Pseudomonas* đã cung cấp thêm đánh giá về hoạt tính sinh học của chúng. Ventosa và cộng sự (1995) cho rằng, hầu hết các loài vi khuẩn hòa tan Phosphate, bao gồm cả các loài thuộc chi *Pseudomonas*, giải phóng các P hòa tan từ các loại khoáng phosphate ít tan bằng cách tạo ra hàm lượng acid gluconic cao từ glucose ngoại bào [26]. Đây là một cơ chất đặc trưng của hoạt tính phân giải phosphate từ vi sinh vật, đồng thời đây cũng là con đường dị hóa glucose ở các loài vi khuẩn này. Miller (2010) đã đưa ra nghiên cứu so sánh sinh hóa và so sánh bộ gen của hoạt động hòa tan phosphate vô cơ của các loài thuộc chi *Pseudomonas*. Nghiên cứu đã củng cố thêm luận điểm rằng tất cả *Pseudomonas* spp. đều được phát hiện có khả năng tạo môi trường pH thấp và hòa tan phosphate vô cơ bằng cơ chế sản sinh acid hữu cơ ngoại bào.

Như vậy, tận dụng đặc điểm sinh học của *Pseudomonas* spp những loài vi khuẩn này sẽ được nghiên cứu và áp dụng trong các hoạt động đảm bảo nguồn dinh dưỡng trong đất nói chung và thực vật nói riêng.

Khác với các loài vi khuẩn ưa mặn bắt buộc (obligate halophiles) như *Halobacterium salinarum*, vốn chỉ có thể tồn tại trong môi trường có hàm lượng muối cao ($\geq 15\%$ NaCl), chi *Pseudomonas* thường được xếp vào nhóm chịu mặn tùy nghi (facultative halotolerant). Nghĩa là, chúng có thể sinh trưởng tốt trong điều kiện không mặn nhưng cũng duy trì được sự sống và hoạt động trao đổi chất trong môi trường có nồng độ muối từ thấp đến trung bình (thường lên đến 6 – 8 % NaCl) [26]. Khả năng xuất phát từ sự kết hợp giữa nhiều đặc điểm sinh học như ổn định áp suất

thẩm thấu nội bào, thay đổi ion, điều chỉnh cấu trúc màng sinh chất và điều tiết biểu hiện gen dưới tác động của stress muối.

Các nghiên cứu gần đây cho thấy *Pseudomonas* thích nghi hiệu quả hơn so với các vi khuẩn chịu mặn khác như *Marinobacter*, *Bacillus subtilis*, hoặc *Staphylococcus aureus* khi được nuôi cấy trong điều kiện đất hoặc dung dịch mặn. Ví dụ, một nghiên cứu trên giống cây lúa cho thấy chỉ các chủng *Pseudomonas fluorescens* mới có thể ổn định mật độ khuẩn lạc vùng rễ (rhizosphere) và tăng cường sinh trưởng cây trong điều kiện muối 100 - 150 mM NaCl, trong khi *Bacillus subtilis* chỉ duy trì được hiệu quả ở mức muối thấp hơn [27].

Không chỉ chịu mặn, nhiều chủng thuộc chi *Pseudomonas* còn tham gia góp phần vào quá trình tăng trưởng của cây trồng (plant growth promotion – PGP) như tiết enzyme phosphatase, sinh tổng hợp các hormone thực vật như indole-3-acetic acid – IAA, cố định nitơ và hòa tan phosphate. Các hoạt động này không bị ức chế trong điều kiện mặn vừa khiến *Pseudomonas* trở thành một trong những ứng viên sinh học có tiềm năng ứng dụng cao trong nông nghiệp ở vùng đất bị mặn hóa [28].

Ngoài ra, cấu trúc hệ gen (genome architecture) của *Pseudomonas* cũng rất linh hoạt, thường có kích thước lớn hơn 6 Mb và chứa nhiều cụm gen chịu trách nhiệm cho khả năng phản ứng stress, điều hòa toàn cục và hệ thống vận chuyển osmoprotectant. Điều này tạo điều kiện cho *Pseudomonas* thích nghi nhanh chóng với biến động môi trường – một ưu điểm so với các vi khuẩn có bộ gen nhỏ và chức năng chuyên biệt như *Halomonas* [29].

1.3.3.1. *Pseudomonas* và khả năng thích ứng với môi trường mặn

Đối với vi sinh vật và thực vật, nồng độ muối cao gây ra hai thách thức chính: stress thẩm thấu (osmotic stress) dẫn đến mất nước tế bào và stress ion (ionic stress) do độc tính của các ion như Na^+ và Cl^- . Để tồn tại và sinh trưởng dưới những điều kiện này, các nhóm vi sinh vật chịu mặn (halotolerant) và ưa mặn (halophilic) đã tiến hóa một loạt các cơ chế thích nghi phức tạp và tinh vi. Các cơ chế này không chỉ là những phản ứng riêng lẻ mà là một mạng lưới điều hòa phối hợp, từ cấp độ phân tử đến cấu trúc tế bào, nhằm duy trì cân bằng nội môi và bảo toàn chức năng sống.

Một trong những chiến lược phổ biến nhất của vi sinh vật chịu mặn là thích nghi thẩm thấu (osmoadaptation). Khi tiếp xúc với môi trường mặn, chênh lệch áp suất thẩm thấu giữa môi trường ngoại bào và nội bào dẫn đến mất nước với mức độ nghiêm trọng. Để đối phó, tế bào vi sinh vật sẽ tích lũy các hợp chất tan tương hợp (compatible solutes) như proline, glycine betaine, trehalose và ectoine [30]. Các hợp chất này an toàn cho tế bào và có khả năng duy trì hoạt động của enzyme cũng như ổn định cấu

trúc protein và màng sinh học. Nghiên cứu của Wood (2011) đã chỉ ra rằng hầu hết các vi khuẩn chịu mặn có xu hướng ưu tiên tích lũy glycine betaine hoặc hấp thụ nó từ môi trường khi có sẵn, nhờ vào hệ thống vận chuyển chuyên biệt [31]. So với vi khuẩn thông thường các chủng halotolerant có biểu hiện mạnh mẽ hơn của các gen liên quan đến vận chuyển và tổng hợp osmoprotectant, chẳng hạn như proVWX và betABT ở *Escherichia coli* hoặc các gen tương đồng ở *Pseudomonas*.

Ngoài thích nghi thẩm thấu, vi sinh vật chịu mặn còn phát triển cơ chế điều chỉnh ion nội bào, đặc biệt là qua các bơm Na^+/H^+ antiporter, nhằm loại bỏ ion Na^+ dư thừa và giữ ổn định nồng độ ion K^+ – một ion thiết yếu cho hoạt động enzyme và duy trì pH tế bào [32]. Các hệ thống như nhaA, nhaB và nhaC ở vi khuẩn Gram âm được chứng minh có vai trò then chốt trong khả năng chịu mặn.

So với vi khuẩn không chịu mặn, các loài như *Halomonas elongata* và *Pseudomonas stutzeri* có hệ thống trao đổi ion linh hoạt hơn, giúp chúng thích nghi nhanh chóng với sự biến đổi về nồng độ muối trong môi trường. Ngoài ra, màng tế bào của vi khuẩn chịu mặn thường có hàm lượng lipid không bão hòa cao hơn, giúp duy trì tính linh động và khả năng vận chuyển hiệu quả trong điều kiện khô hạn và áp lực ion cao.

Mặc dù *Pseudomonas* không phải là nhóm vi khuẩn halophilic bắt buộc (obligate halophiles), nhưng khả năng chịu mặn của nó có thể so sánh với và thậm chí vượt trội hơn nhiều vi khuẩn chịu mặn truyền thống về mặt thích nghi linh hoạt và tiềm năng ứng dụng.

Đối với các loài thuộc chi *Halomonas* là những vi khuẩn ưa mặn trung bình đến cao (moderate to extreme halophiles), có thể sinh trưởng tốt ở nồng độ NaCl từ 10 - 25%. Tuy nhiên, chúng thường cần điều kiện nuôi cấy đặc biệt như nguồn cacbon cụ thể hoặc điều kiện pH kiềm và ít có khả năng tương tác cộng sinh với cây trồng. Ngược lại, các chủng *Pseudomonas fluorescens* và *P. putida* có thể sinh trưởng ổn định trong dải muối từ 0 – 8 % NaCl và đặc biệt hiệu quả khi sống ở vùng rễ thực vật (rhizosphere), nhờ khả năng tiết phytohormone, siderophore và enzyme phân giải sinh học.

So với *Bacillus subtilis* – một vi khuẩn Gram dương với khả năng hình thành bào tử nhằm thích ứng với điều kiện môi trường khắc nghiệt, *Pseudomonas* có khả năng duy trì các quá trình chuyển hóa liên tục trong điều kiện mặn mà không cần bước vào trạng thái nghỉ. Điều này thể hiện ở hiệu suất cố định nitơ và sinh tổng hợp hormone như IAA (indole-3-acetic acid) cao hơn ngay cả ở nồng độ muối trên 5% [32]. Hơn nữa, *Pseudomonas* còn có hệ điều hòa phiên mã phức tạp hơn, giúp điều

chính nhanh chóng các phản ứng stress mạn nhờ các yếu tố điều tiết như RpoS, GacS/GacA, điều mà nhiều vi khuẩn chịu mặn khác như *Halobacterium* không sở hữu do bộ gen đơn giản hơn [33].

Ngoài ra, trong các điều kiện đất mặn thực tế – nơi không chỉ có muối mà còn nhiều yếu tố stress như pH bất ổn, thiếu dinh dưỡng và cạnh tranh sinh học cao – *Pseudomonas* thể hiện khả năng cạnh tranh sinh thái vượt trội hơn các vi khuẩn chịu mặn cổ điển như *Halobacterium* hay *Marinobacter*. Điều này đã được minh chứng qua các thí nghiệm trồng cây lúa và lúa mì ở vùng đất nhiễm mặn, nơi chỉ các chủng *P. fluorescens* mới duy trì được mật độ ổn định ở vùng rễ và tăng sinh khối cây trồng đáng kể [34].

Như vậy, mặc dù không có ngưỡng chịu muối tối đa cao như các vi khuẩn ưa mặn bắt buộc *Pseudomonas* lại có cơ chế sinh lý, di truyền và sinh thái học toàn diện hơn, giúp chúng thích nghi tốt hơn trong điều kiện mặn đa biến của môi trường tự nhiên, từ đó nâng cao tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực nông nghiệp và công nghệ xử lý sinh học.

Ngoài ra chi vi khuẩn *Pseudomonas*, đặc biệt là các loài như *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* và *Pseudomonas aeruginosa*, thể hiện khả năng thích nghi sinh thái mạnh mẽ trong nhiều điều kiện môi trường khác nhau, bao gồm đất nghèo dinh dưỡng, khô hạn, mặn hoặc bị ô nhiễm kim loại nặng. Khả năng này góp phần làm cho *Pseudomonas* trở thành một trong những nhóm vi sinh vật có tiềm năng ứng dụng rộng rãi trong nông nghiệp, sinh học môi trường và công nghệ sinh học [35].

Một trong những đặc điểm sinh học then chốt giúp *Pseudomonas* thích nghi tốt với điều kiện khắc nghiệt là hệ gen linh hoạt và có tính đa dạng cao. Hệ gen của *Pseudomonas* chứa nhiều cụm gen mã hóa cho các protein đáp ứng stress như chaperone, protein điều hòa nhiệt sốc, enzyme phân giải các hợp chất độc hại, và hệ thống vận chuyển thích nghi (efflux pump) [36]. Nghiên cứu của Silby và cộng sự (2009) đã cho thấy hệ gen của *P. fluorescens* chứa hàng trăm gen liên quan đến cảm biến môi trường và điều hòa biểu hiện gene, giúp vi khuẩn thay đổi hành vi nhanh chóng khi điều kiện ngoại cảnh biến đổi [37].

So với nhiều loài vi khuẩn khác như *Rhizobium* hay *Azospirillum*, chi *Pseudomonas* thể hiện khả năng thích nghi và phát triển ở nhiều mức nhiệt độ và độ pH rộng hơn. Trong điều kiện khô hạn, *Pseudomonas* vẫn duy trì hoạt tính sinh học nhờ khả năng tiết ra exopolysaccharide (EPS) một dạng polysaccharide ngoại bào giúp giữ ẩm và bảo vệ tế bào khỏi áp lực thẩm thấu [38]. Ngoài ra, nhiều loài thuộc

chi *Pseudomonas* còn có khả năng phát triển trong điều kiện muối cao (tới 6 – 8 % NaCl), trong khi phần lớn vi khuẩn vùng rễ khác suy giảm mạnh hoạt tính sinh học ở mức 2 - 3 % muối [39].

Đặc biệt, khả năng kháng kim loại độc như cadmium (Cd), chì (Pb) và thủy ngân (Hg) của *Pseudomonas* nhờ sự hiện diện của các gen chịu trách nhiệm cho việc biến đổi hoặc loại bỏ độc chất. Theo Nies (1999), các chủng *Pseudomonas putida* có thể sử dụng hệ thống vận chuyển chủ động để bơm các ion kim loại ra khỏi tế bào hoặc biến đổi chúng thành dạng ít độc hơn thông qua cơ chế khử sinh học [40]. So với các vi sinh vật không chuyên hóa, *Pseudomonas* có lợi thế đáng kể trong các hệ sinh thái bị ô nhiễm công nghiệp, nơi điều kiện sinh tồn rất khắc nghiệt.

Không những vậy, *Pseudomonas* còn có thể hình thành màng sinh học (biofilm), giúp tăng cường khả năng sống sót trước các tác nhân gây bất lợi như ánh sáng UV, chất oxy hóa, hay kháng sinh. Các kết quả nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng tạo biofilm của *Pseudomonas* là một chiến lược sinh tồn quan trọng trong các môi trường khắc nghiệt, đồng thời giúp vi khuẩn duy trì khả năng tương tác với rễ cây và vi sinh vật cộng sinh [41].

1.3.3.2 Vai trò của chi vi khuẩn *Pseudomonas* trong cải tạo đất nhiễm mặn

Chi vi khuẩn *Pseudomonas*, đặc biệt là các loài như *Pseudomonas fluorescens* và *Pseudomonas putida*, được công nhận là nhóm vi sinh vật có tiềm năng sinh học cao trong nông nghiệp nhờ khả năng thúc đẩy sinh trưởng cây trồng thông qua nhiều cơ chế sinh học khác nhau. Theo các khảo sát gần đây *Pseudomonas* giúp tăng hiệu quả hấp thu dinh dưỡng, nâng cao khả năng chống chịu stress và điều hòa sinh học đối với một số mầm bệnh [42].

Một trong những cơ chế chính của *Pseudomonas* là sản sinh phytohormone như auxin (IAA), gibberellin và cytokinin – các chất kích thích tăng trưởng ở thực vật. Chẳng hạn, *P. fluorescens* có khả năng tổng hợp IAA từ tryptophan, từ đó kích thích sự phát triển hệ rễ và gia tăng diện tích tiếp xúc với đất, góp phần nâng cao khả năng hấp thu nước và chất khoáng [43]. So với các dòng vi khuẩn cố định đạm như *Rhizobium* vốn chỉ hoạt động hiệu quả trên các cây họ Đậu, *Pseudomonas* có phổ ký chủ rộng hơn phù hợp với nhiều chủng loại cây trồng bao gồm lúa, ngô, cà chua và các loại rau [44].

Ngoài ra, *Pseudomonas* còn tham gia tích cực trong quá trình hòa tan phosphate vô cơ, một dạng dưỡng chất thiết yếu nhưng ít sẵn có cho cây trồng. Cụ thể, các chủng như *P. putida* có thể sản sinh acid hữu cơ (ví dụ: gluconic acid), giúp giải phóng phosphate từ khoáng vật từ đó làm tăng hàm lượng phosphate hữu dụng trong vùng

rễ. Nghiên cứu của Glick (1995) cũng chỉ ra rằng các loài *Pseudomonas* có thể giảm stress sinh lý cho cây thông qua cơ chế phân hủy ethylene - một hormone thực vật liên quan đến stress - bằng enzyme ACC deaminase từ đó tăng năng suất và khả năng sống sót của cây trồng trong môi trường bất lợi [45].

Trong khi nhiều vi sinh vật có khả năng giúp tăng trưởng thực vật, *Pseudomonas* được đánh giá cao nhờ khả năng thích nghi môi trường linh hoạt, dễ nuôi cấy và nhiều loài không gây độc cho con người. So với chi *Bacillus* với khả năng sinh bào tử và chịu được điều kiện khắc nghiệt, *Pseudomonas* có tốc độ sinh trưởng nhanh và dễ dàng chiếm ưu thế sinh thái tại vùng rễ, giúp hình thành hệ vi sinh vật có lợi ổn định hơn [46].

1.4. Tình hình nghiên cứu về chi vi khuẩn chịu mặn *Pseudomonas* trong đất nhiễm mặn

1.4.1. Các nghiên cứu đã thực hiện về chi *Pseudomonas* trong đất nhiễm mặn và ứng dụng trong cây trồng.

Trên tình hình thực tế của nghiên cứu, các chủng vi khuẩn ứng dụng cần phải thích nghi với điều kiện đất biển đảo. Chống chịu stress muối là vấn đề tiên quyết để lựa chọn các chủng vi khuẩn. *Pseudomonas* là một chi vi khuẩn có đa dạng môi trường sống, đất, nước, thực vật, động vật,... Và một số chủng trong đó có khả năng sinh trưởng trong các điều kiện ngặt nghèo. Thực vật là một dạng sống phụ thuộc khá nhiều vào hệ vi sinh vật trong đất. Tuy nhiên chúng cũng có giới hạn về điều kiện muối trong đất, stress mặn cũng có thể làm hại tới khả năng phát triển và tăng trưởng của chúng. Các nghiên cứu về các loài thuộc chi *Pseudomonas* chịu mặn thường đi với các ứng dụng trên thực vật nhằm tăng cường khả năng chống chịu, kích thích sinh trưởng, bù đắp, duy trì dinh dưỡng trong đất cho thực vật,...

Chi *Pseudomonas* nổi bật là một trong những chi vi khuẩn có sự đa dạng sinh thái lớn, có mặt trong nhiều loại môi trường như đất, nước, thực vật và động vật [46]. Đặc biệt, nhiều loài thuộc chi *Pseudomonas* đã được ghi nhận có khả năng tồn tại và sinh trưởng mạnh mẽ dưới các điều kiện môi trường khắc nghiệt, bao gồm cả nồng độ muối cao [47].

Thực vật, với vai trò quan trọng trong chuỗi sản xuất lương thực, phụ thuộc mật thiết vào hệ vi sinh vật trong đất để hấp thu dinh dưỡng và chống chịu stress. Tuy nhiên khả năng sinh trưởng của chúng bị giới hạn nghiêm trọng bởi nồng độ muối trong đất dẫn đến stress mặn gây hại đến các quá trình sinh trưởng và phát triển [48].

Những nghiên cứu gần đây về chi *Pseudomonas* chịu mặn tập trung vào tiềm năng ứng dụng trong nông nghiệp để:

Cải thiện khả năng thích ứng với độ mặn đối với cây trồng bằng cách điều hòa áp suất thẩm thấu và giảm thiểu tác động độc hại của ion Na^+ [49].

Thúc đẩy sự phát triển của cây trồng nhờ quá trình sản xuất các hormone thực vật như auxins, gibberellins và các khoáng chất (phosphate, kali) và cố định nitơ [50].

Bù đắp và duy trì dinh dưỡng trong đất bằng cách phân giải các chất hữu cơ và làm tăng tính khả dụng của những nguyên tố dinh dưỡng thiết yếu cho cây trồng trong điều kiện môi trường bất lợi [51].

Một nghiên cứu điển hình của Manisha Phour (2020) đã minh chứng rõ ràng vai trò của *Pseudomonas* trong việc cải thiện khả năng chịu mặn của cây cải bẹ Ấn Độ (*Brassica juncea*), một loại cây lấy dầu có diện tích trồng rộng lớn tại đồng bằng phía Bắc Ấn Độ nhưng đang đối mặt với sự suy giảm năng suất do đất nhiễm mặn. Nghiên cứu này đã chứng minh được các chủng vi khuẩn vùng rễ (*Rhizobacteria*) với khả năng thúc đẩy tăng trưởng thực vật từ đó cải thiện sự phát triển trong điều kiện căng thẳng muối và sản xuất các acid hữu cơ có khả năng hòa tan các dạng khoáng khó tan của Kali và Phospho. Các nghiên cứu phân lập hứa hẹn nhất được nhận diện là *Pseudomonas argentinensis* và *P. azotoformans*. Kết quả này khác biệt so với các nghiên cứu trước đây vốn tập trung vào các chủng *Pseudomonas fluorescens* hoặc *Pseudomonas putida* trong việc phân giải phosphate, nhưng lại chưa đi sâu vào khả năng chịu mặn đồng thời sản xuất hormone thực vật. Các đặc tính sinh hóa này kỳ vọng sẽ hỗ trợ cải thiện khả năng chịu mặn cùng với sản lượng cây trồng, mở ra hướng ứng dụng mới trong canh tác trên đất nhiễm mặn.

Tương tự, ảnh hưởng tích cực của chi *Pseudomonas* đối với khả năng chống chịu mặn ở cây trồng cũng được xác nhận qua nghiên cứu đánh giá vai trò của *P. extremorientalis* trên cây Kế sữa (*Silybum marianum*), một loài cây dược liệu quan trọng. Kết quả chỉ ra rằng việc xử lý cây Kế sữa bằng *P. extremorientalis* góp phần tăng cường đáng kể sự sinh trưởng của rễ (tăng 90 %), chiều dài thân (tăng 66 %) và trọng lượng tươi (tăng 64 %) so với nhóm đối chứng. Sự tăng trưởng vượt trội này cho thấy *P. extremorientalis* có tiềm năng lớn trong việc cải thiện năng suất đồng thời nâng cao khả năng chịu đựng của cây trồng trong điều kiện stress mặn. Nghiên cứu này xác nhận rằng các chủng thuộc chi *Pseudomonas* bản địa hoặc được tuyển chọn kỹ lưỡng có thể đóng vai trò như một biện pháp sinh học nhằm hạn chế tác hại của độ mặn tới nông nghiệp.

1.4.2. Nghiên cứu tối ưu (pH, nhiệt độ, độ mặn, nguồn cacbon, nguồn nitrogen) ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của chi *Pseudomonas*

Quá trình sinh trưởng, phát triển và hoạt động sinh học của bất kỳ chủng vi khuẩn nào đều bị ảnh hưởng sâu sắc bởi các yếu tố môi trường và nguồn dinh dưỡng. Đối với *Pseudomonas* việc điều chỉnh tối ưu các yếu tố nuôi cấy như nhiệt độ, pH môi trường, cacbon và nitơ là cực kỳ quan trọng để đạt được hoạt tính sinh học tối đa, bao gồm khả năng sản sinh enzyme ngoại bào, acid hữu cơ, hoặc các chất chuyển hóa thứ cấp có lợi [52, 53]. Vì vậy, nghiên cứu chi tiết về môi trường lên men và môi trường nuôi cấy là bước quan trọng nhằm khai thác hiệu quả tiềm năng của các chủng vi khuẩn này.

Một nghiên cứu quan trọng của Mishra và cộng sự (2009) đã khảo sát chủng *Pseudomonas sp.* NARs9 (MTCC9002), được phân lập từ vùng rễ của cây rau dền, nhằm đánh giá và xác định điều kiện tối ưu cho sự phát triển cùng các hoạt động trao đổi chất của nó. Nghiên cứu này đã xác định rằng chủng này sinh trưởng tối ưu trong khoảng nhiệt độ 28 °C với pH tối ưu là 8 và đáng chú ý là có khả năng chịu đựng nồng độ muối lên đến 6 % NaCl. Điều này chứng minh khả năng sử dụng hiệu quả của chủng trong các khu vực đất nhiễm mặn vừa và cao. Ngoài ra, chủng NARs9 còn thể hiện khả năng sản xuất acid axetic indole (IAA) và hòa tan phosphate ở nhiều dải nhiệt độ khác nhau (4, 15 và 28 °C). Đặc biệt, khả năng sản xuất rhamnolipid (một loại biosurfactant) và siderophore (chất tạo phức sắt) vẫn được duy trì ở 15 °C phản ánh tính linh hoạt cùng với tiềm năng ứng dụng rộng của chủng ở nhiều môi trường khác nhau. Khi được ứng dụng để vi khuẩn hóa hạt giống lúa mì, chủng này đã làm tăng tỷ lệ nảy mầm lên 19.2 %, chiều dài thân 30 %, và chiều dài rễ 22.9 % so với nhóm đối chứng không được tiêm chủng. Kết quả này khác biệt so với các nghiên cứu trước đây tập trung chủ yếu vào sự ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đơn lẻ lên sự phát triển, mà không tích hợp khả năng chịu mặn hoặc các khả năng thúc đẩy tăng trưởng ở thực vật đa dạng như IAA và siderophore.

Đối với chủng *Pseudomonas fluorescens*, các nghiên cứu về điều kiện nuôi cấy đã tập trung vào ảnh hưởng các nguồn Cacbon và Nitrogen khác nhau với tỷ lệ C:N biến đổi, trong khi giữ nhiệt độ và pH không đổi [54]. Kết quả cho thấy, dầu oliu được xác định là nguồn cacbon tốt nhất và amoni nitrat là nguồn nitơ tối ưu cho sự sinh trưởng của chủng này cùng sự sản sinh chất hoạt động bề mặt (biosurfactant). Sự thay đổi trong nguồn cacbon và nitơ gây ảnh hưởng trực tiếp lên tốc độ sinh trưởng cũng như khả năng tổng hợp các hợp chất sinh học có giá trị của vi khuẩn. Điều này

tương đồng với các nghiên cứu về tối ưu môi trường nuôi cấy cho vi sinh vật công nghiệp, nơi nguồn cacbon và nitơ là yếu tố then chốt quyết định hiệu suất sản xuất.

Tóm lại, tối ưu hóa điều kiện môi trường và nguồn dinh dưỡng đặc trưng là yếu tố thiết yếu để tận dụng tối đa tiềm năng sinh trưởng và hoạt tính sinh học của đối với chi *Pseudomonas*. Điều này không chỉ giúp nâng cao hiệu quả trong quá trình lên men và trong quá trình nuôi cấy mà còn là cơ sở vững chắc để phát triển các ứng dụng sinh học hiệu quả trong nông nghiệp bền vững, đặc biệt là trên các vùng đất nhiễm mặn đang ngày càng mở rộng.

Có thể thấy, chi vi khuẩn *Pseudomonas* chịu mặn sở hữu tiềm năng ứng dụng to lớn trong việc phân giải phosphate khó tan trong đất, đóng góp vai trò trực tiếp trong việc nâng cao năng suất cây trồng [55]. Tuy nhiên, tại Việt Nam, dù tiềm năng là rất lớn, vẫn còn một khoảng trống nghiên cứu đáng kể. Hiện tại, chưa nhiều nghiên cứu chi tiết về các chủng vi khuẩn với khả năng chịu mặn và phân giải phosphate trên nền đất cát nhiễm mặn đặc trưng của các vùng ven biển. Phần lớn các công trình nghiên cứu trước đây chủ yếu tập trung vào các phương pháp cải tạo đất tổng thể, trong khi việc đánh giá chính xác tiềm năng chuyển hóa phosphate của các chủng vi khuẩn này trong môi trường đất còn nhiều hạn chế chưa khai thác được triệt để [56].

Do đó, việc nghiên cứu và đánh giá một cách chính xác khả năng chuyển hóa của chủng vi khuẩn này trong điều kiện thực tế là vô cùng cần thiết. Chính từ những cơ sở phân tích trên, chúng tôi thực hiện nghiên cứu **“Nghiên cứu tối ưu điều kiện lên men thu sinh khối và đánh giá khả năng chuyển hóa phosphate của chủng vi khuẩn chịu mặn *Pseudomonas* sp. TSD-B5.7 trong đất cát nhiễm mặn”** nhằm lấp đầy khoảng trống này, cung cấp cơ sở khoa học cho việc phát triển các giải pháp sinh học bền vững trong nông nghiệp tại Việt Nam.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Đối tượng

Chủng vi khuẩn TSD-B5.7 chịu mặn phân giải phosphate cao được lưu giữ tại Phòng Sinh hóa – Phân viện CNSH – Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga. Về nguồn gốc và đặc điểm hình thái được nêu tại mục 3.1.1.

2.1.2. Hóa chất, dụng cụ, thiết bị

Hóa chất

Trong nghiên cứu này, một số hóa chất chính được sử dụng bao gồm: KH_2PO_4 (Merck, Đức), Na_2HPO_4 (Merck, Đức), cao thịt (Merck, Đức), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Đức), Peptone (Trung Quốc), Glucose (Trung Quốc), NaCl (Trung Quốc), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Trung Quốc), Agar (Việt Nam). Ngoài ra, các hóa chất thí nghiệm khác có độ tinh khiết phù hợp được cung cấp từ nhiều hãng uy tín trong và ngoài nước.

Hóa chất khác và thuốc thử

Axit sulfuric (H_2SO_4), axit phosphoric (H_3PO_4), axit nitric (HNO_3), axit flohydric (HF), axit clohidric (HCl), axit pecloric (HClO_4), natri hydroxide (NaOH), amonia (NH_4OH), natri cacbonat (Na_2CO_3), kali dicromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), kali sunfat (K_2SO_4), đồng sunfat ngậm nước ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, FeSO_4 , $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{BaN}_2\text{O}_6\text{S}_2$, $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N}$, methylene blue, 2,4-dinitrophenol, kali antimon tetrat, amoni molibdat, axit ascorbic.

Dụng cụ

Các dụng cụ thí nghiệm sử dụng trong nghiên cứu gồm: đĩa Petri nhựa (Biologix, Mỹ), micropipette và đầu tip (Đức), bình tam giác loại 100 ml, 500 ml và 1000 ml (Đức), bình Duran (Đức), ống Falcon 15 ml và 50 ml (Biologix, Mỹ), ống Eppendorf 1,5 ml và 2 ml (Biologix, Mỹ), que cấy vi sinh, các loại đĩa thủy tinh,...

Vật tư nông nghiệp và giống cây trồng

Cải bẹ mào gà Phú Nông 711, mồng tơi lá to Phú Nông, phân đạm Phú Mỹ, kali Phú Mỹ, lân Lâm Thao, vi lượng Yzuka, humic Hợp Phát.

2.1.3. Thiết bị, máy móc

Bảng 2.1. Dụng cụ và thiết bị được sử dụng

STT	Tên thiết bị / dụng cụ	Hãng sản xuất/ Xuất xứ
1	Box cấy vi sinh vật Clean Bench TCV 02-1	Việt Nam
2	Box cấy vi sinh vật Laminar LB	Việt Nam
3	Cân phân tích 4 số lẻ	Sartorius (Đức)
4	Cân kỹ thuật	Ohaus (Mỹ)
5	Máy lắc rung Provocell™	Hitachi (Nhật Bản)
6	Máy lắc ồn nhiệt	IKA (Đức)
7	Máy lắc tròn	Đức
8	Máy ly tâm lạnh to CF16RXII	Đức
9	Máy ly tâm	Eppendorf (Đức)
10	Máy nuôi lắc Centomat® HK	Đức
11	Máy quang phổ UV2500	Mỹ
12	Máy trộn Vortex / Voltex OSI	Mỹ
13	Máy khuấy từ, con lắc từ	Velp Inc. (Hoa Kỳ)
14	Nồi hấp khử trùng	Sanyo (Nhật Bản)
15	Hệ thống thiết bị lên men 10 lít	Hàn Quốc
16	Tủ lạnh 4°C	Italia
17	Tủ lạnh -25°C MDF-192	Sanyo (Nhật Bản)
18	Tủ ẩm / Tủ sấy	Nhật Bản
19	Lò vi sóng	Panasonic (Nhật Bản)
20	Máy đo pH 7110	WTW (Anh)
21	Kính hiển vi quang học	Olympus (Mỹ)
22	Cốc thủy tinh 1000 mL, 500 mL, 200 mL, 100 mL	Trung Quốc
23	Ống đong 1000 mL, 500 mL, 250 mL, 50 mL	Trung Quốc
24	Đũa thủy tinh, thìa cân, giấy cân...	Việt Nam

2.1.4. Môi trường nuôi cấy

Môi trường Pikovskaya's cải tiến (PK) (g/l): Glucose - 10; cao nấm men – 0,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - 5; KCl - 0,2; $\text{MgCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 5, NaCl – 10.

Môi trường PVK (g/l): thành phần tương tự môi trường PK cải tiến có bổ sung 20 g/l agar.

Các môi trường được khử trùng ở nhiệt độ 121°C và áp suất 1 atm trong 20 phút trước khi sử dụng.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp lựa chọn môi trường và tối ưu điều kiện lên men

Để lựa chọn môi trường phù hợp và tối ưu điều kiện lên men của chủng vi khuẩn *Pseudomonas putida* TSD-B5.7 chịu mặn phân giải phosphate như sau :

2.2.1.1. Ảnh hưởng của nguồn cacbon

Sử dụng môi trường lựa chọn sau khảo sát của từng chủng để thay thế và bổ sung nguồn cacbon: glucose, fructose, saccharose, lactose, galactose. Các chủng được nuôi cấy trong bình tam giác 100 ml, mỗi bình chứa 30 ml môi trường có thành phần khảo sát. Sau đó nuôi lắc ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ, 180 vòng/phút.

Lựa chọn nguồn cacbon cho cho mật độ tế bào cao nhất cho nghiên cứu tiếp.

Chỉ tiêu theo dõi: mật độ tế bào chủng nghiên cứu (CFU/ml).

- Ảnh hưởng của nồng độ cacbon lựa chọn:

Nguồn cacbon đã lựa chọn sẽ được bổ sung vào các bình nuôi cấy chứa 30 mL môi trường với nồng độ từ 1 % – 3,5 %, bước nhảy là 0,5 %. Sau đó nuôi lắc ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ, 180 vòng/phút.

Lựa chọn nồng độ cacbon bổ sung cho cho mật độ tế bào cao nhất cho nghiên cứu tiếp.

Chỉ tiêu theo dõi: mật độ tế bào chủng nghiên cứu (CFU/ml).

2.2.1.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ

Sử dụng môi trường lựa chọn sau khảo sát của từng chủng 0,5% nguồn nitơ gồm: cao nấm men, pepton, cao malt, NaNO_3 , casein và đối chứng là môi trường lựa chọn. Các chủng được nuôi cấy trong bình tam giác 100 ml, mỗi bình chứa 30 ml môi trường có thành phần khảo sát. Sau đó nuôi lắc ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ, 180 vòng/phút.

Lựa chọn nguồn nitơ cho mật độ tế bào cao nhất cho nghiên cứu tiếp.

Chỉ tiêu theo dõi: mật độ tế bào chủng nghiên cứu (CFU/ml).

- Ảnh hưởng của nồng độ nitơ lựa chọn:

Nguồn nitơ đã lựa chọn sẽ được bổ sung vào các bình nuôi cấy chứa 30 mL môi trường với nồng độ từ 1 % – 3,5 %, bước nhảy là 0,5 %. Sau đó nuôi lắc ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ, 180 vòng/phút, tỷ lệ tiếp giống 10 %.

Lựa chọn nồng độ nitơ bổ sung cho mật độ tế bào cao nhất cho nghiên cứu tiếp.

Chỉ tiêu theo dõi: mật độ tế bào chủng nghiên cứu (CFU/ml).

2.2.1.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy

Việc nuôi cấy chủng vi khuẩn được tiến hành trong bình tam giác 1000 ml chứa 330 ml môi trường lựa chọn ở điều kiện lắc 180 vòng/phút, thời gian 48 giờ, pH ban đầu 7, tỷ lệ tiếp giống 10 %. Môi trường nuôi cấy được bổ sung thêm các nguồn cacbon, nitơ cùng với muối khoáng phù hợp. Dải nhiệt độ khảo sát từ 25 °C – 40 °C, bước nhảy là 5 °C.

Lựa chọn nhiệt độ cho mật độ tế bào cao nhất cho nghiên cứu tiếp.

Chỉ tiêu theo dõi: mật độ tế bào chủng nghiên cứu (CFU/ml).

2.2.1.4. Ảnh hưởng pH ban đầu

Nuôi cấy chủng vi khuẩn trong bình tam giác dung tích 1000 ml có chứa 330 ml môi trường lựa chọn được bổ sung các nguồn cacbon, nitơ và muối thích hợp ở điều kiện lắc 180 vòng/phút, thời gian 48 giờ, tỷ lệ tiếp giống 10 % và nhiệt độ đã xác định. Giá trị pH được khảo sát trong khoảng 5 đến 8 với mức thay đổi 0,5 đơn vị.

Lựa chọn pH ban đầu cho mật độ tế bào cao nhất cho nghiên cứu tiếp.

Chỉ tiêu theo dõi: mật độ tế bào chủng nghiên cứu (CFU/ml).

2.2.1.5. Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Nuôi cấy chủng vi khuẩn trong bình tam giác dung tích 1000 ml, mỗi bình chứa 330 ml môi trường lựa chọn được bổ sung các nguồn cacbon, nitơ và muối thích hợp trong thời gian 48 giờ, tỷ lệ tiếp giống 10 %, nhiệt độ và pH đã xác định. Khảo sát với các tốc độ lắc lần lượt là 100, 150, 200, 250 vòng/phút.

Lựa chọn tốc độ lắc cho mật độ tế bào cao nhất cho nghiên cứu tiếp.

Chỉ tiêu theo dõi: mật độ tế bào chủng nghiên cứu (CFU/ml).

2.2.1.6. Ảnh hưởng tỉ lệ tiếp giống

Nuôi cấy chủng vi khuẩn trong bình tam giác dung tích 1000 ml, mỗi bình chứa 330 ml môi trường lựa chọn được bổ sung các nguồn cacbon, nitơ và muối thích hợp trong thời gian 48 giờ, nhiệt độ và pH, tốc độ lắc đã xác định. Các tỷ lệ tiếp giống được khảo sát bao gồm 1 %, 3 %, 5 %, 7 % và 10 %.

Lựa chọn tốc độ lắc cho mật độ tế bào cao nhất cho nghiên cứu tiếp.

Chỉ tiêu theo dõi: mật độ tế bào chủng nghiên cứu (CFU/ml).

2.2.1.7. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong bình tam giác dung tích 1000 ml chứa, mỗi bình chứa 330 ml môi trường lựa chọn được bổ sung các nguồn cacbon, nitơ và muối thích hợp trong điều kiện nhiệt độ và pH, tốc độ lắc và tỷ lệ tiếp giống đã xác định. Tiến hành lấy mẫu theo giờ (0; 6; 12; 18; 24; 30; 36; 42; 48; 54; 60 giờ) để xác định mật độ tế bào tại thời điểm lấy mẫu.

Lựa chọn thời gian nuôi cấy tại thời điểm cho mật độ tế bào cao nhất .

Chỉ tiêu theo dõi: mật độ tế bào chủng nghiên cứu (CFU/ml).

2.2.1.8. Tối ưu môi trường và điều kiện nuôi cấy đối với chủng vi khuẩn TSD-B5.7 theo phương pháp Box - Behnken

Sau khi lựa chọn được 3 yếu tố có tác động nhất tới khả năng nhân sinh khối của chủng TSD-B5.7, tiến hành thiết kế thí nghiệm tối ưu môi trường Box - Behnken thuộc Phương pháp đáp ứng bề mặt (RMS - Response Surface Methodology) [57].

Tiếp tục lựa chọn các giá trị tối ưu về lượng cho các yếu tố này, nghiên cứu sử dụng thiết kế tối ưu Box - Behnken 3 yếu tố với 17 thí nghiệm trong đó có 5 thí nghiệm trọng tâm lặp lại. Thiết kế Box-Behnken với 3 yếu tố, 5 thí nghiệm lặp lại tại điểm trung tâm và 3 mức khác nhau (cao "+1", trung bình "0" và thấp "-1") đã được sử dụng. Thiết kế Phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) tạo ra 17 thí nghiệm, như thể hiện trong Bảng 2.2. Mỗi quan hệ giữa các thành phần được biểu diễn bằng mô hình đa thức bậc hai:

$$Y = a + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1.X_2 + a_{23}X_2.X_3 + a_{13}X_1.X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2$$

Trong đó Y là giá trị dự đoán (Mật độ tế bào, OD₆₀₀), a là giá trị cắt, X₁– X₃ là giá trị của các thành phần môi trường thử nghiệm, a₁–a₃ là các hệ số tuyến tính, a₁₂–a₁₃ là các hệ số tương tác giữa các thành phần và a₁₁–a₃₃ là các hệ số bậc hai. Phân tích ANOVA và các giá trị hồi quy được thực hiện bằng phần mềm Design-Expert 13. Ý nghĩa của mô hình thực nghiệm và phương trình đa thức được xác nhận bằng cách xác định hệ số R² và ý nghĩa thống kê được đánh giá dựa trên giá trị p <0.05.

Mô hình của thí nghiệm đánh giá được thiết kế như trong bảng 2.2 sau:

Bảng 2.2. Ma trận thực nghiệm Box-Benhken ba yếu tố và mật độ tế bào chủng TSD-B5.7

Thí nghiệm	X1	X2	X3
1	-1	-1	0
2	-1	1	0
3	0	0	0
4	-1	0	-1
5	0	-1	-1
6	-1	0	1
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	-1	1
10	0	0	0
11	1	1	0
12	0	1	1
13	1	-1	0
14	1	0	-1
15	0	0	0
16	0	1	-1
17	1	-1	1

2.2.2. Xây dựng quy trình lên men thu nhận sinh khối

Đền xây dựng và hoàn thiện quy trình lên men thu nhận sinh khối chủng vi khuẩn chịu mặn phân giải phosphate, quy mô 7 lít/mẻ tiến hành các nghiên cứu:

Đường chuẩn giữa giá trị mật độ quang OD_{600} và mật độ tế bào trong dịch huyền phù được thiết lập dựa trên phương pháp của Van Alst và cộng sự.

Tiến hành nuôi cấy chủng vi khuẩn TSD-B5.7 trên môi trường lỏng phù hợp để tiến hành đo OD_{600} . Mật độ tế bào (CFU/mL) ứng với các thời điểm thu mẫu được xác định sử dụng phương pháp đếm khuẩn lạc.

Mẫu cần kiểm tra mật độ được lắc đều, sau đó dùng pipet vô trùng lấy 1 ml dịch vi sinh cho vào ống nghiệm chứa 9 ml dung dịch muối sinh lý vô trùng (NaCl 0,85%) và trộn đều.

Tiếp theo, hút 1 ml dung dịch từ ống nghiệm này chuyển sang ống nghiệm khác cũng chứa 9 ml dung dịch muối sinh lý vô trùng.

Từ dung dịch pha loãng thích hợp, lấy 0,1 ml cho vào đĩa Petri có chứa môi trường thạch tương ứng. Ở mỗi độ pha loãng, tiến hành cấy ít nhất 3 đĩa để tăng độ tin cậy khi đếm khuẩn lạc. Mẫu được trải đều trên bề mặt thạch bằng que gạt vô trùng.

Sau đó ủ ở điều kiện nhiệt độ thích hợp trong khoảng 24 – 72 giờ.

Sau thời gian nuôi cấy, tiến hành đếm số khuẩn lạc vi khuẩn TSD-B5.7 trên mỗi đĩa và tính toán mật độ tế bào theo công thức:

- Công thức tính mật độ VSV:

$$A \text{ (CFU/mL)} = \frac{N}{n_1 V_{f1} + \dots + n_i V_{fi}}$$

Trong đó: A: mật độ tế bào (đơn vị hình thành khuẩn lạc trong 1 mL dịch giống; N: là tổng khuẩn lạc đếm được trên các đĩa; n_i : là số lượng đĩa cấy tại độ pha loãng thứ i ; f_i : là độ pha loãng; V: thể tích dịch mẫu (mL) cấy vào trong mỗi đĩa).

Việc đếm số khuẩn lạc được tiến hành tại các mức pha loãng khác nhau với ít nhất 3 đĩa lặp lại cho mỗi nồng độ nhằm đảm bảo độ chính xác.

Dựng đường cong sinh trưởng dựa trên giá trị OD600 và CFU/mL (phụ lục 1.3).

Nghiên cứu quá trình lên men thu hồi sinh khối

Phương pháp hoạt hoá chủng giống: Các chủng giống được bảo quản trong glycerol 38% ở điều kiện - 80° C. Trước khi sử dụng, giống được nuôi cấy hoạt hoá trên môi trường LB (vi khuẩn), ở điều kiện thích hợp. Chủng giống đạt yêu cầu để đưa vào nhân giống có hình thái tế bào, khuẩn lạc và đặc tính đặc trưng theo mô tả.

Phương pháp nhân giống, lên men:

Phương pháp nhân giống cấp 1: Nhân giống trong bình tam giác 300 mL có chứa 100 mL môi trường trong máy lắc ổn nhiệt ở nhiệt độ, thời gian thích hợp.

Phương pháp nhân giống cấp 2: Chủng sau nhân giống cấp 1 được chuyển với tỷ lệ 5% vào bình tam giác dung tích 1000 mL, bên trong có 330 mL môi trường nuôi cấy sau đó lắc ổn nhiệt ở nhiệt độ, thời gian thích hợp.

Các chủng vi khuẩn sau khi được nhân giống cấp 2 được bổ sung 5 % giống vào thiết bị lên men 10 lít chứa môi trường và các điều kiện lên men lựa chọn.

Nghiên cứu, điều chỉnh để xây dựng quy trình lên men thử nghiệm quy mô 7 L/mẻ dựa vào các thông số thích hợp bao gồm:

Nghiên cứu tác động của điều kiện cấp khí đến quá trình nuôi cấy chủng vi khuẩn TSD-B5.7 sử dụng thiết bị lên men 10 lít có khả năng điều chỉnh lượng khí sục vào với mức 3, 5, 7,5 lít không khí/lít môi trường/phút. Mật độ tế bào thu được ở các mức cấp khí khác nhau được sử dụng làm cơ sở để xác định điều kiện cấp khí tối ưu cho chủng.

Khảo sát thời gian lên men thu sinh khối: nuôi cấy chủng vi khuẩn TSD-B5.7 trên môi trường thích hợp đã lựa chọn. Khảo sát thời gian lên men ở 24, 48, 72 giờ.

Khảo sát tỷ lệ tiếp giống : nuôi cấy lần lượt chủng vi khuẩn TSD-B5.7 trên thiết bị lên men 10 L. Khảo sát tỷ lệ tiếp giống 5 %; 7 %; 10 % với thời gian lên men phù hợp.

2.2.3. Phương pháp xác định khả năng chuyển hóa Phosphate

Để khảo sát được khả năng chuyển hóa phosphate tiến hành nuôi cấy chủng vi khuẩn trên môi trường NBrip lỏng (g/l): glucose 10, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25, KCl 0,2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 và pH 7,0 có bổ sung NaCl ở các nồng độ (0, 1, 2, 3, 5, 7, 10%) ở 30°C, 4 ngày, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Xác định mật độ tế bào và lượng PO_4^{3-} giải phóng vào môi trường sử dụng phương pháp xanh molybden [58].

Để đánh giá được lượng phosphate tổng số và phosphate hữu hiệu do vi sinh vật phân giải được, trong nghiên cứu này các kỹ thuật phân tích đã được áp dụng như:

Phương pháp xác định phosphate tổng số trong dung dịch

Tiến hành theo TCVN 8940:2011 hoặc tương đương.

Phân tích hàm lượng phosphate tổng số trong đất [59, 60]

Mẫu đất được phá hủy bằng hỗn hợp axit sulfuric và axit pecloric nhằm hòa tan các hợp chất chứa phosphate. Hàm lượng phosphate được xác định theo phương pháp so màu xanh molybden, trong đó dưới điều kiện axit, các dạng phosphate vô cơ bị chuyển hóa thành dạng octophosphate, rồi kết hợp với amoni molybdat để tạo thành phức chất màu xanh. Cường độ màu thu được được đo tại bước sóng 720 nm. Đường chuẩn được trình bày tại phụ lục 2.1.

Phương pháp xác định lượng phosphate hữu hiệu trong đất (TCVN 8661 :2011)

Được tiến hành dựa trên nguyên tắc chiết tách các hợp chất phosphate trong đất bằng dung dịch NaHCO_3 0,5 M có pH 8,5, với tỷ lệ phối trộn đất và dung dịch

chiết là 1:20, sau đó lắc trong vòng 30 phút. Dung dịch natri hidrocacbonat ở pH kiềm này có khả năng hòa tan chủ yếu các dạng FePO_4 , AlPO_4 và một phần nhỏ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Lượng phosphate có mặt trong dịch chiết được xác định bằng phương pháp so màu xanh molybdat, đo mật độ quang ở bước sóng 882 nm bằng quang phổ kế. Đường chuẩn được trình bày tại phụ lục 2.2.

2.2.4 Phương pháp đánh giá hiệu quả chuyển hóa phosphate trong đất

Để đánh giá được hiệu quả chuyển hóa phosphate vô cơ thành phosphate hữu hiệu trên đất cát sau hô sẽ được bố trí theo thí nghiệm sau:

* Thí nghiệm đánh giá sự biến đổi hàm lượng phosphate trong đất trồng cây.

Đối tượng: Giống rau được sử dụng là giống rau mồng tơi lá to Phú Nông.

Chuẩn bị vật liệu: Đất cát sau cải tạo với thành phần bentonite (3%), Giá thể (10%) với thông số ban đầu như sau: Trữ ẩm tối đa: > 26 %, pH=6,0 – 8,0, Hàm lượng cacbon hữu cơ (OC): 1,0-2,85%, N tổng số: 0,095 - 0,270 %, Lân tổng số (P_2O_5) : 0,70-0,75%, Kali tổng số (K_2O): 0,05 - 2,35 %, Chế phẩm vi khuẩn phân giải phosphate chịu mặn.

Đối với chủng vi khuẩn phân giải phosphate, dịch nuôi được pha loãng và hiệu chỉnh về mật độ 10^3 , 10^6 và 10^9 (CFU/mL) bằng nước khử khoáng đã tiệt trùng.

Được trồng trên nền đất cát sau phối trộn được tiến hành thanh trùng trước khi sử dụng. Mỗi chậu thí nghiệm chứa 1 kg đất tương ứng với một công thức thí nghiệm riêng. Thí nghiệm được lặp lại ba lần, mỗi lần sử dụng một chậu độc lập. Mẫu đất từ các chậu thí nghiệm và đối chứng được thu thập theo các mốc thời gian: trước khi trồng cây, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần và 5 tuần sau khi trồng. Các mẫu này sau đó được phân tích để xác định hàm lượng phospho tổng số và phospho dễ tiêu trong đất. Thiết kế thí nghiệm dựa theo bảng 2.3:

Bảng 2.3. Ảnh hưởng vi khuẩn phân giải Phosphate

Công thức	Khối lượng đất (1 kg)	Lượng $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (g)	Mật độ vi khuẩn phân giải phosphate bổ sung (CFU/mL)
Đối chứng âm (CSH)	1	0	0
Đối chứng dương (Đất phù sa)	1	5	0
Cát san hô	1	5	10^3
Cát san hô	1	5	10^6
Cát san hô	1	5	10^9
Cát san hô sau cải tạo	1	5	10^3
Cát san hô sau cải tạo	1	5	10^6
Cát san hô sau cải tạo	1	5	10^9

2.2.5. Đánh giá khả năng nảy mầm của hạt**2.2.5.1. Vật liệu thí nghiệm**

- Dịch nuôi cấy Chủng vi khuẩn phân giải phosphate TSD-B5.7
- Đất trồng trước và sau canh tác các vụ
- Đất cát san hô

2.2.5.2. Chuẩn bị vật liệu

Chủng vi khuẩn được nuôi tăng sinh riêng lẻ trong bình tam giác dung tích 100 mL, mỗi bình chứa 30 mL môi trường TSB (Tryptone Soya Broth) trong vòng ba ngày. Thành phần môi trường TSB cho 1 L dung dịch bao gồm 30 g TSB hòa trong 1 L nước cất. Sinh khối vi khuẩn được thu hồi bằng cách chuyển dịch nuôi cấy vào ống Falcon 50 mL và ly tâm ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong 5 phút. Sau khi ly tâm, phần dịch nổi được loại bỏ, giữ lại phần tế bào để sử dụng cho các bước tiếp theo. Sau đó, dịch huyền phù được hiệu chỉnh về các mật độ 10^3 , 10^6 , 10^9 , 10^6 và 10^9 (CFU/mL) bằng nước cất tiệt trùng.

2.2.5.3. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm tiến hành bằng cách ngâm 30 hạt rau cải trong 30 mL dung dịch huyền phù chứa chủng vi khuẩn TSD-B5.7 riêng biệt, huyền phù đất đã cải tạo từ các vụ trước và sau canh tác trong thời gian 4 giờ. Sau đó, các hạt được chuyển vào đĩa Petri chứa giấy lọc đã tiệt trùng, làm ướt bằng nước khử khoáng tiệt trùng, và bảo quản trong điều kiện tối của phòng thí nghiệm. Mỗi nghiệm thức được lặp lại ba lần, với mỗi lần lặp ứng với một đĩa Petri chứa 30 hạt rau cải ở cùng nồng độ vi khuẩn. Đối chứng được thực hiện tương tự, nhưng hạt rau cải chỉ ngâm trong huyền phù cát san hô tiệt trùng, không chứa vi khuẩn. Số hạt nảy mầm được quan sát và ghi nhận liên tục trong 6 ngày.

Bảng 2.4. Kí hiệu mẫu thí nghiệm

Kí hiệu	Tên mẫu
M1	Cát san hô
M2	ĐC (Đất phù sa)
M3	Đất trước canh tác
M4	Đất sau canh tác
M5	Chủng phân giải phosphate

2.2.6. Đánh giá được sự phát triển của một số loài rau xanh bổ sung chế phẩm vi khuẩn phân giải Phosphate so với khi sử dụng các chế phẩm khác sẽ được tiến hành theo các thử nghiệm:

* Thử nghiệm hiệu quả độc lập của chế phẩm đối với cây trồng.

+ Địa điểm thử nghiệm : Thử nghiệm trồng rau được thực hiện tại Nhà màng trồng rau, Trạm nghiên cứu thử nghiệm biển (Đầm Báy, Hòn Tre) Chi nhánh Ven biển/Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga, Nha Trang, Khánh Hòa.

+ Tạo các luống đất kích thước: Dài $\times$ rộng: 2 m $\times$ 1 m đều nhau, giữa các luống cách nhau 17 cm được lát gạch cao 0,3 m có hệ thống lỗ thoát nước;

+ Dùng vải địa kỹ thuật tiến hành lót dưới các luống vừa được tạo nhằm hạn chế xói mòn, rửa trôi và điều chỉnh khả năng thoát nước của luống.

+ Chuẩn bị vật liệu: Đất cát sau cải tạo với thành phần bentonite (3 %), Giá thể (10 %) với thông số ban đầu như sau: Trữ ẩm tối đa: > 26 %, pH= 6,0 - 8,0, Hàm lượng cacbon hữu cơ (OC): 1,0 - 2,9 %, N tổng số: 0,1 - 0,3 %, Lân tổng số (P_2O_5) : 0,7 - 0,8 %, Kali tổng số (K_2O): 0,1 - 2,4 %, Chế phẩm vi khuẩn phân giải phosphate chịu mặn.

+ Đối tượng thử nghiệm: Giống rau được sử dụng là giống Cải bẹ Hồng Kông F1 chịu nhiệt của công ty rau Việt Á và mỏng tơ lá to Phú Nông.

+ Bố trí các nghiệm thức (bảng 2.5): Các nghiệm thức được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên và thực hiện với ba lần lặp lại cho mỗi nghiệm thức. Các biện pháp kỹ thuật trồng và chăm sóc giữa các công thức là như nhau.

+ Trong đó giá thể dự kiến có thành phần như sau: Bã bunn mía: Trấu hun: Phân bò ủ hoai với tỷ lệ 40 : 30 : 30.

* So sánh với hiệu quả khi sử dụng bộ chế phẩm do đề tài “**Nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học để cải tạo cát san hô thành đất canh tác bằng màng sinh học Polysaccharide, vật liệu kết dính bentonite và vi sinh vật hữu ích**”.

- Chế phẩm vi sinh vật hữu ích chịu mặn NPC đảm bảo TCCS chất lượng: Mật độ vi sinh vật hữu ích (vi khuẩn cố định đạm, vi khuẩn phân giải phosphate khó tan và vi khuẩn phân giải cellulose) $\geq 1,0 \times 10^7$ CFU/g, Độ ẩm ≤ 15 %.

- Chế phẩm vi sinh vật sinh màng nhầy polysaccharide chịu mặn BTS đảm bảo TCCS chất lượng: Mật độ vi sinh vật sinh màng nhầy $\geq 1,0 \times 10^7$ CFU/g, Mật độ nấm men $\geq 1,0 \times 10^7$ CFU/g, Độ ẩm ≤ 15 %

- Giống rau được sử dụng: Cải bẹ mào gà Phú Nông 711, mỏng tơ lá to Phú Nông.

Chuẩn bị đất trồng thử nghiệm:

Đất cải tạo trồng thử nghiệm được sử dụng theo công thức như sau: Cát san hô : bentonite (97:3) + 0,25 % Chế phẩm vi sinh vật sinh màng polysaccharide BTS chịu mặn + 0,25 % Chế phẩm vi sinh vật hữu ích chịu mặn NPC + 10% giá thể.

- Các bước chuẩn bị đất tiến hành tương tự như đối với mục thử nghiệm hiệu quả độc lập chế phẩm vi sinh vật phân giải Phosphate.

- Đối chứng âm cát san hô: Cát san hô Trường Sa, không lẫn các loại rác thải, xác động vật và các thành phần tạp chất khác, đã được nghiền, sàng nhỏ để trồng cây.

- Đối chứng dương đất phù sa: Sử dụng đất canh tác lấy tại Trạm nghiên cứu thử nghiệm biển Đầm Báy được làm sạch cỏ, đánh tơi.

Bảng 2.5. Ảnh hưởng của chế phẩm vi khuẩn phân giải Phosphate tới cây trồng

Thành phần (%)	CT1	ĐC1	ĐC2
Cát san hô	97	Cát san hô	Đất đầm báy
Bentonite	3		
Chế phẩm vi khuẩn chịu mặn phân giải phosphate	0,5		
Giá thể phối trộn	10		

Phương pháp chăm sóc:

- Tưới nước: Sau khi gieo hạt rau cần phải tưới ngay để giữ ẩm độ phù hợp giúp hạt giống rau nảy mầm tốt. Định kỳ tưới nước 2 lần/ngày (buổi sáng và buổi chiều). Vào những ngày có mưa, lượng nước tưới cho luống rau được điều chỉnh linh hoạt dựa trên độ ẩm thực tế của đất. Nếu ẩm độ cao trên 60 % (bóp đất thấy nước chảy qua kẽ tay), không tưới nước để tránh làm ảnh hưởng đến bộ rễ của rau. Rau cần giữ ẩm thường xuyên, độ ẩm thích hợp là 60 % thì cho năng suất cao và chất lượng tốt.

- Thường xuyên kiểm tra, nhổ cỏ và loại bỏ cây rau nhiễm bệnh để hạn chế lây lan và giảm sử dụng thuốc bảo vệ thực vật.

* Thu hoạch rau:

Rau được thu hoạch sau thời gian tưới nước buổi sáng khoảng 30 phút.

Rau được thu hoạch theo 3 đợt.

Đợt 1: tính từ khi gieo hạt đến khi cắt thu hoạch rau đợt 1 (26 ngày sau gieo).

Đợt 2: tính từ sau khi thu hoạch lần 1 đến trước khi thu hoạch lần 2 (20 ngày).

Đợt 3: tính từ sau khi thu hoạch lần 2 đến trước khi thu hoạch rau lần 3 (20 ngày)

* Các chỉ tiêu theo dõi cây rau:

Tại mỗi công thức theo dõi cố định 15 cây ghi nhận các chỉ tiêu sinh trưởng gồm số lá, chiều rộng lá, chiều cao cây và năng suất khi thu hoạch. Các chỉ tiêu này được đo định kỳ mỗi 7 ngày bắt đầu từ ngày thứ 7 sau khi gieo hạt và tiếp tục đến thời điểm thu hoạch thể:

- Chiều cao cây: đo bằng thước nhựa dài 50 cm, xác định chiều cao cây bằng cách đo từ mặt đất lên đến đỉnh sinh trưởng;

- Các yếu tố tạo thành năng suất:

+ Khối lượng trung bình trên cây (g/cây): chọn ngẫu nhiên 10 cây trong mỗi ô thí nghiệm, nhổ cả rễ, giữ sạch đất nhưng giữ nguyên phần gốc và lá già, sau đó tiến hành cân.

$$+ \text{ Năng suất lý thuyết (tấn/ha)} = \frac{\text{Trọng lượng trung bình}}{\text{Cây}} \times \frac{\text{Mật độ cây}}{\text{Diện tích (ha)}}$$

+ Đánh giá năng suất và chất lượng của từng công thức thông qua các chỉ tiêu:

Khối lượng cây (g): nhổ cả rễ, rũ bỏ đất, giữ nguyên cả gốc và lá già đem cân.

Năng suất cá thể (g): loại bỏ rễ lá già, lá không ăn được rồi đem cân.

Việc thu thập mẫu đất tại các nghiệm thức và đối chứng được tiến hành ở các mốc thời gian ngày 0 và sau 30 - 40 ngày, để phục vụ phân tích hàm lượng lân tổng số và lân dễ tiêu.

2.2.7. Xử lý thống kê số liệu

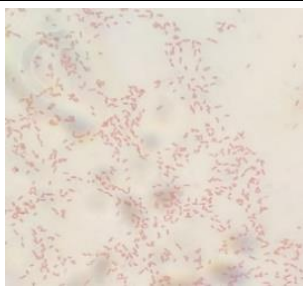
Dữ liệu thu được từ thí nghiệm sau khi khảo sát các điều kiện nuôi cấy phù hợp với chủng vi khuẩn được tuyển chọn được xử lý và phân tích dựa trên phương pháp ANOVA. Kết quả được phân tích theo kiểm định Friedman. Các giá trị trung bình được xử lý thống kê bằng phép so sánh Tukey ở mức ý nghĩa 0,05 tương ứng với độ tin cậy 95%.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu lựa chọn môi trường và tối ưu các điều kiện lên men của chủng vi khuẩn *Pseudomonas putida* TSD-B5.7 chịu mặn phân giải phosphate

3.1.1. Nguồn gốc và thông tin định danh chủng vi khuẩn TSD-B5.7

Bảng 3.1. Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của chủng vi khuẩn TSD-B5.7

Tên chủng	Đặc điểm hình thái		Mô tả khuẩn lạc	Đặc điểm tế bào
TSD - B5.7			Khuẩn lạc không đều, nhỏ, màu trắng trong, mép không nhẵn, ướt	Gram âm, tế bào hình que dài, xếp chuỗi

Chủng vi khuẩn TSD-B5.7 được phân lập và tuyển chọn được từ mẫu đất lấy tại đảo Trường Sa Đông (TSD) về hình thái khuẩn lạc quan sát có đường kính 1–3 mm, hình tròn với bề mặt ướt và màu trắng đục. Tế bào vi khuẩn có dạng hình que, xếp thành chuỗi với chiều rộng tế bào > 1,0 μm . Phạm vi sinh trưởng của chúng trải dài từ 25 đến 55°C, pH từ 4 đến 9 và có khả năng chịu mặn trong khoảng 0–10 % NaCl. Sau đó tiến hành định danh và phân loại kết quả định danh được bổ sung:

Trình tự 16S rRNA của chủng vi khuẩn *Pseudomonas putida* TSD-B5.7.

>PP064927.1 *Pseudomonas putida* strain TSD-B5.7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
ACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATA
CGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTG
GTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAG
CACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGC
CGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTG
CTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCA
AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCT
CAACCTGGGAACATGCATCCAAAACCTGGCAGGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACCACTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCG
AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAA
TCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACT
CAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTAC
CAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTTGACACAGGTGCTGCATG
GCTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTTAGTTACCA
GCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGCTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAT
CATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGCTGCTACAATGGTTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGA
GCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGT
AATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTG
GGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGG
```

Bảng 3.2. Thông tin định danh của chủng vi khuẩn TSD-B5.7

Tên chủng	Khả năng chịu mặn (%)	Chức năng		Phân loại theo cấp độ ATSH (*)	Mã đăng kí Genbank
		Hoạt tính sinh học	Hoạt độ		
<i>Pseudomonas putida</i> TSD-B5.7	1-10	Phân giải phosphate khó tan ⁽¹⁾	125 – 128,3 (mg/L PO ₄ ³⁻)	Cấp 1	PP064927.1

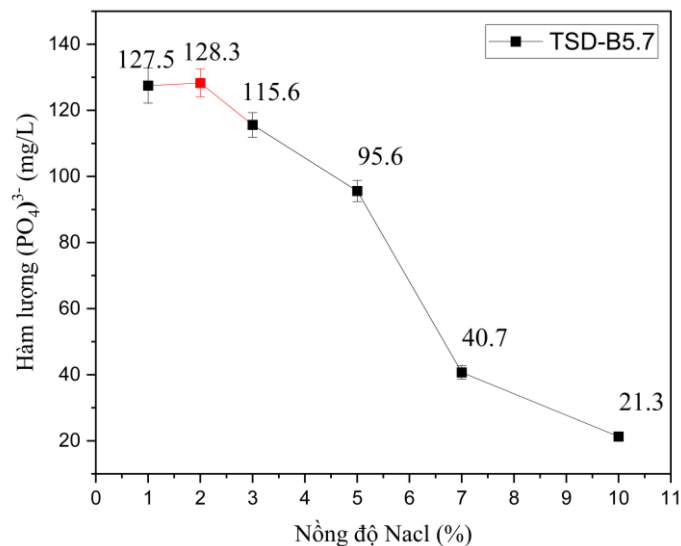
Ghi chú:

(1): Hoạt tính phân giải phosphate khó tan được xác định trên môi trường Nbrip bổ sung 1 - 3% NaCl.

Đánh giá khả năng chịu mặn tác động đến hoạt tính phân giải phosphate của chủng vi khuẩn.

Khả năng phân giải phosphate khó tan sẽ được thể hiện qua hàm lượng (PO₄)³⁻ được tạo thành trong dịch nuôi cấy chủng vi khuẩn.

Tiến hành lên men bổ sung nồng độ muối khác nhau của chủng vi khuẩn TSD-B5.7 sau 72 giờ thu dịch nuôi cấy, sau đó ly tâm lấy dịch trong. Kết quả như sau: Hàm lượng (PO₄)³⁻

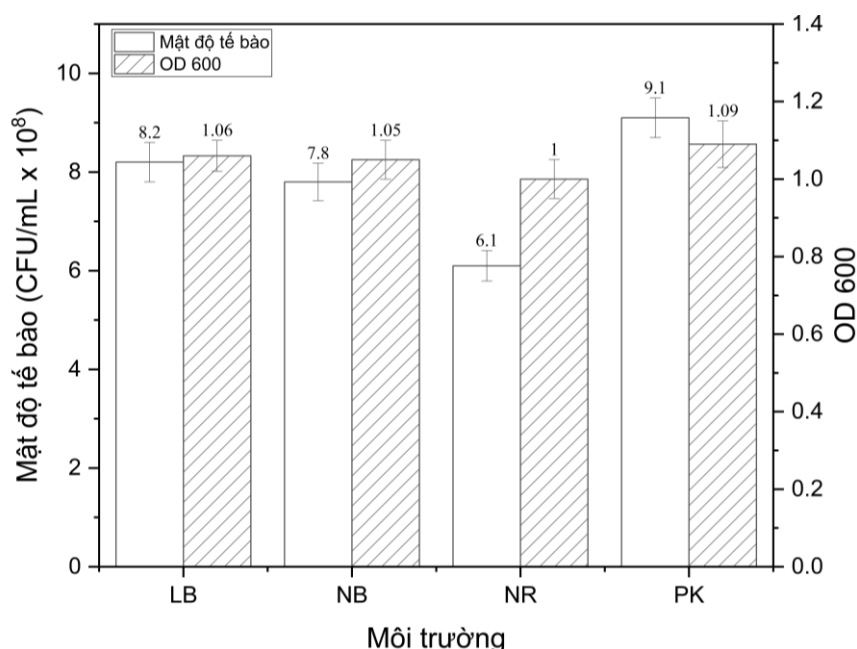
**Hình 3.1** Đánh giá khả năng chịu mặn của chủng TSD-B5.7

Kết quả khảo sát cho thấy ở nồng độ muối từ 1 - 3 %, hoạt tính giải phóng PO₄³⁻ đạt mức cao nhất, trong đó chủng TSD-B5.7 đạt giá trị tối đa tại 2 % NaCl

(128,3 mg/L). Chủng TSD-B5.7 duy trì hoạt tính tương đối cao ngay cả ở nồng độ 5 % NaCl (95,6 mg/L) cho thấy khả năng chịu mặn tốt. Khi nồng độ muối tăng lên 7 % và đặc biệt là 10 %, khả năng giải phóng PO_4^{3-} giảm mạnh, phản ánh rõ tác động ức chế của điều kiện mặn lên hoạt động sinh lý và hệ enzyme của vi khuẩn.

3.1.2. Ảnh hưởng của môi trường đến quá trình lên men thu sinh khối

Chủng vi khuẩn TSD-B5.7 được tiến hành khảo sát trên bốn môi trường nuôi cấy khác nhau gồm LB, NB, PK và NR nhằm xác định môi trường thích hợp nhất cho quá trình sinh trưởng. Thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện tiêu chuẩn: nhiệt độ 30 °C, tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 48 giờ. Hiệu quả sinh trưởng được đánh giá thông qua mật độ tế bào, kết quả được trình bày tại Hình 3.2.



Hình 3.2. Ảnh hưởng một số môi trường tới mật độ tế bào chủng vi khuẩn TSD-B5.7

Kết quả trên Hình 3.2 cho thấy chủng vi khuẩn TSD-B5.7 có khả năng phát triển tốt được ghi nhận trên toàn bộ các môi trường nghiên cứu, nhưng môi trường PK cho kết quả vượt trội với mật độ tế bào đạt $9,1 \times 10^8$ CFU/mL, cao hơn khi so với môi trường còn lại. Chứng tỏ rằng môi trường PK cung cấp nguồn dinh dưỡng phù hợp với quá trình sinh trưởng và nhân sinh khối của chủng vi khuẩn phân giải phosphate này.

Kết quả này phù hợp với báo cáo của Qurashi và Sabri (2012) trong đó các chủng *Pseudomonas* phân giải phosphate được ghi nhận có tốc độ sinh trưởng và hoạt tính enzyme cao hơn trong các môi trường có thành phần khoáng cân bằng, đặc biệt khi có nguồn cacbon dễ phân giải kết hợp với yếu tố vi lượng [61]. Tương tự, nghiên cứu của Singh và cộng sự (2011) cũng chỉ ra rằng việc lựa chọn môi trường nuôi cấy

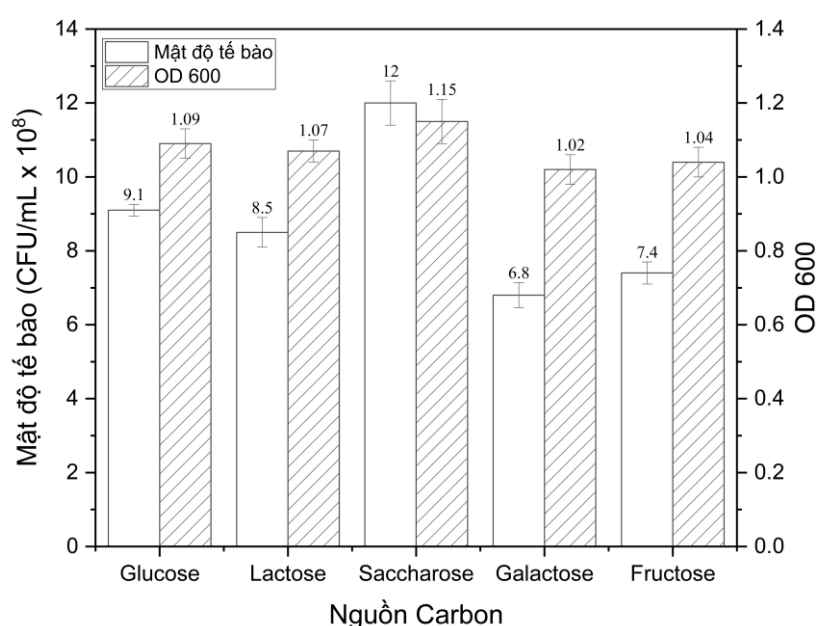
thích hợp không chỉ ảnh hưởng đến mật độ tế bào mà còn ảnh hưởng đến hiệu suất tiết enzyme phân giải phosphate và hiệu quả cố định dinh dưỡng trong đất [62].

Như vậy, môi trường PK được chọn làm nền tảng để tiếp tục tối ưu hóa các thành phần dinh dưỡng cho quá trình lên men và nhân sinh khối của chủng vi khuẩn *TSD-B5.7*.

3.1.3. Ảnh hưởng các nguồn cacbon đến quá trình lên men thu sinh khối

Khảo sát lựa chọn nguồn cacbon

Trong số các môi trường nuôi cấy được khảo sát, môi trường PK thể hiện hiệu suất sinh trưởng cao nhất và do đó được lựa chọn làm nền tảng để nghiên cứu ảnh hưởng các nguồn cacbon khác nhau. Công thức gốc của môi trường PK có chứa glucose với nồng độ 1 % làm nguồn cung cấp cacbon chính. Trong nghiên cứu này, các nguồn cacbon được bổ sung ở cùng nồng độ (1 %) bao gồm: glucose, lactose, saccharose, galactose và fructose nhằm đánh giá tác động đến sự phát triển của vi khuẩn. Kết quả được trình bày trong Hình 3.3.



Hình 3.3. Ảnh hưởng nguồn cacbon đến mật độ tế bào

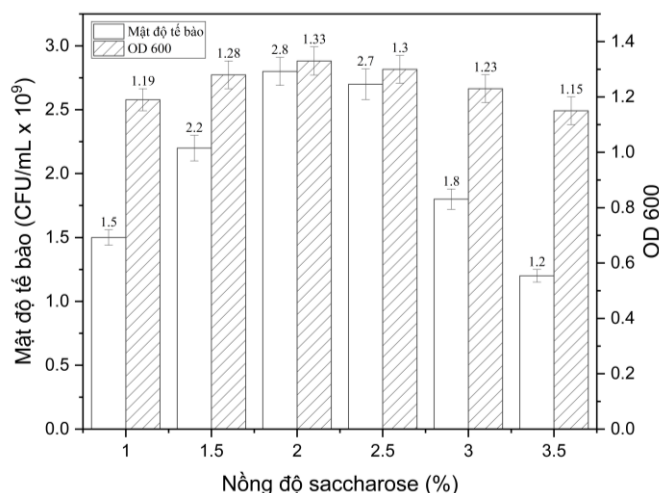
Kết quả trên Hình 3.3 cho thấy chủng vi khuẩn *TSD-B5.7* có khả năng sử dụng hiệu quả tất cả các loại đường được thử nghiệm, phản ánh tính linh hoạt và thích nghi cao trong việc khai thác nhiều loại hợp chất cacbon khác nhau. Đặc biệt, saccharose cho thấy hiệu quả vượt trội khi hỗ trợ chủng vi khuẩn phát triển mạnh nhất với mật độ tế bào đạt $1,2 \times 10^9$ CFU/mL cao hơn đáng kể so với các loại đường khác, kể cả glucose. Trên cơ sở đó, saccharose được chọn thay thế cho glucose trong công thức môi trường PK cho các thí nghiệm tiếp.

Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Nkoh và cộng sự (2019), trong đó cho thấy một số loài thuộc chi *Pseudomonas* sở hữu khả năng sử dụng saccharose một cách hiệu quả nhờ vào hệ enzyme invertase và sucrase hoạt động mạnh, hỗ trợ phân giải saccharose thành glucose và fructose để sử dụng [63]. Ngoài ra, theo báo cáo của Sharma & Johri, saccharose không những hỗ trợ tốt cho sinh trưởng vi khuẩn mà còn kích thích khả năng tiết enzyme phosphatase – yếu tố quan trọng của quá trình phân giải phosphate trong đất [64].

Do đó, việc thay thế glucose bằng saccharose trong môi trường PK không chỉ giúp cải thiện sinh trưởng đồng thời cải thiện hiệu quả hoạt động của chủng vi khuẩn TSD-B5.7

3.1.4. Ảnh hưởng của nồng độ Saccharose

Sau khi xác định saccharose là nguồn cacbon thích hợp nhất cho quá trình sinh trưởng của chủng vi khuẩn TSD-B5.7, nghiên cứu tiếp theo được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của các nồng độ saccharose khác nhau đến quá trình phát triển của chủng. Thí nghiệm được tiến hành bằng cách bổ sung saccharose với các nồng độ từ 1% đến 3,5 % vào môi trường nuôi cấy kết quả được trình bày tại hình 3.4.



Hình 3.4. Ảnh hưởng của nồng độ saccharose đến mật độ tế bào

Kết quả thí nghiệm cho thấy sự thay đổi nồng độ saccharose ảnh hưởng rõ rệt đến tốc độ sinh trưởng của chủng vi khuẩn TSD-B5.7. Khi nồng độ saccharose tăng từ 1 % lên 2 % mật độ tế bào gia tăng đáng kể, cho thấy chủng vi sinh vật phản ứng tích cực với sự cải thiện nguồn cacbon dễ hấp thụ. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ saccharose lên 2,5 %, tốc độ sinh trưởng có dấu hiệu chững lại và ở mức 3 %, mật độ tế bào bắt đầu giảm cho thấy có thể xảy ra hiện tượng ức chế sinh trưởng khi dư thừa chất dinh dưỡng.

Dựa trên kết quả này, nồng độ saccharose 2 % được xác định là tối ưu cho quá trình lên men nhân sinh khối của chủng vi khuẩn TSD-B5.7. Việc lựa chọn nồng độ

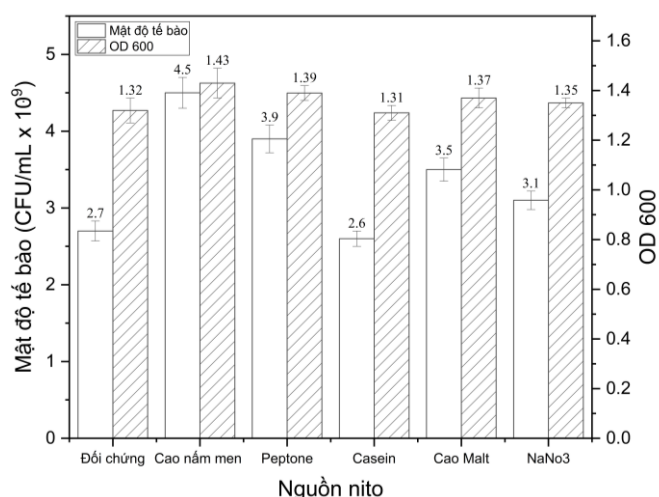
này không chỉ đảm bảo hiệu quả sinh trưởng tối ưu mà còn phù hợp với mục tiêu tiết kiệm chi phí nguyên liệu trong quá trình sản xuất.

Những kết quả thu được tương đồng với báo cáo của Andrew và cộng sự (2022), khi họ lưu ý rằng mức cacbon vượt mức có khả năng gây ức chế dị hóa (catabolite repression) từ đó làm suy giảm khả năng sinh trưởng của vi sinh vật. Vì vậy, việc xác lập một nồng độ cacbon hợp lý là bước quan trọng trong việc tối ưu hóa môi trường lên men đối với những chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa phosphate [65].

3.1.5. Ảnh hưởng các nguồn Nito đến quá trình lên men thu sinh khối

Khảo sát lựa chọn nguồn Nito

Để khảo sát tác động của các loại nguồn nito đến khả năng sinh trưởng và tích lũy sinh khối của chủng vi khuẩn TSD-B5.7, một thí nghiệm đã được thực hiện bằng cách bổ sung các nguồn nito khác nhau, bao gồm cả dạng hữu cơ và vô cơ vào môi trường nuôi cấy với cùng nồng độ 0,5 %. Kết quả thu được từ thí nghiệm này được thể hiện trong Hình 3.5.



Hình 3.5. Ảnh hưởng nguồn Nito đến mật độ tế bào

Theo hình 3.5 cho thấy các nguồn nito được bổ sung đều có tác động đến sự phát triển của chủng vi khuẩn TSD-B5.7, tuy nhiên mức độ ảnh hưởng thể hiện sự khác biệt rõ rệt giữa các loại. Đáng chú ý, khi sử dụng cao nấm men làm nguồn nito, mật độ tế bào đạt giá trị cao $4,5 \times 10^9$ CFU/mL vượt trội so với các nguồn nito khác được thử nghiệm. Cao nấm men là một nguồn nito hữu cơ giàu acid amin, vitamin và các yếu tố sinh trưởng thiết yếu, không chỉ cung cấp nguyên liệu cho quá trình sinh tổng hợp protein mà còn góp phần thúc đẩy sự sinh trưởng của vi sinh vật.

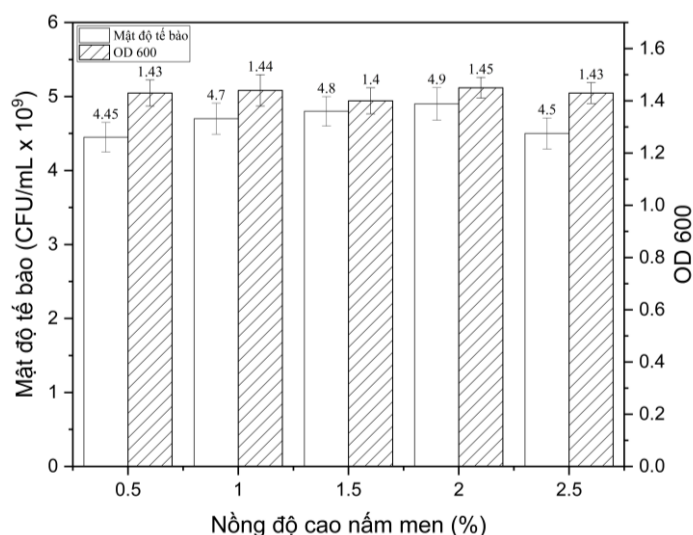
Theo Maciejewska và cộng sự (2022) cũng đã chỉ ra rằng cao nấm men là nguồn nito hiệu quả trong môi trường lên men hiếu khí, đặc biệt đối với các loài thuộc chi

Pseudomonas nhờ khả năng cung cấp nhanh chóng các hợp chất hữu cơ dễ hấp thu và chuyển hóa [66].

Dựa trên các kết quả thu được, cao nấm men được lựa chọn làm nguồn nitơ chính trong công thức môi trường nuôi cấy cho các thí nghiệm tiếp, nhằm mục tiêu tối ưu quá trình nhân sinh khối của chủng vi khuẩn phân giải phosphate TSD-B5.7.

3.1.6. Ảnh hưởng của nồng độ cao nấm men

Sau khi xác định cao nấm men là nguồn nitơ phù hợp cho quá trình sinh trưởng của chủng vi khuẩn TSD-B5.7, nghiên cứu tiếp theo được thực hiện nhằm khảo sát ảnh hưởng các mức nồng độ khác nhau của nguồn nitơ này đến hiệu suất nhân sinh khối. Cụ thể, môi trường nuôi cấy được bổ sung cao nấm men ở các mức nồng độ dao động từ 1 % đến 2,5 %. Kết quả đánh giá được thể hiện chi tiết ở hình 3.6.



Hình 3.6. Ảnh hưởng của nồng độ cao nấm men đến mật độ tế bào

Kết quả cho thấy sự thay đổi nồng độ cao nấm men trong khoảng từ 1 % đến 2 % không gây ra biến động khác biệt rõ rệt về mật độ tế bào của chủng vi khuẩn TSD-B5.7. Tuy nhiên, khi nồng độ tăng lên đến 2,5 % mật độ tế bào bắt đầu có xu hướng giảm nhẹ. Hiện tượng này được giải thích do sự dư thừa nguồn nitơ trong môi trường, dẫn đến mất cân đối dinh dưỡng hoặc sự tích lũy các sản phẩm chuyển hóa thứ cấp gây ức chế đến sự phát triển của vi sinh vật.

Dựa trên kết quả thu được, nồng độ cao nấm men 1 % được xác định là mức tối ưu cho sinh trưởng và tích lũy sinh khối của chủng vi khuẩn TSD-B5.7. Việc lựa chọn nồng độ thấp hơn không chỉ đảm bảo hiệu quả sinh trưởng mà còn có ích về mặt kinh tế khi giảm thiểu phí nguyên liệu trong quá trình lên men quy mô lớn.

Nhận định này phù hợp với các báo cáo của Binmad và cộng sự (2022), trong đó cho thấy hiệu quả sinh trưởng của vi khuẩn không tỷ lệ thuận với lượng nguồn

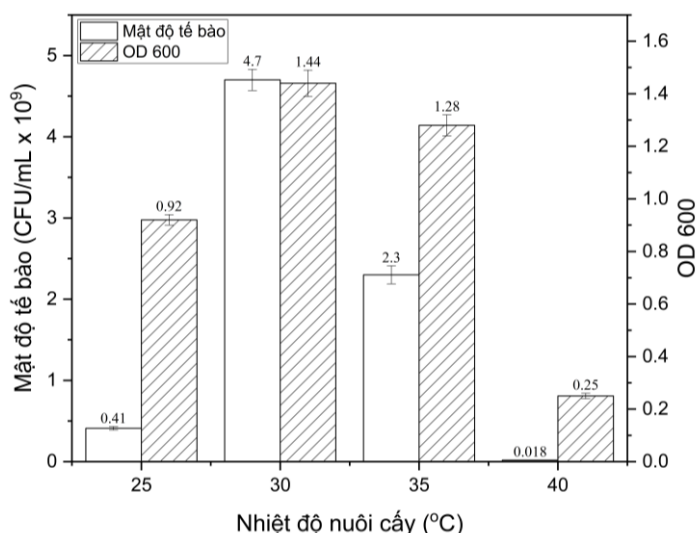
dinh dưỡng bổ sung và việc tối ưu hóa nồng độ chất dinh dưỡng là yếu tố then chốt để đạt được hiệu suất sinh khối cao mà vẫn đảm bảo chi phí hợp lý [67].

Như vậy PK cải tiến với các thành phần (g/L): Saccharose 20; cao nấm men 10; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5; KCl 0,2; $\text{MgCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5; NaCl 20 là môi trường phù hợp để nhân sinh khối chủng vi khuẩn chịu mặn phân giải phosphate TSD-B5.7.

3.2. Ảnh hưởng điều kiện nuôi cấy tới quá trình lên men thu sinh khối

3.2.1. Ảnh hưởng nhiệt độ nuôi cấy

Nhiệt độ là một trong những yếu tố môi trường quan trọng ảnh hưởng trực tiếp đến tốc độ sinh trưởng, chuyển hóa và hoạt tính enzyme của vi sinh vật. Mỗi loài vi khuẩn có một khoảng nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển, vượt quá hoặc thấp hơn khoảng này đều có thể làm giảm hiệu suất sinh trưởng do thay đổi cấu trúc protein và màng tế bào (Madigan và cộng sự (2015)) [68].



Hình 3.7. Ảnh hưởng nhiệt độ nuôi cấy đến mật độ tế bào

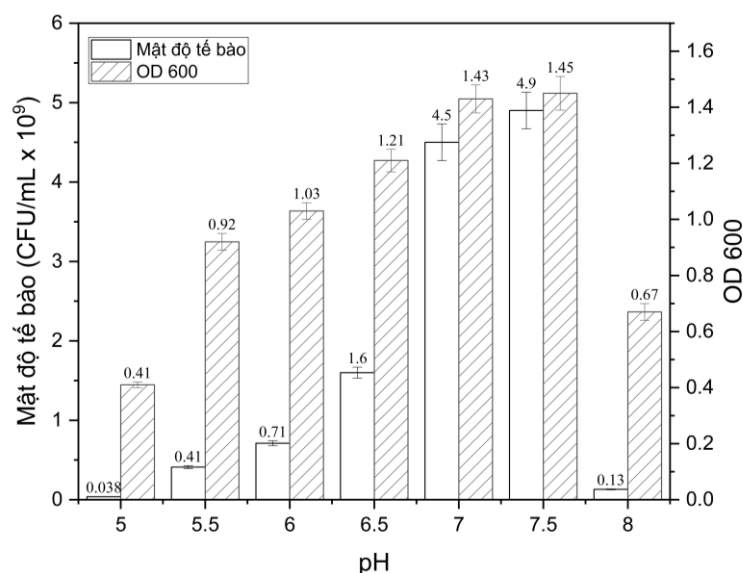
Chủng vi khuẩn TSD-B5.7 đạt mật độ tế bào cao nhất tại nhiệt độ 30 °C, đạt giá trị $4,7 \times 10^9$ CFU/mL, cho thấy đây là điều kiện nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển của chủng này. Kết quả này tương thích với đặc điểm sinh lý của các loài thuộc chi *Pseudomonas* với nhiệt độ sinh trưởng tối ưu dao động từ 28 đến 32°C (Kennedy và cộng sự, 2004).

Như vậy, việc xác định nhiệt độ tối ưu riêng cho từng chủng vi khuẩn là một bước thiết yếu nhằm cải thiện hiệu quả nhân sinh khối và hỗ trợ ứng dụng trong sản xuất các chế phẩm sinh học.

3.2.2. Ảnh hưởng của giá trị pH ban đầu

Bên cạnh các yếu tố như nhiệt độ và thành phần dinh dưỡng, pH ban đầu của môi trường nuôi cấy là một thông số quan trọng, có vai trò điều chỉnh hoạt động của enzyme và ảnh hưởng đến khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng, điều này có tác động trực tiếp lên quá trình phát triển của vi sinh vật Madigan và cộng sự (2015) [69]. Mỗi loài thường có một khoảng pH tối ưu riêng biệt cho quá trình sinh trưởng, do đó việc xác định giá trị pH thích hợp là cần thiết nhằm nâng cao hiệu quả nhân sinh khối.

Trong nghiên cứu này chủng vi khuẩn TSD-B5.7 được nuôi cấy trong điều kiện môi trường tối ưu với các giá trị pH khởi đầu khác nhau để đánh giá ảnh hưởng của pH đến khả năng phát triển. Kết quả thể hiện trong hình 3.8 cho thấy sự biến đổi pH có ảnh hưởng nhiều đến tốc độ sinh trưởng của chủng vi khuẩn được khảo sát.



Hình 3.8. Ảnh hưởng giá trị pH ban đầu đến mật độ tế bào

Chủng *Pseudomonas putida* TSD-B5.7 đạt mật độ sinh trưởng cao nhất ở pH 7,5 với mật độ tế bào lên đến $4,9 \times 10^5$ CFU/mL. Kết quả này tương ứng với các nghiên cứu trước đây, điển hình như công bố của Saharan và cộng sự (2011), trong đó nhiều loài thuộc chi *Pseudomonas* được ghi nhận phát triển tối ưu trong khoảng pH từ 6,5 đến 7,5.

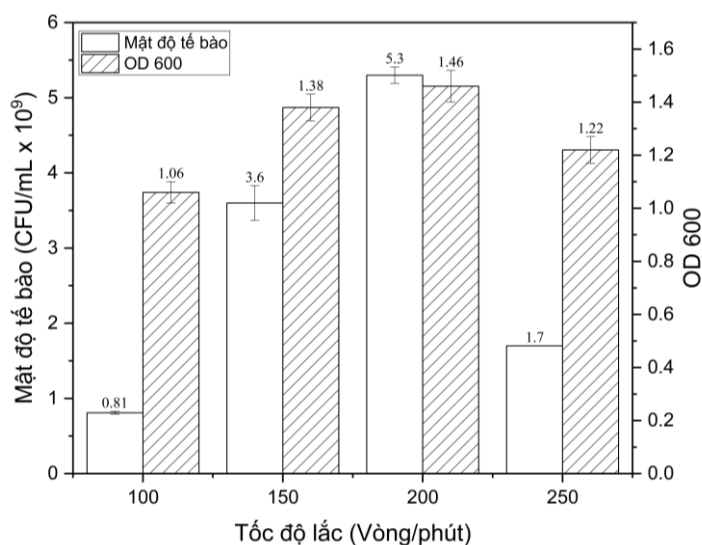
Những phát hiện này đóng vai trò quan trọng trong việc thiết lập điều kiện nuôi cấy thích hợp, góp phần tối ưu hóa quá trình nhân sinh khối của chủng vi khuẩn phân giải phosphate trong môi trường lên men

3.2.3. Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Tốc độ lắc là một yếu tố vật lý quan trọng trong quá trình nuôi cấy hiếu khí, ảnh hưởng trực tiếp đến việc cung cấp oxy hòa tan, khả năng khuếch tán các chất dinh

đường cũng như sự phân bố đồng đều của vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy theo Zhu và cộng sự (2008). Việc tối ưu hóa tốc độ lắc là cần thiết để tạo điều kiện phát triển thuận lợi nhất cho vi khuẩn [70].

Trong nghiên cứu này, chủng vi khuẩn TSD-B5.7 được thử nghiệm với các mức tốc độ lắc khác nhau gồm 100, 150, 200 và 250 vòng/phút. Kết quả cho thấy mật độ tế bào đạt giá trị cao nhất tại tốc độ lắc 200 vòng/phút. Tốc độ lắc thấp hơn trong khoảng 100 - 150 vòng/phút hạn chế cung cấp oxy, làm giảm hiệu quả sinh trưởng; ngược lại, tốc độ lắc quá cao ở mức 250 vòng/phút có thể tạo ra áp lực cơ học và phân tán tế bào quá mức, gây suy giảm mật độ tế bào.



Hình 3.9. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến mật độ tế bào

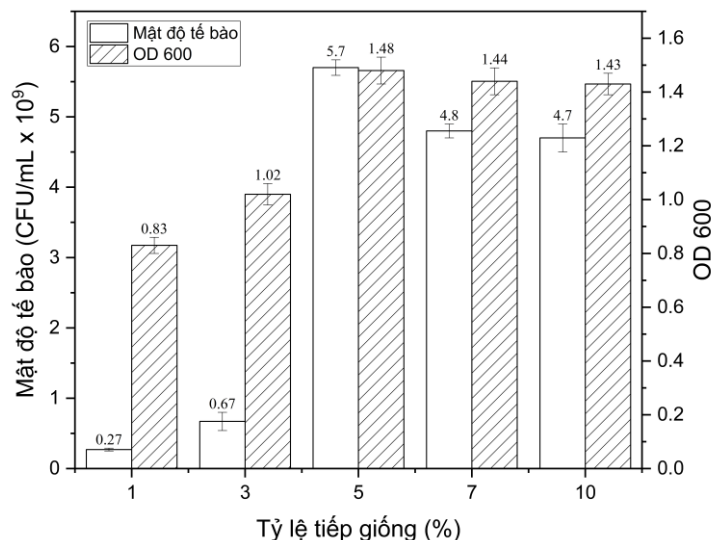
Kết quả thu được tương đồng với nghiên cứu của Gaind và Gaur (1991), trong đó họ xác định tốc độ lắc 200 vòng/phút là điều kiện tối ưu cho sinh trưởng của nhiều chủng vi khuẩn có khả năng phân giải phosphate [71]. Vì vậy, tốc độ lắc 200 vòng/phút được chọn làm điều kiện chuẩn trong các nghiên cứu tiếp theo nhằm tối ưu hóa quá trình lên men nhân sinh khối của chủng vi khuẩn TSD-B5.7.

3.2.4. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống ban đầu

Bên cạnh các yếu tố môi trường như nguồn dinh dưỡng, pH, nhiệt độ hay tốc độ lắc, thì tỷ lệ tiếp giống ban đầu cũng là một yếu tố quan trọng cần được xác định hợp lý để đảm bảo quá trình sinh trưởng và nhân sinh khối của vi khuẩn đạt hiệu quả tối ưu (Monod, 1949; Shuler & Kargi, 2002). Tỷ lệ tiếp giống ảnh hưởng trực tiếp đến mật độ tế bào ban đầu, từ đó tác động đến thời gian pha lag, pha log cũng như khả năng cạnh tranh dinh dưỡng và oxy trong môi trường [72, 73].

Kết quả cho thấy, khi tăng tỷ lệ tiếp giống từ 1 % đến 5 %, mật độ tế bào của chủng vi khuẩn TSD-B5.7 tăng nhanh, cho thấy hiệu quả sinh trưởng tốt. Tuy nhiên,

khi tăng tiếp tỷ lệ tiếp giống lên 7 % và 10 %, mật độ tế bào tăng không đáng kể, thậm chí có xu hướng giảm, có thể do hiện tượng ức chế do mật độ cao dẫn đến cạnh tranh gay gắt về dinh dưỡng và oxy, hoặc tích lũy các sản phẩm phụ gây ức chế sinh trưởng.



Hình 3.10. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống đến mật độ tế bào

Theo Singh và cộng sự (2011), việc áp dụng tỷ lệ giống thấp có thể làm tăng thời gian thích nghi, trong khi tỷ lệ giống quá cao có thể làm giảm hiệu suất tăng trưởng do sự thiếu hụt oxy và dinh dưỡng cục bộ. Theo Juwon và cộng sự (2016) đã ghi nhận và khuyến nghị tỷ lệ tiếp giống tối ưu khoảng 5% để đảm bảo sự cân bằng giữa tốc độ sinh trưởng và sử dụng dinh dưỡng hiệu quả [73, 74].

Do đó, tỷ lệ tiếp giống 5% được lựa chọn là phù hợp cho quá trình lên men nhân sinh khối của chủng vi khuẩn TSD-B5.7 trong các nghiên cứu tiếp theo.

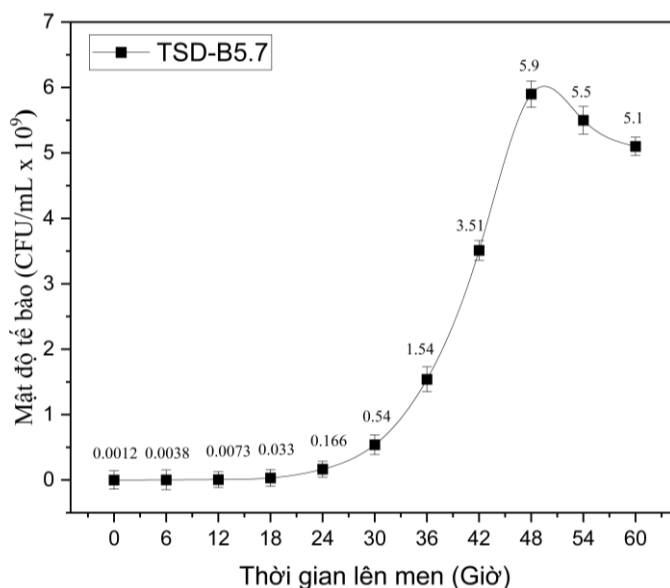
3.2.5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Thời gian nuôi cấy là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật, đặc biệt trong quá trình lên men nhân sinh khối. Thời gian nuôi cấy phù hợp không chỉ giúp đạt được mật độ tế bào tối đa mà còn góp phần tiết kiệm chi phí sản xuất và nâng cao hiệu quả kinh tế. Ngược lại, việc kéo dài thời gian nuôi cấy không cần thiết có thể dẫn đến hao phí tài nguyên và giảm hiệu suất sinh trưởng do tích lũy các sản phẩm phụ gây ức chế [75].

Trong nghiên cứu này, quá trình nuôi cấy được tiến hành và lấy mẫu định kỳ theo các mốc thời gian: 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54 và 60 giờ. Kết quả khảo sát cho thấy:

Chủng vi khuẩn *Pseudomonas putida* TSD-B5.7 bắt đầu pha log muộn vào khoảng 18 giờ sau khi nuôi cấy. Chủng vi khuẩn đạt mật độ tế bào cao nhất vào thời

gian 48 giờ, sau thời gian đó với sự khác biệt không đáng kể về mật độ tại thời điểm 60 giờ, cho thấy tại 48 giờ là thời điểm thu sinh khối tối ưu.



Hình 3.11. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến mật độ tế bào

Theo Stanier và cộng sự (1966), các loài thuộc chi *Pseudomonas* thường có thời gian tiềm phát kéo dài hơn so với các vi khuẩn tăng trưởng nhanh như *Escherichia coli*, do yêu cầu thích nghi về enzyme và chuyển hóa. Tương tự, Neidhardt và cộng sự (1990) cũng chỉ ra rằng *Pseudomonas putida* thường đạt mật độ sinh khối tối đa sau 40 - 50 giờ nuôi cấy, trước khi bước vào pha ổn định. Ngoài ra, theo Díaz-Rodríguez và cộng sự (2014) khi nghiên cứu *P. putida* KT2440 cũng ghi nhận thời điểm đạt mật độ tế bào cao nhất vào khoảng 48 giờ [76, 78].

Như vậy, thời điểm 48 giờ được xác định là phù hợp để thu nhận sinh khối cao nhất cho chủng vi khuẩn nghiên cứu.

Kết luận: Đã lựa chọn được thành phần môi trường và điều kiện nhân nuôi thu sinh khối của chủng vi khuẩn chịu mặn phân giải phosphate. Cụ thể:

- Chủng vi khuẩn phân giải phosphate chịu mặn TSD-B5.7:
 - + Thành phần môi trường PK (g/L): saccharose 20; cao nấm men 10; (NH₄)₂SO₄ 1; MgSO₄.7H₂O 0,1; Ca₃(PO₄)₂ 5; KCl 0,2; MgCl₆H₂O 5; NaCl 20
 - + Điều kiện cấy: Nhiệt độ 30 °C, tốc độ lắc 200 vòng/phút, pH 7,5, tỷ lệ tiếp giống 5 %, thời gian nuôi cấy 48 giờ.

3.2.6. Tối ưu điều kiện lên men chủng vi khuẩn phân giải phosphate.

a) Ma trận thực nghiệm Box – Benhnken

Sau khi nghiên cứu về các điều kiện sinh trưởng của chủng vi khuẩn TSD-B5.7, chúng tôi lựa chọn được 3 yếu tố bao gồm: Nhiệt độ nuôi cấy, độ pH môi trường và

thời gian để thiết kế thí nghiệm dựa theo phương pháp 2.2.1.8. Kết quả được trình bày tại Bảng 3.3, Bảng 3.4.

Bảng 3.3. Ma trận thực nghiệm Box – Benhnken 3 yếu tố và giá trị thực nghiệm OD₆₀₀ nm ở các điều kiện khác nhau

		Factor 1	Factor 2	Factor 3	Response 1
Std	Run	A:Nhiệt độ	B:Thời gian	C:pH	OD 600nm
		(°C)	(h)		
1	1	25	36	6.5	0.94
3	2	25	60	6.5	0.9
14	3	30	48	6.5	1.56
5	4	25	48	5.5	0.38
9	5	30	36	5.5	0.37
7	6	25	48	7.5	1.2
16	7	30	48	6.5	1.47
13	8	30	48	6.5	1.58
11	9	30	36	7.5	1.22
15	10	30	48	6.5	1.49
4	11	35	60	6.5	1.42
12	12	30	60	7.5	1.51
2	13	35	36	6.5	0.85
6	14	35	48	5.5	0.39
17	15	30	48	6.5	1.45
10	16	30	60	5.5	0.38
8	17	35	48	7.5	1.53

b) Đánh giá tính phù hợp của mô hình

Kiểm tra sự phù hợp của mô hình và các hệ số được tiến hành bằng phương pháp phân tích hồi quy. Kết quả được trình bày.

Bảng 3.4. Kết quả phân tích ANOVA tối ưu các yếu tố

Yếu tố	Tổng bình phương	Bậc tự do	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị p (Prob>F)	
Mô hình	3.51	9	0.3905	132.21	< 0.0001	Tin cậy
A-Nhiệt độ	0.0741	1	0.0741	25.09	0.0015	
B- Thời gian	0.0861	1	0.0861	29.16	0.0010	
C-pH	1.94	1	1.94	656.98	< 0.0001	
AB	0.0930	1	0.0930	31.50	0.0008	
AC	0.0256	1	0.0256	8.67	0.0216	
BC	0.0196	1	0.0196	6.64	0.0367	
A ²	0.2400	1	0.2400	81.26	< 0.0001	
B ²	0.2502	1	0.2502	84.70	< 0.0001	
C ²	0.6611	1	0.6611	223.83	< 0.0001	
Phần dư	0.0207	7	0.0030			
Sự không tương thích	0.0077	3	0.0026	0.7872	0.5605	Không tin cậy
Sai số thuần	0.0130	4	0.0033			
Tổng quan	3.53	16				

Phân tích ANOVA cho thấy giá trị F của mô hình là 132.21, chứng tỏ mô hình có ý nghĩa thống kê. Các giá trị P nhỏ hơn 0.05 cho thấy các yếu tố trong mô hình có ý nghĩa, chứng minh rằng các ảnh hưởng riêng lẻ của các biến độc lập, các thành phần bậc hai của chúng, cũng như các tương tác giữa chúng đều ảnh hưởng tới khả năng

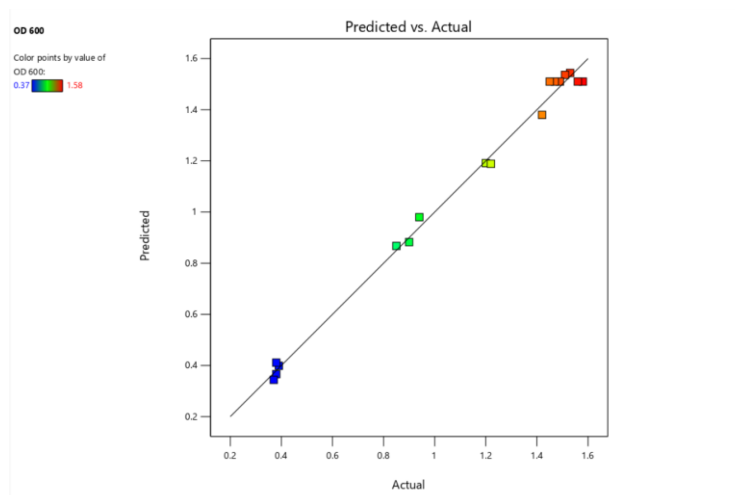
sinh trưởng của chủng vi khuẩn TSD-B5.7. Giá trị F của Lack of Fit là 0.7872, cho thấy phần sai lệch không phù hợp không có ý nghĩa so với sai số thuần, hàm ý rằng các điểm khác biệt giữa mô hình này và dữ liệu quan sát được có thể chỉ là do nhiễu ngẫu nhiên. Hệ số xác định (R^2) là một chỉ số quan trọng đánh giá độ phù hợp của mô hình; giá trị $R^2 = 0.9942$ (lớn hơn 0.8) phản ánh mối tương quan mạnh. Hơn nữa, giá trị R^2 dự đoán = 0.9595 có sự tương đồng hợp lý với R^2 hiệu chỉnh = 0.9866, với chênh lệch nhỏ hơn 0.2, xác nhận rằng mô hình là phù hợp. Giá trị Độ chính xác thích hợp (Adeq Precision) = 28.7894 cho thấy tín hiệu đủ mạnh (giá trị lớn hơn 4 là mong muốn) (Bảng 3.5). Kết quả ANOVA xác nhận rằng mô hình là cả phù hợp lẫn đáng tin cậy.

Bảng 3.5. Kết quả phân tích phù hợp của mô hình

Thông số	Giá trị	Thông số	Giá trị
Độ lệch chuẩn	0.0543	R^2	0.9942
Giá trị trung bình	1.10	R^2 hiệu chỉnh	0.9866
Hệ số biến thiên %	4.96	R^2 dự đoán	0.9595
		Độ chính xác phù hợp	28.7894

Vậy phương trình hồi quy, phản ánh ảnh hưởng của các yếu tố pH, nhiệt độ, thời gian cũng như sự tương tác giữa chúng được biểu diễn như sau:

$$\text{OD} = +1.51 + 0.0963 * A + 0.1038 * B + 0.4925 * C + 0.1525 * AB + 0.0800 * AC + 0.0700 * BC - 0.2388 * A^2 - 0.2438 * B^2 - 0.3963 * C^2$$



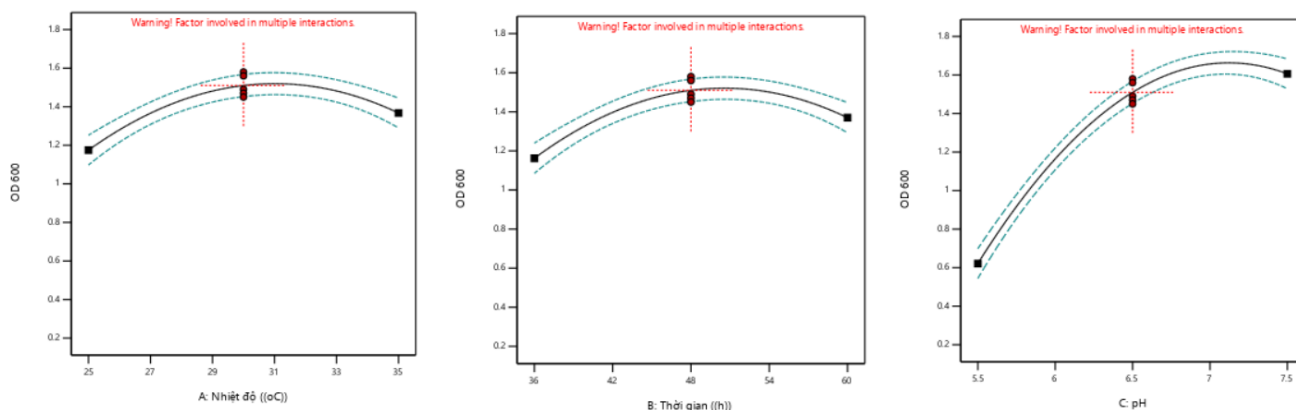
Hình 3.12. Đường tương quan giữa giá trị thực nghiệm và dự đoán

Các giá trị dự đoán thu được khá gần với các giá trị thử nghiệm các điểm này gần

như đều nằm trên đường chuẩn (Hình 3.11), khẳng định rằng mô hình được phát triển đã thành công trong việc nắm bắt mối tương quan giữa các tham số của quá trình.

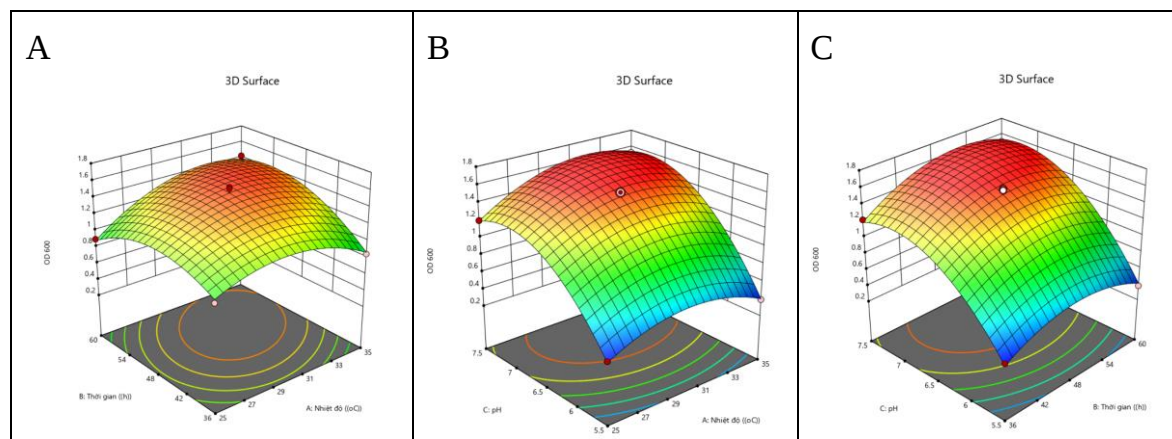
c) Đánh giá ảnh hưởng của các thông số đầu vào

Các thông số riêng đầu vào được nghiên cứu bao gồm pH (đường A), nhiệt độ (đường B) và thời gian (đường C) như trên Hình 3.12.



Hình 3.13. Đồ thị nhiễu loạn của các thông số đầu vào

Từ đồ thị nhận thấy độ cong của đường C là rõ ràng nhất. Điều này cho thấy giá trị pH là yếu tố có ảnh hưởng mạnh mẽ nhất đến sự phát triển của vi khuẩn. Giá trị OD 600 nm tăng nhanh khi pH tăng từ 5,5 đạt cực đại ở khoảng giữa và sau đó có xu hướng giảm nhẹ khi tiến tới pH 7,5. Phân tích ANOVA (Bảng 3.4) cũng khẳng định điều này với giá trị F của yếu tố C là 656.98, cao nhất trong các yếu tố, cho thấy ảnh hưởng rất có ý nghĩa thống kê ($p < 0.0001$).



Hình 3.14. Biểu diễn bề mặt đáp ứng của giá trị OD 600. A – Thay đổi nhiệt độ (°C) và thời gian (h); B – Thay đổi của nhiệt độ (°C) và độ pH; C – Thay đổi thời gian (h) và độ pH

Tiến hành phân tích kết quả về tương tác giữa Nhiệt độ và Thời gian với nồng độ Sucrose được giữ cố định (Hình 3.14A). Quan sát về hình dạng bề mặt, ta có thể nhận thấy sự thay đổi của nhiệt độ và thời gian có tác động lớn tới giá trị OD. Cụ thể, giá trị OD 600 nm tăng lên khi cả nhiệt độ và thời gian cùng tăng. Vùng màu đỏ, tương ứng với mật độ quang cao nhất, nằm ở góc trên bên phải của biểu đồ, cho thấy

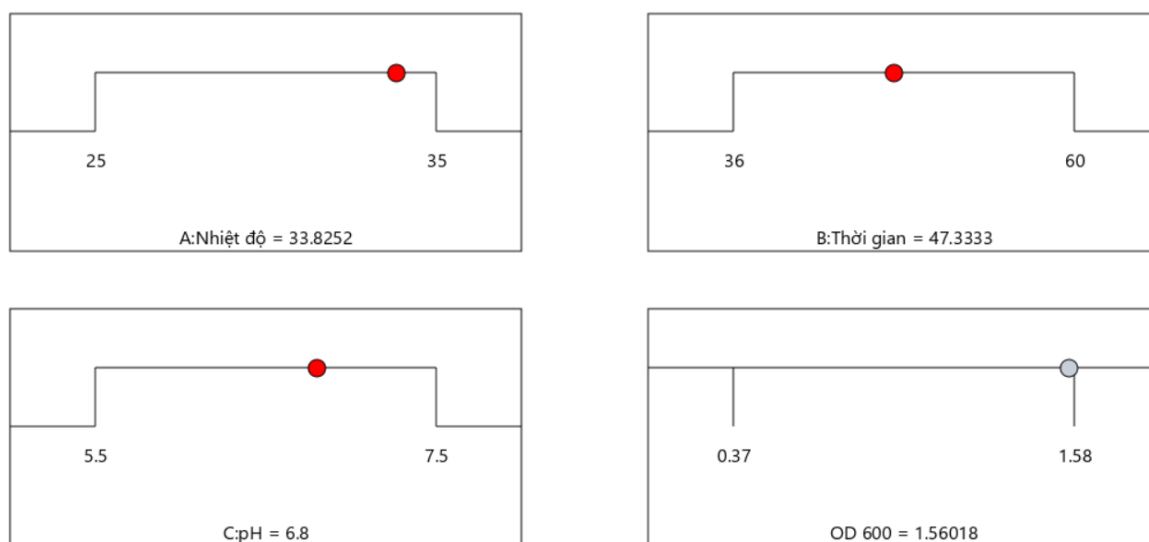
điều kiện tối ưu nằm ở khoảng nhiệt độ cao (gần 35°C) và thời gian dài (gần 60 giờ).

Tiếp tục phân tích về sự tương tác giữa Nhiệt độ và pH (Hình 3.14B): Quan sát bề mặt đồ thị, Vùng tối ưu (màu đỏ) nằm ở mức nhiệt độ cao (khoảng $30-35^{\circ}\text{C}$) và pH trung tính (khoảng 6,5 – 7,5). Điều này cho thấy vi khuẩn rất nhạy cảm với sự thay đổi đồng thời của hai yếu tố này. Giá trị OD có xu hướng giảm dần khi tăng hoặc giảm quá sâu hai yếu tố này. Hai nồng độ của hai yếu tố này có thể thay đổi tùy thuộc vào nồng độ của yếu tố còn lại.

Quan sát sự tương tác giữa Thời gian và pH (Hình 3.14C). Qua hình ảnh ta thấy, vùng đồ thị màu cam đến đỏ cho thấy giá trị OD cao nhất ứng với thời gian nuôi cấy kéo dài (khoảng 48 - 60 giờ) và pH được duy trì trong khoảng 6,5 - 7,5. Tuy nhiên việc pH quá cao hay quá thấp cũng gây suy giảm giá trị OD.

d) Thiết lập hàm mong đợi

Tiến hành giải bài toán tối ưu hóa theo thuật toán hàm mong đợi bằng phần mềm Design Expert 13. Kết quả tối ưu hóa bằng được đưa ra ở hình dưới đây:



Hình 3.15. Các giá trị tối ưu cho quy trình theo tính toán

Với mục đích lựa chọn điều kiện tối ưu trong quy trình, mô hình đã xác định được các tham số tối ưu như sau: pH= 6.8 nhiệt độ là $33,8^{\circ}\text{C}$, trong thời gian 47,3 giờ, khi đó nồng độ OD thu được tối đa là 1.56. Kết quả này phù hợp với kết quả thực nghiệm đã đưa ra.

Kết luận: Như vậy điều kiện mô hình đã tối ưu được pH 6,8; T $33,8^{\circ}\text{C}$; thời gian: 47,3 giờ cho giá trị OD dự đoán cao nhất 1,56. Tuy nhiên, khi đổi chiều áp dụng trên quy mô 7L/mẻ, giá trị này giảm còn 1,5 ở điều kiện pH 7,5 với nhiệt độ 30°C ; thời gian 48 giờ. Sự sai khác 5 % về giá trị mật độ quang nằm trong khoảng dao động

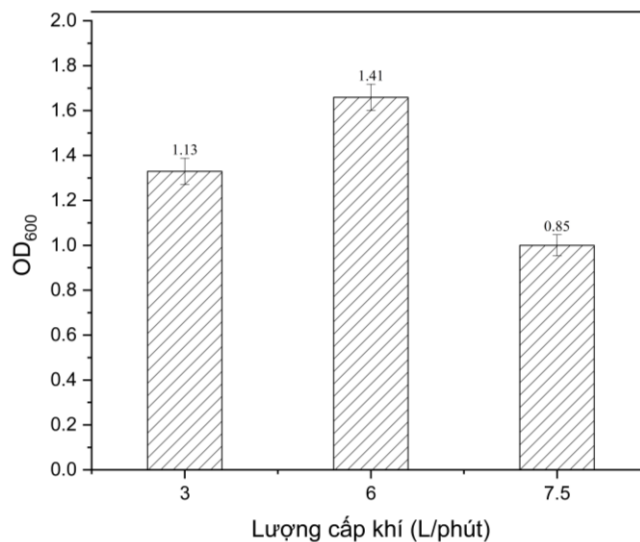
chấp nhận được. Do đó điều kiện 30°C và pH 7,5 được lựa chọn cho sản xuất do ổn định, giảm chi phí kiểm soát nhiệt và pH và tăng độ bền tế bào trong quá trình bảo quản sau lên men.

3.2.7 Ảnh hưởng của các điều kiện lên men ở quy mô 7 lít/mẻ

3.2.7.1 Ảnh hưởng tốc độ thổi khí.

Lượng cấp khí ảnh hưởng đến việc cung cấp oxy và chất dinh dưỡng cho vi sinh vật, tạo điều kiện thuận lợi cho sự sinh trưởng của chúng

Chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường thích hợp sử dụng thiết bị lên men 10 lít với lượng không khí sục vào được kiểm soát và dao động từ 3 đến 7,5 L khí/L môi trường/phút. Mật độ tế bào thu được ở các mức cấp khí khác nhau được sử dụng làm cơ sở để xác định điều kiện cấp khí tối ưu cho chủng. Kết quả được thể hiện ở hình 3.16.



Hình 3.16. Ảnh hưởng lượng cấp khí đến mật độ tế bào

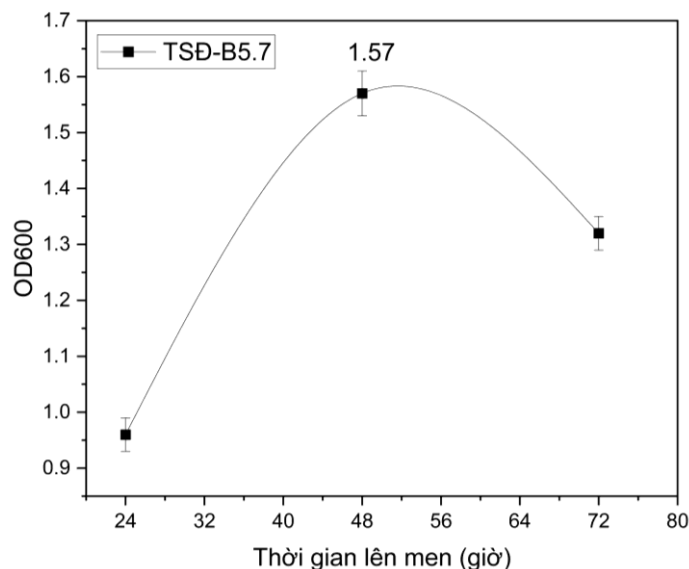
Hình 3.16 cho thấy sau ở tỷ lệ cấp khí 3-6 lít/phút, mật độ tế bào các chủng đều tăng dần, tuy nhiên khi tăng tới 7,5 lít/phút cho thấy mật độ tế bào của chủng VK giảm dần theo. Lựa chọn lượng cấp khí là 6 lít/phút.

3.2.7.2 Ảnh hưởng của thời gian lên men.

Thời gian nuôi cấy đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng phát triển của các chủng vi sinh vật. Vì vậy, để thu được mật độ tế bào cao nhất của các chủng nghiên cứu cần tìm ra thời gian nuôi cấy thích hợp. Thời gian thích hợp sẽ đảm bảo lượng sinh khối thu được cao nhất, đồng thời tránh việc kéo dài thời gian nuôi cấy không cần thiết, gây lãng phí kinh tế và giảm mật độ tế bào. Tiến hành lên men

thu hồi sinh khối chủng vi khuẩn TSD-B5.7 trên môi trường đã lựa chọn. Khảo sát thời gian lên men ở 24, 48, 72 giờ.

Xác định mật độ tế bào gián tiếp bằng phương pháp đo OD₆₀₀ tại khoảng thời gian 24, 48, 72 giờ để xác định thời điểm thu sinh khối tế bào cao nhất. Kết quả thể hiện tại hình 3.17.



Hình 3.17. Ảnh hưởng thời gian lên men

Hình 3.17 cho thấy sau 48 giờ, mật độ tế bào của chủng đạt mức cao nhất, đến ngày thứ 3 mật độ tế bào chủng có xu hướng giảm. Lựa chọn thời gian lên men là 48 giờ với chủng chủng vi khuẩn TSD-B5.7.

3.2.8. Nghiên cứu lên men thu sinh khối chủng vi khuẩn *Pseudomonas putida* TSD – B5.7 chịu mặn phân giải phosphate

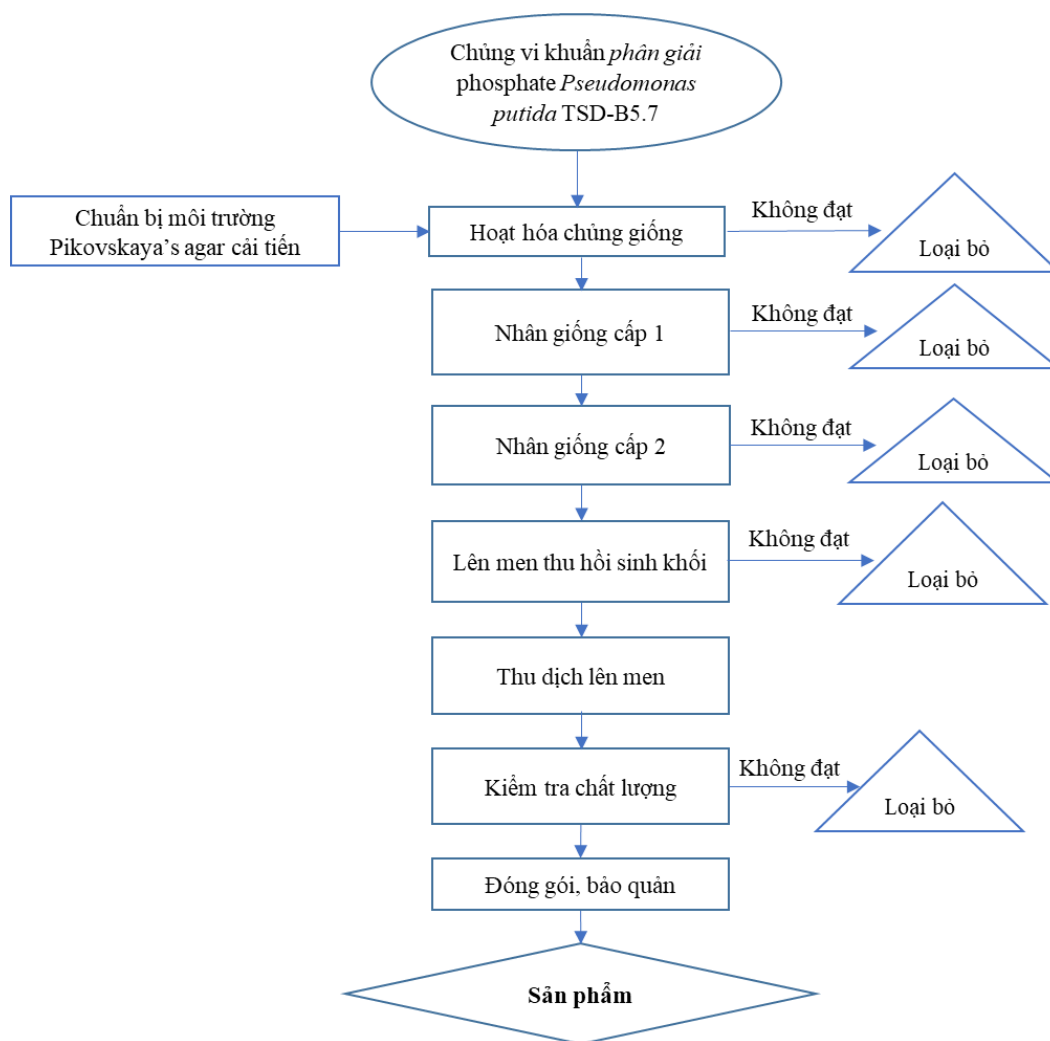
3.2.8.1 Yêu cầu cần đạt

- Dựa vào kết quả khảo sát môi trường và các điều kiện nuôi cấy chủng TSD-B5.7 quy mô bình tam giác, Quy trình lên men để thu sinh khối từ chủng *Pseudomonas putida* TSD-B5.7 đã được thiết lập.

- Được sản xuất ở dạng dịch thể.
- Quy mô sản xuất: Quy mô Pilot.

3.2.8.2 Quy trình lên men thu sinh khối chủng vi khuẩn chịu mặn

Sơ đồ quy trình



Hình 3.18. Sơ đồ quy trình lên men thu sinh khối chủng vi khuẩn chịu mặn phân giải phosphate

Thuyết minh quy trình

Công đoạn 1: Kiểm tra chủng giống vi khuẩn

- Chủng vi khuẩn chịu mặn phân giải phosphate: *Pseudomonas putida* TSD-B5.7

Các chủng mang đầy đủ các đặc tính phân giải phosphate được nghiên cứu, phân loại và lưu giữ chủng giống.

Công đoạn 2: Hoạt hóa chủng giống

- Chuẩn bị môi trường hoạt hóa:

+ Môi trường hoạt hóa chủng phân giải phosphate Pikovskaya's agar cải tiến (g/L): Cân 2,5 g Glucose; 1,25 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 0,125 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,05 g KCl; 0,025 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 mg MnSO_4 ; 0,5 mg FeSO_4 ; 0,125 g Cao nấm men; 5,0 g NaCl; 5,0 g agar vào cốc thủy tinh 500 mL.

- Chủng vi khuẩn được bảo quản ở lạnh -80°C được hoạt hóa và kiểm tra lại độ thuần chủng bằng cách cấy rìa trên đĩa thạch chứa môi trường đặc trưng của chủng.

- Các đĩa được nuôi trong tủ ấm ở 30 °C trong 48 giờ và theo dõi sự phát triển của các khuẩn lạc trong đĩa.

- Quan sát các đĩa đảm bảo các chủng được hoạt hoá có khuẩn lạc thuần khiết, không bị nhiễm tạp. Lựa chọn khuẩn lạc đặc trưng theo mô tả cấy chuyển sang đĩa môi trường mới.

Kiểm tra hình thái khuẩn lạc màu sắc, các đặc điểm đặc trưng giống với khuẩn lạc gốc.

- Hình thái khuẩn lạc (Hình 3.19 A): Khuẩn lạc tròn, màu trắng đục, mép không nhẵn, sau 48 giờ nuôi cấy bắt đầu tạo vòng phân giải trên môi trường

- Hình thái tế bào (Hình 3.19 B): Hình que ngắn, xếp chuỗi, Gram (-)



A



B

Hình 3.19. A. Hình thái khuẩn lạc của chủng TSD-B5.7 sau 48 giờ cấy trên môi trường Pikovskaya's agar; B Hình thái tế bào chủng TSD-B5.7 dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 1000 lần.

Công đoạn 3: Kiểm tra hoạt tính sinh học

- Chuẩn bị môi trường

+ Môi trường hoạt tính sinh học chủng phân giải phosphate (g/L): Glucose – 10; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – 5; KCl – 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 5; NaCl – 20; pH 7,5)

- Dùng que cấy đầu vòng, chuyển 1 khuẩn lạc của chủng giống đã hoạt hóa vào môi trường 20 mL dịch thể lỏng đặc trưng. Đặt nuôi ở 30°C trong 72 giờ, lắc 200 vòng/phút.

- Kiểm tra hoạt tính chủng giống:

+ Kiểm tra hoạt tính phân giải phosphate: Dịch nuôi cấy chủng VK PGP được ly tâm loại bỏ sinh khối. Lấy 1mL dịch lên men cho vào 99 mL nước khử ion để tạo dịch pha loãng 1/100. Xác định hàm lượng $(\text{PO}_4)^{3-}$ trong dịch pha loãng bằng Kit test API phosphate $(\text{PO}_4)^{3-}$ và tính hàm lượng $(\text{PO}_4)^{3-}$ trong dịch lên men theo hệ số pha loãng.

Công đoạn 4: Nhân giống cấp 1

- *Môi trường nhân giống cấp 1:*

Chuẩn bị môi trường cấp 1 của chủng vi khuẩn PGP

- **Đối với chủng VK PGP:** Dùng que cấy đầu vòng, chuyển 1 vòng que cấy khuẩn lạc của chủng vi khuẩn TSD-B5.7 vào 1 bình môi trường nhân giống cấp 1. Đặt trong máy lắc ổn nhiệt 180 vòng/phút, ở nhiệt độ 30 °C, thời gian 16 giờ.

Kiểm tra chất lượng:

- Dịch sau nhân giống cấp 1 được soi dưới kính hiển vi để kiểm tra độ đồng nhất của tế bào, hình dạng, kích thước so với giống chủng gốc. Nếu có hiện tượng nhiễm tạp loại bỏ và tiến hành nhân giống lại.

- Đo OD₆₀₀ dịch nhân giống cấp 1 của các chủng sau 16 giờ nhân giống: OD₆₀₀ ≥ 0,8 là đạt yêu cầu giống cấp 1, OD₆₀₀ < 0,8 cần tiến hành nhân giống lại.

- Dịch giống cấp 1 sau khi kiểm tra đảm bảo các yêu cầu kỹ thuật được sử dụng để tiếp giống vào bình môi trường nhân giống cấp 2.

Công đoạn 5: Nhân giống cấp 2

Chủng giống vi khuẩn sau khi được nhân giống cấp 1, được sử dụng cho quá trình nhân giống cấp 2

- Hút 3,0 mL dịch nhân giống cấp 1 (5 %) của các chủng vào bình môi trường nhân giống cấp 2 (mỗi chủng 3 bình). Đậy kín bằng nút bông.

- Lắc chế độ 200 vòng/phút, ở 30 °C trong 24 giờ.

Kiểm tra chất lượng:

- Dịch sau nhân giống cấp 1 được soi dưới kính hiển vi để kiểm tra độ đồng nhất của tế bào, hình dạng, kích thước tế bào so với giống chủng gốc. Nếu có hiện tượng nhiễm tạp loại bỏ và tiến hành nhân giống lại.

- Đo OD₆₀₀ dịch nhân giống cấp 2 của các chủng sau 24 giờ nhân giống: OD₆₀₀ ≥ 1 là đạt yêu cầu giống cấp 2, OD₆₀₀ < 1 cần tiến hành nhân giống lại.

- Dịch giống cấp 2 sau khi kiểm tra đảm bảo các yêu cầu kỹ thuật được sử dụng để tiếp giống vào bình lên men thu sinh khối.

Công đoạn 6: Lên men thu sinh khối

Chuẩn bị môi trường lên men thu sinh khối:

- **Đối với chủng VK PGP:** Chuẩn bị 7 lít môi trường lên men PK cho chủng vi khuẩn phân giải phosphate: (Thành phần (g/L) saccharose - 20; cao nấm men - 10; (NH₄)₂SO₄ - 1; MgSO₄.7H₂O - 0,1; Ca₃(PO₄)₂ - 5; KCl - 0,2; MgCl₂.6H₂O - 5, NaCl - 20; pH 7,5)

- Rót 7 L môi trường vào thiết bị lên men 10 L, khử trùng ở 121 °C, áp suất 1atm, trong 20 phút, sau đó làm nguội môi trường đến 30 °C để chuẩn bị tiếp giống

Lên men thu hồi sinh khối:

- Tiếp 350 mL dịch giống cấp 2 (5 %) vào 7 L môi trường đã chuẩn bị trong thiết bị lên men 10 L sau khi làm nguội về 30 °C và lên men.

Điều kiện vận hành lên men:

- Tiến hành trong thiết bị lên men với khuấy 150 vòng/phút, chế độ sục khí được cấp 6 lít/phút, nhiệt độ 30 °C thời gian lên men 48 giờ.



Hình 3.20. Hình ảnh lên men nhân sinh khối trên thiết bị lên men 10 L

Công đoạn 7: Thu nhận dịch lên men

Kiểm tra dịch lên men

- Kiểm tra dịch lên men không có váng hay nấm mốc tạp nhiễm được đánh giá là đạt.

- Đo OD₆₀₀ dịch lên men của chủng vi khuẩn sau 48 giờ nhân giống tiến hành pha loãng 2 lần để đạt mật độ tế bào khi đo OD₆₀₀ ≥ 1 (tương ứng mật độ tế bào $\geq 1 \times 10^9$ CFU/mL) đảm bảo yêu cầu, Dịch lên men được thu nhận.

Sau đó bổ sung CMC 5 % (w/v) vào dịch lên men thu nhận từ quá trình lên men. Hỗn hợp thu nhận ở dạng dịch sệt có màu trắng đục, ánh nâu.

Công đoạn 8: Đóng gói và bảo quản

Sản phẩm dạng dịch sệt của chủng vi khuẩn TSD-B5.7 đạt mật độ yêu cầu, được đóng gói trong can 30 lít và bảo quản ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng trong 03 tháng, số lượng vi sinh vật đạt mật độ $\geq 10^7$ CFU/ml.

3.3. Thử nghiệm đánh giá được hiệu quả làm tăng hàm lượng phosphate hữu hiệu trên đất cát san hô

3.3.1. Ảnh hưởng của vi sinh vật phân giải phosphate đến sinh trưởng của cây rau mồng tơi

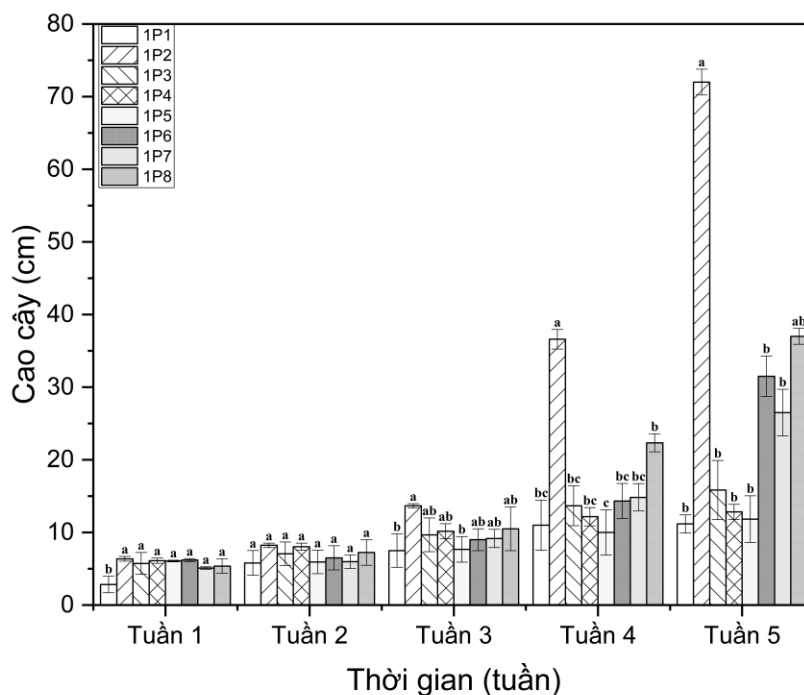
Phospho (P) được xem là một trong ba dưỡng chất khoáng quan trọng nhất đối với sự sinh trưởng của cây trồng đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát triển rễ, phân hóa mô và hình thành chất hữu cơ có năng lượng cao như ATP, ADP. Tuy nhiên, phospho trong đất thường tồn tại ở dạng khó tan, khó hấp thu. Việc sử dụng vi sinh vật phân giải phosphate là giải pháp sinh học giúp chuyển hóa phosphate khó tan thành dạng dễ tiêu, từ đó tăng hiệu quả sử dụng phân lân và cho phép giảm lượng phân bón mà vẫn đảm bảo sinh trưởng.



Hình 3.21. Ảnh hưởng của vi sinh vật phân giải phosphate đến sinh trưởng của cây rau mồng tơi tại thời điểm tuần thứ 5

Chiều cao cây

Kết quả theo dõi chiều cao cây qua 5 tuần biểu thị sự khác nhau rõ ràng giữa các nghiệm thức đặc biệt ở tuần thứ 4 và thứ 5.



Hình 3.22. Ảnh hưởng của chủng vi khuẩn phân giải phosphate đến chiều cao của cây rau mồng tơi

(Kí tự ở các công thức chỉ sự sai khác ở mức tin cậy 95% giữa các công thức thí nghiệm ở cùng thời điểm theo dõi; thanh sai số biểu hiện sai số mẫu SE)

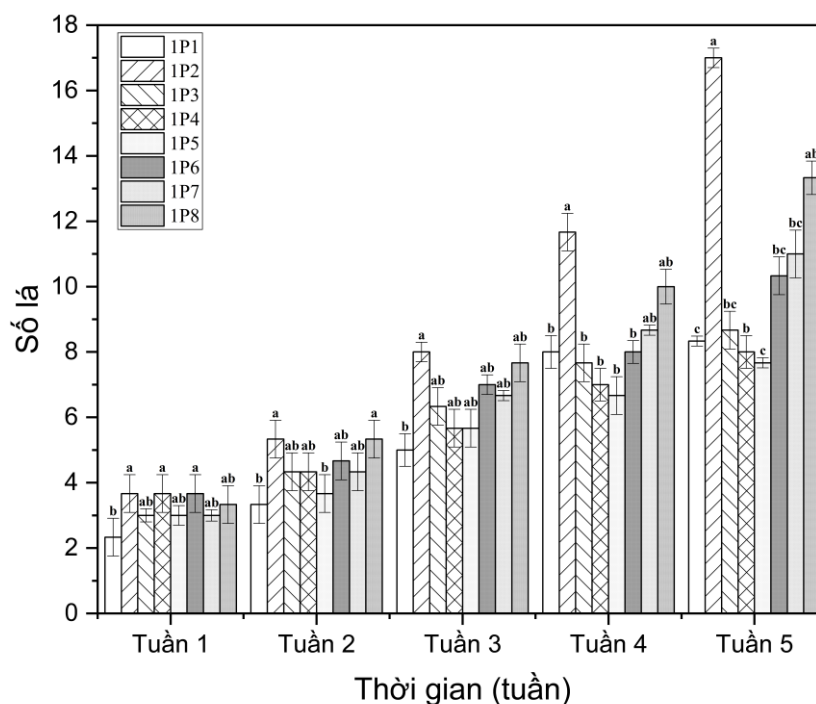
Các nghiệm thức được bổ sung vi khuẩn phân giải phosphate (từ 1P3 đến 1P8) đều cho thấy sự tăng trưởng chiều cao vượt trội so với nghiệm thức đối chứng âm (1P1 - không bón phosphate, không có vi khuẩn). Điều này khẳng định vai trò tích cực của vi khuẩn trong việc cung cấp dinh dưỡng lân cho cây.

Thí nghiệm 1P8 (cát san hô sau cải tạo + mật độ vi khuẩn 10^8 CFU/mL) cho thấy hiệu quả tốt nhất, đạt 37 cm. Các nghiệm thức còn lại đều cho thấy kết quả khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê so với mẫu chứng âm (1P1) sau 5 tuần.

Việc sử dụng nền đất cát san hô sau cải tạo (nghiệm thức 1P6, 1P7, 1P8) cho kết quả tốt hơn rõ rệt so với chỉ sử dụng cát san hô thông thường (1P3, 1P4, 1P5). Điều này cho thấy việc sử dụng đất sau cải tạo đã tạo môi trường thuận lợi hơn cho cả vi khuẩn hoạt động và cây phát triển.

Khả năng ra lá

Kết quả theo dõi số lá cây qua 5 tuần cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa các nghiệm thức.



Hình 3.23. Ảnh hưởng của chủng vi khuẩn phân giải phosphate đến khả năng ra lá của cây rau mồng tơi

(Kí tự ở các công thức chỉ sự sai khác ở mức tin cậy 95% giữa các công thức thí nghiệm ở cùng thời điểm theo dõi; thanh sai số biểu hiện sai số mẫu SE)

Ở cây rau ăn lá, số lá và diện tích lá là những chỉ tiêu quan trọng phản ánh trực tiếp sức sinh trưởng và tiềm năng tạo năng suất của cây tại thời điểm thu hoạch. Các kết quả trên Hình 3.23 thể hiện xu hướng tăng đều của số lá theo thời gian, đặc biệt nổi bật ở các thí nghiệm 1P6, 1P7 và 1P8. Việc sử dụng cát san hô đã được cải tạo đã cung cấp nguồn dinh dưỡng giúp tạo môi trường phát triển vi sinh vật có lợi, giúp cây phát triển mạnh mẽ hơn, từ đó làm gia tăng tốc độ hình thành lá.

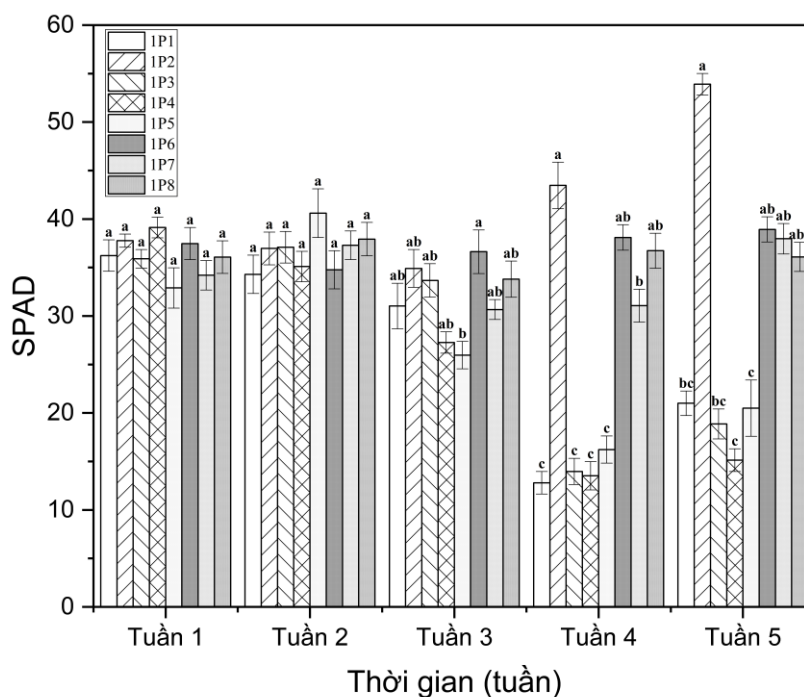
Ngược lại, các công thức đối chứng (1P1 – cát san hô và 1P3 tới 1P4) có tốc độ ra lá thấp hơn rõ rệt. Điều này cho thấy đất cát san hô với độ tơi xốp cao nhưng nghèo dinh dưỡng và giữ nước kém không đủ đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng cho cây phát triển bình thường.

Tác dụng của vi sinh vật cũng được ghi nhận ở các công thức 1P3 - 1P8, tuy nhiên, mức tăng số lá do chủng vi sinh vật mang lại không khác biệt rõ ràng so với đối chứng dương cho thấy hiệu quả chính vẫn đến từ nền giá thể hữu cơ phối trộn.

Chỉ số điện lục SPAD

Kết quả phân tích cho thấy nghiệm thức cát san hô không có vi sinh vật và không được bón phân lân cho thấy giá trị SPAD dao động mạnh và không ổn định, từ mức

thấp 12,8 đến 36,2 trong suốt quá trình, với sự khác biệt thống kê không rõ rệt. Điều này phản ánh rằng cây trong nền giá thể không được bổ sung dinh dưỡng sẽ khó duy trì mức diệp lục ổn định, và hiệu quả quang hợp sẽ bị ảnh hưởng.



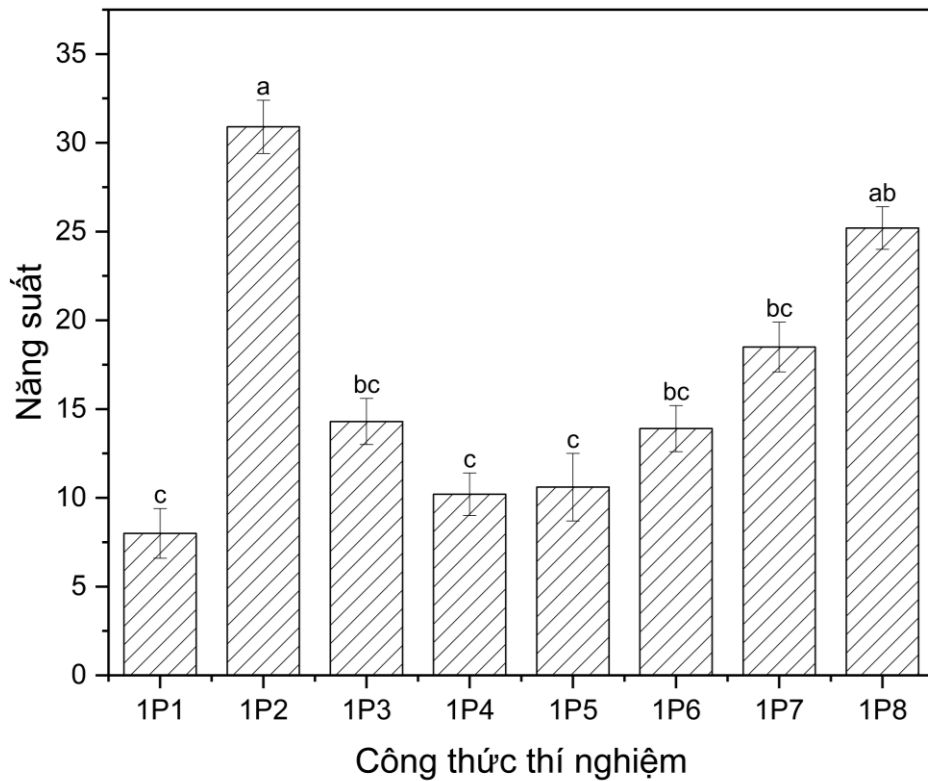
Hình 3.24. Ảnh hưởng của chủng vi khuẩn phân giải phosphate đến chỉ số SPAD của cây rau mồng tơi

(Kí tự ở các công thức chỉ sự sai khác ở mức tin cậy 95% giữa các công thức thí nghiệm ở cùng thời điểm theo dõi; thanh sai số biểu hiện sai số mẫu SE)

Tại tuần thứ 5, nghiệm thức 1P2 có chỉ số SPAD cao vượt trội (53,9), khác biệt có ý nghĩa thống kê so với tất cả các nghiệm thức trên nền cát chưa cải tạo và đối chứng âm. Các nghiệm thức trên giá thể cải tạo, cụ thể là **1P6** (38,93) và **1P7** (37,97), duy trì được chỉ số SPAD ở mức cao và không khác biệt thống kê so với 1P2. Ngược lại, các nghiệm thức **1P1** (21), **1P3** (18,87), **1P5** (20,5) và đặc biệt là **1P4** (15,13) đều có chỉ số SPAD khá thấp.

Năng suất

Kết quả cho thấy, nghiệm thức đối chứng Cát SH – không bón phân và không có vi sinh vật đạt năng suất thấp nhất chỉ 8 g/cây thể hiện rõ sự thiếu hụt nghiêm trọng về dinh dưỡng. Tương tự nghiệm thức 1P3 - 1P5 – có bổ sung vi sinh vật nhưng trên nền cát san hô cho năng suất cũng khá thấp và khác biệt không có ý nghĩa thống kê với đối chứng âm.



Hình 3.25. Ảnh hưởng của chủng vi khuẩn phân giải phosphate đến năng suất của cây rau mồng tơi

(Kí tự ở các công thức chỉ sự sai khác ở mức tin cậy 95% giữa các công thức thí nghiệm ở cùng thời điểm theo dõi; thanh sai số biểu hiện sai số mẫu SE)

Đáng chú ý hơn, các nghiệm thức trên nền cát cải tạo đều cho năng suất cao hơn đối chứng âm. Các nghiệm thức trên giá thể cải tạo, cụ thể là **1P8** (25,2) duy trì được chỉ số ở mức cao và không khác biệt thống kê so với 1P2.

Việc không khác biệt về ý nghĩa thống kê giữa nghiệm thức này cho thấy rằng việc không sử dụng phân bón phosphate hoàn toàn không ảnh hưởng đến năng suất khi có sự hiện diện của vi sinh vật phân giải phosphate. Đây là minh chứng rõ ràng cho thấy vi sinh vật đã giúp phân giải phosphate từ nguồn khó tan trong môi trường.

Từ các kết quả trên, có thể khẳng định rằng: vi sinh vật phân giải phosphate có khả năng nâng cao năng suất cây trồng một cách rõ rệt trên nền cát san hô, ngay cả khi không bón phân hóa học. Thí nghiệm cung cấp bằng chứng khoa học mạnh mẽ về khả năng ứng dụng của vi sinh vật trong nông nghiệp sinh thái đặc biệt trong điều kiện đất nghèo dinh dưỡng và hệ sinh thái ven biển hoặc trên đảo.

3.3.2 Thay đổi hàm lượng Phosphate trong đất trồng cây

Bảng 3.6. Sự thay đổi hàm lượng P trong đất trồng rau mồng tơi

Công thức	Tổng P (%, ngày 0) (1)	Tổng P (%, sau thu hoạch) (2)	Tổng P chuyển hóa được (3)	P dễ tiêu (%, ngày 0) (4)	Lượng P dễ tiêu còn lại trong đất (%, sau thu hoạch) (5)	Lượng P dễ tiêu cây hấp thụ được (6) [6 = (3+4) – 5
Đối chứng âm	0,11	0,013	0,1	0,008	0,07499	0,03
Đối chứng dương	0,21	0,03	0,18	0,006	0,0804	0,11
Công thức thí nghiệm 1	0,18	0,032	0,15	0,012	0,082836	0,08
Công thức thí nghiệm 2	0,14	0,03	0,11	0,023	0,084808	0,05
Công thức thí nghiệm 3	0,16	0,04	0,12	0,03	0,077872	0,07
Công thức thí nghiệm 4	0,33	0,064	0,27	0,042	0,084842	0,23
Công thức thí nghiệm 5	0,43	0,073	0,36	0,053	0,084534	0,33
Công thức thí nghiệm 6	0,4	0,081	0,32	0,051	0,082149	0,3

Sau khi bố trí thí nghiệm, mẫu đất được thu tại hai thời điểm: ban đầu (trước khi gieo trồng) và sau thu hoạch (tuần thứ 5) nhằm phân tích hàm lượng P tổng số và P dễ tiêu. Kết quả phân tích được trình bày trong Bảng 3.6. Theo số liệu ở bảng này, tại công thức đối chứng âm (không bổ sung $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ và dịch nuôi cấy vi khuẩn), hàm lượng P dễ tiêu mà cây có thể hấp thụ đạt mức thấp nhất, chỉ khoảng 0,03%. Ngược lại, ở các công thức thí nghiệm khác, giá trị P dễ tiêu hấp thụ được của cây đều cao hơn so với đối chứng âm. Cụ thể, ở các nghiệm thức từ 1 đến 6, lượng P dễ tiêu hấp thụ được lần lượt như sau: 0,08; 0,05; 0,07; 0,23; 0,33 và 0,3 %. Sự thay đổi trên chứng minh rằng sau khi đất được bổ sung chủng vi khuẩn, các hợp chất phosphate khó tan đã được phân giải, giải phóng phospho ở dạng dễ tan như axit phosphoric và các muối hòa tan, giúp cây trồng dễ hấp thụ hơn. Các dạng phosphate này trở thành nguồn dinh dưỡng để cây trồng hấp thụ và phát triển sinh khối, đặc biệt ở công thức được phối trộn thêm giá thể cũng cho thấy khả năng hấp thụ của cây cũng

cao hơn so với chỉ có cát san hô không.

Kết quả phân tích P tổng số cho thấy một xu hướng giảm dần ở hầu hết các công thức thí nghiệm sau giai đoạn thu hoạch so với ban đầu. Cụ thể, các giá trị "Tổng P %, sau thu hoạch)" (cột 2) thường thấp hơn so với "Tổng P %, ngày 0)" (cột 1). Điều này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trước đây về chu trình dinh dưỡng trong đất, đặc biệt là trong hệ thống có sự tham gia của cây trồng. Lượng P tổng số giảm được giải thích là do P trong đất đã được chuyển hóa thành các dạng dễ tiêu và sau đó được cây trồng hấp thụ để xây dựng sinh khối. Quá trình này tạo nên sự dịch chuyển phosphate từ đất sang sinh khối thực vật, dẫn đến sự suy giảm hàm lượng P tổng số trong đất sau một chu kỳ canh tác.

Với kết quả P dễ tiêu trong mẫu ban đầu trước trồng cây thấp hơn sau thu hoạch có thể được giải thích rằng trong mẫu ban đầu quá trình chuyển hóa phosphate không tan thành phosphate dễ tiêu bởi hoạt động của vi sinh vật trong đất chưa hiệu quả.

Ở các tuần kế tiếp do đã ổn định dần các điều kiện tốc độ phân giải và chuyển hóa phosphate khó tan thành dạng dễ tiêu bởi các chủng vi khuẩn được bổ sung nhanh hơn do đó lượng P dễ tiêu trong đất có thể tăng lên. Điều này đã chứng minh vai trò của chủng vi khuẩn trong việc phân giải P khó tan thành nguồn P mà cây có khả năng hấp thụ.

3.4 Thử nghiệm đánh giá sự phát triển của một số loài rau xanh khi sử dụng độc lập chế phẩm vi sinh vật phân giải Phosphate.

3.4.1 Ảnh hưởng của vi khuẩn và môi trường đất lên khả năng nảy mầm của hạt.

Bảng 3.7. Theo dõi tỉ lệ nảy mầm trên hạt rau cải

Thời gian (h)	Tỉ lệ nảy mầm				
	M1	M2	M3	M4	M5
24	11,11 ^d	11,11 ^d	28,89 ^a	13,33 ^d	14,44 ^{cd}
48	21,11 ^{de}	35,56 ^b	41,11 ^a	25,56 ^{cd}	28,89 ^c
72	31,11 ^{cd}	37,78 ^{abc}	43,33 ^a	33,33 ^{bcd}	30 ^d
96	37,78 ^c	41,11 ^{bc}	44,44 ^{ab}	45,56 ^{ab}	48,89 ^a
121	42,22 ^b	47,78 ^{ab}	48,89 ^a	51,11 ^a	51,11 ^a
145	52,22 ^{bc}	51,11 ^{bc}	56,67 ^{abc}	54,44 ^{abc}	55,56 ^{abc}
169	54,44 ^{de}	55,56 ^{cde}	64,44 ^{ab}	61,11 ^{bc}	57,78 ^{cde}

Kết quả đánh giá tác động của 5 loại môi trường bao gồm dung dịch đất và dịch nuôi vi khuẩn tới tỉ lệ nảy mầm của hạt rau cải được thể hiện trên Bảng 3.7. Cho thấy, sau 7 ngày thí nghiệm, môi trường cấp đủ ẩm thì sẽ tạo điều kiện tốt cho hạt nảy mầm.

Trong đó, có thể thấy các thí nghiệm M3 đạt tỉ lệ hạt nảy mầm ở mức cao. Đối chiếu với thí nghiệm đối chứng âm M1 có sự chênh lệch tỉ lệ từ 3,34 % - 13,34 %, đối với các mẫu M4 - M5. So với thí nghiệm có đối chứng dương (M2), cũng ghi nhận các mẫu M3 - M4 - M5 có tỉ lệ nảy mầm cao hơn từ 2,22 % - 12,22 %

Tại thí nghiệm đánh giá hạt nảy mầm trên dịch đất cải tạo (Trước và sau canh tác), tỉ lệ hạt nảy mầm có sự biến động nhẹ khi tăng ở trước vụ canh tác và giảm đi ở sau vụ canh tác. Cụ thể, tại thí nghiệm trên dịch đất Trước canh tác (M3), tỉ lệ hạt nảy mầm đạt 64,44%, trong khi đó, Sau canh tác (M4), tỉ lệ hạt nảy mầm chỉ đạt 61,11%. Có thể thấy rằng sự chênh lệch dinh dưỡng giữa thời điểm trước canh tác và sau canh tác cũng ảnh hưởng tới khả năng nảy mầm của hạt. Kết quả này cũng đưa ra phương hướng cải thiện dinh dưỡng của đất trước khi tiến hành vào vụ canh tác tiếp theo trong tương lai.

Tại các thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn tới khả năng nảy mầm của hạt, có thể thấy chủng vi khuẩn cho kết quả tỉ lệ nảy mầm cao. Cụ thể chủng TSD-B5.7 (M5) cho tỉ lệ nảy mầm đạt 56,67 %. So với đối chứng âm là mẫu M1, độ chênh lệch của tỉ lệ nảy mầm nằm trong khoảng 3,34 %. Tuy có sự khác biệt nhưng tỉ lệ nảy mầm có thể không mang lại sự chênh lệch quá lớn, do vậy cần xét tới số lượng hạt nảy mầm dựa trên các mốc thời gian trong thí nghiệm.

Tại 24h. Mẫu M1 đạt mức 11,11 %, mẫu M2 đạt mức 11,11 %. Mẫu M5 đạt 14,44 %. Có thể thấy vào ngày đầu tiên, sức nảy mầm của các hạt chưa đồng đều.

Tại 48h. Mẫu M1 đạt mức 21,11 %, mẫu M2 đạt 35,56 %. Mẫu M5 – 28,89 %. Có thể thấy có sự gia tăng mạnh về tỉ lệ nảy mầm ở thí nghiệm M5, tăng từ 13,34 % lên 28,89 %. Ngày thứ hai ghi nhận sự thay đổi đáng kể về tỉ lệ nảy mầm, qua đó có thể nhận định rằng cần thời gian để quan sát sự kích thích của dịch nuôi vi khuẩn tới sức nảy mầm của hạt.

Tại 72h. Mẫu M1 đạt mức 31,11 %, mẫu M2 đạt mức 37,78 %. Quan sát tại thời điểm 72h, ta có thể thấy sự chững lại của tỉ lệ nảy mầm mẫu M5 chỉ đạt 30 %.

Tại 96h. Mẫu M1 đạt mức 37,78 %, mẫu M2 đạt mức 41,11 %. Thí nghiệm M5 tại thời điểm 96h có sự tăng mạnh về tỉ lệ nảy mầm. Mẫu M5 đạt tỉ lệ 48,89 %. Qua quan sát, có thể thấy khoảng thời gian 96h là thời điểm mẫu M9 tăng mạnh về tỉ lệ nảy mầm (xét từ khoảng thời gian 24h tới các mốc thời gian về sau). Tỉ lệ nảy mầm tăng 18,89 %.

Tại 121h tới 145h. trên tất cả các mẫu ghi nhận sự tăng nhẹ về tỉ lệ nảy mầm. Mẫu M1 vẫn giữ tỉ lệ tăng 10 %, các mẫu M2 - M5 có tỉ lệ nảy mầm tăng trong khoảng 3,33 % - 5,56 %.

Tại 196h. Tại thời điểm cuối thí nghiệm. Mẫu M5 đạt tỉ lệ nảy mầm 57,78 %. Đối chiếu với hai mẫu đối chứng M1 có tỉ lệ nảy mầm 54,44 % và M2 có tỉ lệ nảy mầm 55,56 %. Nhìn chung mẫu thí nghiệm trên dịch nuôi vi khuẩn có mức tỉ lệ nảy mầm cao hơn so với hai mẫu đối chứng. Tỉ lệ nảy mầm chênh lệch hơn trong khoảng 3,34 % khi đối chiếu với M1. Tỉ lệ nảy mầm chênh lệch hơn trong khoảng 2,22 % khi đối chiếu với M2.

Tổng kết cả quá trình, mẫu M1 và M2 là hai mẫu đối chứng có mức tăng tỉ lệ nảy mầm ổn định qua các thời điểm khảo sát. Mẫu M5 có hai đợt tăng mạnh về tỉ lệ nảy mầm là khoảng 24h - 48h và 72h - 96h, có tỉ lệ nảy mầm đợt cuối thí nghiệm đạt 57,78 %. Có thể giải thích rằng, lượng vi khuẩn tiếp xúc trong hạt có thể tác động theo khoảng thời gian khác nhau.

3.4.2 Hiệu quả cải tạo đất qua thực tế trồng thử nghiệm rau cải

Canh tác rau màu trên đất cát san hô ven biển gặp nhiều hạn chế do đặc tính đất nhẹ, dễ bị rửa trôi, nghèo dinh dưỡng và khả năng giữ nước kém. Những yếu tố này khiến cây sinh trưởng chậm, năng suất thấp và thiếu ổn định qua các vụ. Vì vậy, việc áp dụng các biện pháp cải tạo đất bằng giải pháp sinh học kết hợp với vật liệu hữu cơ được xem là hướng tiếp cận triển vọng nhằm khôi phục độ phì nhiêu và nâng cao hiệu quả sản xuất. Trong nghiên cứu này, cây rau cải – loại rau ngắn ngày và nhạy cảm với điều kiện ngoại cảnh – được lựa chọn trồng thử nghiệm trên ba nền đất: cát san hô, cát san hô đã cải tạo và đất Đầm Báy (làm đối chứng dương) tại Trạm nghiên cứu thử nghiệm biển Đầm Báy. Rau được thu hoạch sau 30-35 ngày sinh trưởng trong mô hình trồng thử nghiệm. Việc so sánh các chỉ tiêu sinh trưởng như chiều dài lá, chiều rộng lá, số lá và năng suất qua ba vụ liên tiếp là cơ sở để đánh giá hiệu quả thực tế của công thức cải tạo đất đề xuất.





Hình 3.26. Hình ảnh rau cải và mồng tơi tại thời điểm thu hoạch

Các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển của rau cải qua các vụ được trình bày cụ thể trong bảng 3.8 sau:

Bảng 3.8. Các chỉ tiêu sinh trưởng của rau cải sử dụng độc lập chế phẩm vi khuẩn phân giải phosphate

Chỉ tiêu Tên mẫu	NĂng suất (kg/m ²)			Dài lá (cm)			Rộng lá (cm)			Số lá (lá)		
	Vụ 1	Vụ 2	Vụ 3	Vụ 1	Vụ 2	Vụ 3	Vụ 1	Vụ 2	Vụ 3	Vụ 1	Vụ 2	Vụ 3
Đất cát san hô cải tạo + bộ chế phẩm	2,69 ± 0,1	2,66± 0,2	2,37± 0,2	34,5 ^a ± 1,7	33,2 ^a ± 0,9	31,1 ^a ± 0,5	24,5 ^a ± 1,9	22,4 ^a ± 0,2	18,8 ^a ± 0,2	12,5 ^a ± 0,5	11,3 ^a ± 0,6	10,0 ^a ± 1,0
Đất cát san hô cải tạo + VSV PGP (Thử nghiệm)	1,55 ± 0,2	1,30 ± 0,1	0,95 ± 0,2	28,5 ^{bc} ± 2,0	26,1 ^{bc} ± 1,5	23,4 ^{bc} ± 1,8	13,2 ^b ± 1,1	11,5 ^b ± 0,9	10,1 ^b ± 0,8	11,0 ^a ± 1,0	10,4 ^a ± 0,5	9,3 ^a ± 0,7
Cát san hô	1,1± 0,1	0,98± 0,3	0,35± 0,3	24,7 ^c ± 4,5	23,8 ^c ± 0,7	21,0 ^c ± 1,0	9,8 ^b ± 1,3	9,7 ^b ± 1,5	9,5 ^b ± 0,6	10,7 ^a ± 1,5	10,0 ^a ± 0,0	9,0 ^a ± 1,0
Đất Đàm Bảy	2,63± 0,3	2,57± 0,2	2,23± 0,25	34,8 ^a ± 1,0	33,0 ^a ± 0,8	29,9 ^{ab} ± 0,3	25,5 ^a ± 2,2	24,8 ^a ± 1,6	22,1 ^a ± 1,1	9,7 ^a ± 1,1	9,2 ^a ± 0,5	8,0 ^a ± 1,0

Kết quả trình bày trong Bảng 3.8 cho thấy các chỉ tiêu sinh trưởng và năng suất của rau cải trên ba loại nền đất có sự khác biệt đáng kể, đặc biệt rõ giữa đất cát san hô chưa cải tạo và đất cát san hô sau cải tạo. Trong đó, chiều dài và chiều rộng lá được xem là những thông số quan trọng, phản ánh trực tiếp mức độ phát triển của mô lá, đồng thời liên quan mật thiết đến khả năng quang hợp và hiệu quả hấp thu ánh sáng của cây.

Qua ba vụ trồng liên tiếp, rau cải trồng trên đất cát san hô cải tạo bằng bộ chế phẩm đầy đủ duy trì giá trị chiều dài lá trung bình lần lượt là 34,5 cm, 33,2 cm và 31,1 cm. Các giá trị này cao hơn đáng kể so với đất cát san hô (24,7 cm, 23,8 cm và 21,0 cm) và tương đương với đất Đầm Báy. Tương tự, chiều rộng lá trên đất cải tạo toàn diện đạt lần lượt 24,5 cm, 22,4 cm và 18,8 cm, vượt trội so với đất cát san hô (chỉ dao động trong khoảng 9,5 - 9,8 cm). Trong khi đó, đất cải tạo chỉ sử dụng VSV phân giải phosphate (Thử nghiệm) cho thấy sự cải thiện tuy nhiên vẫn thấp hơn so với việc sử dụng bộ chế phẩm đầy đủ với chiều dài lá đạt 28,5 cm, 26,1 cm và 23,4 cm và chiều rộng lá là 13,2 cm, 11,5 cm và 10,1 cm qua ba vụ.

Sự vượt trội này được lý giải từ hiệu quả của các thành phần cải tạo đất đã được sử dụng. Chế phẩm vi sinh vật sinh màng nhầy (EPS) đóng vai trò trung tâm với khả năng giữ nước cao và tạo mạng lưới liên kết giữa các hạt cát rời rạc, từ đó tăng khả năng giữ ẩm, ổn định nguồn nước trong đất và giảm stress hạn cho cây. Nhờ đó, rau cải trồng trên đất cải tạo có điều kiện sinh trưởng thuận lợi hơn, thể hiện qua kích thước lá lớn và ổn định hơn qua các vụ. Đồng thời, sự hiện diện của chế phẩm vi sinh vật hữu ích chịu mặn trong công thức cải tạo còn góp phần cải thiện thành phần dinh dưỡng của đất thông qua các hoạt động sinh học như cố định nitơ, phân giải phosphate, cellulose và chuyển hóa các chất khó hấp thu thành dạng cây dễ sử dụng. Điều này giúp cây được cung cấp nguồn dinh dưỡng liên tục và đầy đủ hơn, kích thích phát triển các mô phân sinh từ đó tăng cả kích thước lá và số lượng lá.

Bên cạnh đó, giá thể hữu cơ trong công thức cải tạo đóng vai trò như một nguồn cung cấp chất hữu cơ bền vững, giúp tăng độ phì đất, tăng khả năng giữ nước và cải thiện cấu trúc đất. Các chất hữu cơ này cũng tạo điều kiện lý tưởng cho sự phát triển của hệ vi sinh vật có lợi, giúp kích thích hệ rễ phát triển, tăng khả năng hấp thu dinh dưỡng của cây. Việc kết hợp với bentonite – một khoáng sét có khả năng giữ nước và dinh dưỡng tốt – càng làm tăng hiệu quả cải tạo. Bentonite giúp tăng cường khả năng trao đổi cation, giữ lại các dưỡng chất trong vùng rễ, đồng thời duy trì độ ẩm ổn định trong đất, giúp rau cải phát triển liên tục và chống chịu tốt hơn trước điều kiện bất lợi ngoài môi trường.

Chỉ số số lá trung bình cũng phản ánh rõ hiệu quả cải tạo. Rau cải trồng trên rau cải trồng trên đất cát san hô cải tạo sử dụng bộ chế phẩm đầy đủ có số lá lần lượt là 12,5; 11,3 và 10 lá/cây trong ba vụ, cao hơn so với rau trồng trên đất cát san hô (10,7; 10,0; 9,0 lá/cây) và vượt cả đất Đầm Báy ở vụ 1 và 2 (9,7; 9,2; 8,0 lá/cây). Với đất cải tạo chỉ sử dụng VSV PGP cho số lá trung bình (11,0; 10,4; 9,3 lá/cây), cao hơn đất cát san hô ở hai vụ đầu nhưng vẫn thấp hơn so với công thức cải tạo có sử dụng bộ chế phẩm đầy đủ.

Điều này cho thấy không chỉ khả năng sinh trưởng mà sức sống tổng thể của cây cũng được cải thiện rõ rệt nhờ sự phối hợp đồng bộ giữa các chế phẩm sinh học và vật liệu cải tạo trong công thức cải tiến.

Về năng suất, rau cải trồng trên đất cát san hô cải tạo đạt trung bình 2,69 kg/m² ở vụ 1, 2,66 kg/m² ở vụ 2 và 2,37 kg/m² ở vụ 3 – cao nhất trong cả ba nền đất. Trong khi đó, đất Đầm Báy cho năng suất gần tương đương nhưng thấp hơn một chút ở cả ba vụ (2,63; 2,57; 2,23 kg/m²). Ngược lại, rau trồng trên đất cát san hô chưa cải tạo có năng suất rất thấp (1,1; 0,98; 0,35 kg/m²), đặc biệt giảm mạnh ở vụ 3, cho thấy sự suy kiệt nhanh chóng của nền đất nghèo dinh dưỡng nếu không được cải tạo. Đáng chú ý, với đất thử nghiệm chỉ sử dụng VSV PGP cho năng suất ở mức khá (1,55; 1,30; 0,95 kg/m²), cao hơn đáng kể so với đất cát san hô - cụ thể ở vụ 1 cao hơn khoảng 1,4 lần (1,55 so với 1,1 kg/m²) nhưng vẫn chỉ bằng khoảng 58% so với đất được cải tạo bằng bộ chế phẩm hoàn chỉnh.

Như vậy việc thử nghiệm độc lập VSV PGP cho kết quả tốt hơn đất cát san hô: Đất cát san hô có đặc tính nghèo dinh dưỡng. Chủng vi sinh vật phân giải phosphate (PGP) khi được bổ sung vào đất đã hoạt động, chuyển hóa các hợp chất Photpho khó tan thành dạng ion phosphate dễ hấp thu cho cây. Photpho là một trong những dưỡng chất đa lượng thiết yếu, có vai trò quan trọng trong việc phát triển bộ rễ, quá trình quang hợp và vận chuyển năng lượng. Việc cung cấp nguồn Photpho hữu hiệu này đã giúp cây trồng trên lô thử nghiệm phát triển tốt hơn hẳn so với cây trên nền cát trơ, nghèo dinh dưỡng ban đầu.

Tuy nhiên so với đất có sử dụng đầy đủ bộ chế phẩm mặc dù cải thiện được yếu tố dinh dưỡng photpho, việc thử nghiệm độc lập VSV PGP vẫn cho năng suất và các chỉ tiêu sinh trưởng kém xa. Nguyên nhân là vì công thức cải tạo đầy đủ mang lại một giải pháp tổng hợp, có tính cộng hưởng, giải quyết đồng thời nhiều hạn chế của đất cát: Hạn chế về vật lý và giữ ẩm: Chế phẩm vi sinh vật sinh màng nhầy (EPS) và bentonite tạo ra một mạng lưới kết dính các hạt cát, tăng khả năng giữ nước và chất dinh dưỡng vượt trội. Việc thử nghiệm độc lập VSV PGP không có các thành phần này, do đó đất vẫn bị rửa trôi dinh dưỡng và giữ nước kém.

Hạn chế về dinh dưỡng tổng thể: Bộ chế phẩm đầy đủ còn chứa các vi sinh vật hữu ích khác (cố định nitơ, phân giải cellulose) và giá thể hữu cơ, tạo ra nguồn dinh dưỡng đa dạng và bền vững cho cây. Việc thử nghiệm độc lập VSV PGP chỉ tập trung vào photpho, không giải quyết được tình trạng thiếu hụt các chất dinh dưỡng khác.

Như vậy, có thể kết luận việc chỉ sử dụng một tác nhân sinh học đơn lẻ như VSV PGP là chưa đủ để khắc phục toàn diện các nhược điểm của đất cát san hô. Hiệu

quả vượt trội của bộ chế phẩm đầy đủ đến từ sự kết hợp của các giải pháp cải tạo cả về vật lý, hóa học và sinh học của đất.

3.4.3. Hiệu quả cải tạo đất qua thực tế trồng thử nghiệm rau mồng tơi

Mồng tơi là loại rau leo được trồng phổ biến tại các hộ gia đình vùng ven biển và hải đảo, có tốc độ sinh trưởng nhanh nhưng đòi hỏi đất có khả năng giữ ẩm và giàu dinh dưỡng để đạt năng suất tối ưu.



Hình 3.27. Hình ảnh rau mồng tơi tại thời điểm thu hoạch

Kết quả các chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển của rau mồng tơi được thể hiện ở Bảng 3.9 sau:

Bảng 3.9. Các chỉ tiêu sinh trưởng của rau mồng tơi

Chỉ tiêu Tên mẫu	Năng suất (kg/m ²)			Dài lá (cm)			Rộng lá (cm)			Số lá (lá)		
	Vụ 1	Vụ 2	Vụ 3	Vụ 1	Vụ 2	Vụ 3	Vụ 1	Vụ 2	Vụ 3	Vụ 1	Vụ 2	Vụ 3
Đất cát san hô cải tạo + bộ chế phẩm	1,75 ± 0,1	1,56± 0,2	1,38± 0,1	20,6 ^a ± 3,2	19,8 ^a ± 1,3	16,5 ^a ± 1,0	16,0 ^a ± 1,7	14,4 ^a ± 1,8	10,5 ^a ± 1,0	25,3 ^a ± 2,5	23,7 ^a ± 3,8	19,3 ^a ± 0,6
Đất cát san hô cải tạo + VSV PGP (Thử nghiệm)	0,88 ± 0,1	0,71 ± 0,1	0,52 ± 0,05	12,5 ^{bc} ± 1,5	10,8 ^{bc} ± 1,0	8,9 ^{bc} ± 0,8	8,1 ^{bc} ± 0,9	6,9 ^{bc} ± 0,7	5,5 ^{bc} ± 0,6	15,1 ^{bc} ± 2,0	13,5 ^{bc} ± 1,8	10,2 ^{bc} ± 1,5
Cát san hô	0,35 ± 0,1	0,295± 0,01	0,18± 0,02	7,2 ^c ± 2,5	6,5 ^c ± 0,5	5,0 ^c ± 0,5	4,8 ^c ± 1,0	4,2 ^c ± 0,2	3,1 ^c ± 0,5	11,0 ^c ± 1,7	9,7 ^c ± 1,2	6,3 ^c ± 1,5
Đất Đầm Báy	1,77 ± 0,1	1,58± 0,2	1,34± 0,1	17,0 ^{ab} ± 1,0	16,8 ^{ab} ± 0,9	14,7 ^{ab} ± 1,0	13,0 ^{ab} ± 1,0	12,2 ^{ab} ± 0,3	10,3 ^{ab} ± 0,8	19,7 ^{ab} ± 2,1	18,7 ^{ab} ± 5,5	18,0 ^{ab} ± 2,0

Kết quả Bảng 3.9 cho thấy tất cả các chỉ tiêu sinh trưởng và năng suất của rau cải đều có sự khác biệt rõ rệt giữa ba loại nền đất. Đáng chú ý, các chỉ tiêu trên đất cát san hô sau cải tạo luôn đạt giá trị cao hơn so với đất cát san hô và tiem cận, thậm chí vượt nhẹ so với đất Đầm Báy.

Về chiều dài lá, rau mồng toi trồng trên đất cải tạo có chiều dài trung bình đạt 20,6 cm (vụ 1), 19,8 cm (vụ 2) và 16,5 cm (vụ 3), cao gấp gần 3 lần so với cây trồng trên cát san hô (7,2 cm; 6,5 cm; 5,0 cm) và nhỉnh hơn đất Đầm Báy (17,0 cm; 16,8 cm; 14,7 cm). Chiều rộng lá cũng phản ánh tương tự, với giá trị lần lượt đạt 16,0 cm; 14,4 cm và 10,5 cm trên đất cải tạo, vượt trội so với đất cát (4,8 cm; 4,2 cm; 3,1 cm), trong khi đất Đầm Báy đạt lần lượt 13,0; 12,2 và 10,3 cm. Trong khi đó, với đất thử nghiệm chỉ dùng VSV PGP cũng cho thấy sự cải thiện với chiều dài lá đạt 12,5 cm, 10,8 cm, 8,9 cm và số lá đạt 15,1, 13,5, 10,2 lá/cây. Dù các chỉ số này tốt hơn đất cát san hô, tuy nhiên vẫn thấp hơn đáng kể so với công thức cải tạo sử dụng bộ chế phẩm.

Số lá trung bình trên cây mồng toi trồng đất cải tạo qua các vụ đạt lần lượt 25,3; 23,7 và 19,3 lá/cây – cao hơn đáng kể so với đất cát san hô (11,0; 9,7; 6,3 lá) và cao hơn cả đất Đầm Báy (19,7; 18,7; 18,0 lá/cây).

Về năng suất, đất cải tạo cho kết quả cao nhất cả ba vụ: 1,75; 1,56 và 1,38 kg/m², xấp xỉ với đất Đầm Báy (1,77; 1,58; 1,34 kg/m²), nhưng cao gấp 4 -5 lần so với đất cát san hô (0,35; 0,295; 0,18 kg/m²). Đối với thử nghiệm độc lập VSV PGP cho năng suất (0,88; 0,71; 0,52 kg/m²) cao hơn so với đất cát san hô, cụ thể là cao hơn từ 2,4 đến 2,9 lần (ví dụ, 0,88 kg/m² so với 0,35 kg/m² ở vụ 1). Tuy nhiên, năng suất này vẫn chỉ bằng khoảng 50 % so với thí nghiệm sử dụng bộ chế phẩm đầy đủ. Một lần nữa nhấn mạnh tầm quan trọng của các yếu tố cải tạo vật lý đất.

Như vậy qua các kết quả so sánh hiệu quả cải tạo đất trồng rau cải và mồng toi giữa công thức sử dụng chế phẩm chỉ chứa chủng *Pseudomonas putida* TSD-B5.7 và bộ chế phẩm đa thành phần cho thấy các chỉ tiêu sinh trưởng và năng suất của cây rau cải và mồng toi ở các nghiệm thức sử dụng VSV PGP thấp hơn khoảng 40-50%. Tuy nhiên, sự khác biệt này cần được xem xét trong bối cảnh mục tiêu và điều kiện triển khai của đề tài.

Trong giai đoạn thực hiện luận văn, các thí nghiệm được tiến hành song song với tiến độ của đề tài “**Nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học để cải tạo cát san hô thành đất canh tác bằng màng sinh học Polysaccharide, vật liệu kết dính bentonite và vi sinh vật hữu ích**”. Do yêu cầu về sự đồng bộ về thời gian, mẫu đất và quy trình thí nghiệm giữa hai hướng nghiên cứu, cùng với giới hạn về thời gian và nguồn lực, đề tài này chỉ có thể bố trí được các công thức so sánh trực tiếp với bộ chế phẩm của đề tài. Việc lựa chọn hình thức đối chứng như vậy nhằm đảm bảo tính tương

thích về điều kiện và quy trình thực nghiệm, đồng thời tạo cơ sở so sánh thực tế giữa chủng đơn lẻ và tổ hợp vi sinh vật đang được phát triển song song trong cùng hệ thống nghiên cứu.

Cách bố trí này giúp đánh giá tương đối tiềm năng của chủng vi khuẩn *P. putida* TSD-B5.7 trong bối cảnh ứng dụng thực tế, đồng thời vẫn đáp ứng tiến độ và phạm vi đề tài được giao.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Đối với chủng vi khuẩn chịu mặn phân giải Phosphate *Pseudomonas putida* TSD-B5.7 đã lựa chọn được môi trường PK cải tiến với các thành phần (g/L): Saccharose 20; cao nấm men 10; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5; KCl 0,2; $\text{MgCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5; NaCl 20; Nhiệt độ 30°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút, pH 7,5 với tỷ lệ tiếp giống 5% và thời gian nuôi cấy 48 giờ, thì cho khả năng sinh trưởng tốt đạt 5.9×10^9 (CFU/mL) tương ứng với OD₆₀₀ đạt 1,5.
2. Đã nghiên cứu tối ưu điều kiện lên men thu sinh khối chủng vi khuẩn chịu mặn phân giải phosphate được, mô hình đã xác định được các tham số tối ưu như sau: pH= 6,8 nhiệt độ là 33,8 °C, trong thời gian 47,3 giờ, khi đó giá trị OD thu được tối đa là 1,56. Từ đó thiết lập quy trình lên men để thu sinh khối từ chủng vi khuẩn chịu mặn phân giải phosphate.
3. Đánh giá được hiệu quả chuyển hóa phosphate trên nền đất cát san hô: Hàm lượng $\text{P}_2 \text{O}_5$ dễ tiêu trong đất cát san hô ban đầu đạt 0,008%, sau khi xử lý bằng chủng vi khuẩn đạt 0,042 - 0,053% tương ứng tăng gấp 5,25 - 6,63 lần so với đối chứng ban đầu. Các chỉ tiêu sinh trưởng của cây rau mồng tơi trên nền đất xử lý vi sinh vật đều cao hơn rõ rệt so với đối chứng, trong đó chiều cao trung bình đạt 23,7 cm (tăng 60,1%), số lá trung bình 8,9 lá/cây (tăng 58,9%), chỉ số SPAD 34,8 (tăng 55,4%) pH đất được duy trì ổn định trong khoảng 6,6–6,8, cho thấy chủng vi khuẩn hoạt động hiệu quả và không gây biến động bất lợi đến môi trường đất.
4. Đánh giá được hiệu quả chuyển hóa phosphate trên nền đất cát san hô: Hàm lượng $\text{P}_2 \text{O}_5$ dễ tiêu trong đất cát san hô ban đầu đạt 0,008 %, sau khi xử lý bằng chủng vi khuẩn đạt 0,042 - 0,053% tương ứng tăng gấp 5,25 - 6,63 lần so với đối chứng ban đầu. Các chỉ tiêu sinh trưởng của cây rau mồng tơi trên nền đất xử lý vi sinh vật đều cao hơn rõ rệt so với đối chứng, trong đó chiều cao trung bình đạt 23,7 cm (tăng 60,1 %), số lá trung bình 8,9 lá/cây (tăng 58,9 %), chỉ số SPAD 34,8 (tăng 55,4 %) pH đất được duy trì ổn định trong khoảng 6,6 - 6,8, cho thấy chủng vi khuẩn hoạt động hiệu quả và không gây biến động bất lợi đến môi trường đất.

KIẾN NGHỊ

1. Tiến hành thử nghiệm và đánh giá thêm về khả năng chuyển hóa phosphate của chủng vi khuẩn trên đất ở quy mô thực nghiệm hiện trường.
2. Nghiên cứu xác định mật độ vi khuẩn tồn tại trong đất trước và sau canh tác, mức cải thiện cấu trúc đất và khả năng tích lũy phosphate sau 2-3 chu kỳ canh tác để làm rõ hơn vai trò và hiệu quả thực tế của chủng vi khuẩn *Pseudomonas putida* TSD-B5.7.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Trần Anh Tuấn ,2014, Nghiên cứu đặc điểm cảnh quan các đảo nổi san hô quần đảo Trường Sa, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Biển*, 14(3), p238–245.
- [2] Zhang Y., et al., 2018, Effects of microbial crusts on soil properties in arid desert regions: A case study in Gurbantunggut Desert. *Catena*, 169, 70–77.
- [3] Vessey J. K., 2003. Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biofertilizers, *Plant and Soil*, 255(2), 571–586.
- [4] Munns R., & Tester M., 2008, Mechanisms of salinity tolerance, *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.
- [5] Nguyễn Thị Bích Thủy, Trần Thị Thúy Hạnh, & Trần Thị Bích Thủy, 2020, Đánh giá khả năng chịu mặn của một số giống lúa ST triển vọng ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 18(1), 57-65.
- [6] Flowers T. J., & Colmer T.D., 2008, Salinity tolerance in halophytes, *New Phytologist*, 179(4), 945-963.
- [7] Qadir M., Wichelns D., Raschid-Sally L., McCornick P. G., Drechsel P., Nelson D., & Sharma B. R., 2007, Agricultural water management in water-scarce regions: The case of salt-affected lands, *Irrigation and Drainage Systems*, 21(1), 1-19.
- [8] Glick B. R., 2014, Bacteria with plant probiotic properties are an emerging and important means of enhancing plant growth, *Scientifica*, 2014, 1-13.
- [9] Nguyễn Kiều Băng Tâm, 2018, *Nghiên cứu ứng dụng nấm men Lipomyces để cải tạo đất và tăng cường sinh trưởng cây trồng*, Báo cáo khoa học, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.
- [10] Nguyễn Kiều Băng Tâm, Lê Thành Phong & Đặng Thị Ngân, 2019, Ảnh hưởng của chế phẩm nấm men *Lipomyces* lên đặc tính hóa lý đất và sinh trưởng cây chè, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 17(3), 321-329.
- [11] Zahran H. H, 1999, Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid environment, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4), 968-989.

- [12] Sharma S. B., Sayyed R. Z., Trivedi M. H., & Gobi T. A., 2013, Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(1), 587.
- [13] Prajapati K., Sharma N., & Sharma M., 2013, Potassium solubilizing bacteria: A novel approach for sustainable agriculture, *International Journal of Environmental Protection*, 3(1), 1-5.
- [14] Kumar P., & Singh R.K., 2020, Microbial exopolysaccharides: A new paradigm for sustainable agriculture, *Journal of Basic Microbiology*, 60(11), 897-909.
- [15] Nguyễn Thu Hà, Phạm Thị Thúy, & Nguyễn Thị Thanh Huyền, 2021, Hiệu quả của chế phẩm vi sinh tổng hợp lên hàm lượng dinh dưỡng đất và năng suất cây lúa trên đất nhiễm mặn. *Tạp chí Khoa học Đất*, 68(2), 75-84.
- [16] Kamerlin S. C. L., Sharma P. K., Prasad R. B., & Warshel A., 2013, Why nature really chose phosphate, *Quarterly Reviews of Biophysics*, 46(01), 1–132.
- [17] Alabama Cooperative Extension System. (2019). *Understanding Phosphorus Forms and Their Cycling in the Soil* (ANR-2535).
- [18] Roberts M. F., 2005, Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms, *Saline Systems*, 1, 5.
- [19] Oren A., 2013, Life at high salt concentrations, intracellular KCl concentrations, and acidic proteomes, *Frontiers in Microbiology*, 4, 314.
- [20] Kunte H.J., Lentzen G., & Galinski E.A., 2002, Industrial production of the compatible solutes ectoine and hydroxyectoine by halophilic bacteria, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(4-5), 409-419
- [21] Yuan S., Li Z., Li B., & Ma H., 2016, *Bacillus* species as potential biocontrol agents against fungal diseases. *Journal of Microbiology*, 54(7), 635-647
- [22] Costa O.Y.A., Raaijmakers J.M., & Kuramae E.E., 2018, Microbial Extracellular Polymeric Substances: Ecological Function and Impact on Soil Aggregation, *Frontiers in Microbiology*, 9, 1636.
- [23] Joyce K., Gordon T.J.W., R.J. Maier, P.E. Bishop, Winston J. Brill, Genetic modification of N₂ fixing bacteria, *Agriculture and Energy*, 1977: p. 353-359.
- [24] Cao Ngọc Diệp, Nguyễn Văn Măng, Lê Thị Diễm Ái, 2010, Hiệu quả của vi khuẩn cố định đạm *Azospirillum lipoferum* và vi khuẩn hòa tan lân

- Pseudomonas stutzeri* trên cây lúa cao sản và độ phì của đất phù sa tỉnh Hậu Giang, *Khoa học Đất*, **34**: p. 84-88.
- [25] Silby M. W., et al., 2011, *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable, *FEMS Microbiology Reviews*, 35(4), 652–680.
- [26] Ventosa A., & Nieto J. J., 1995, *Halophilic microorganisms*, *Critical Reviews in Microbiology*, 21(2), 87–108.
- [27] Paul D., et al., 2013, Salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity in saline soils, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(3), 593–603.
- [28] Egamberdieva D., et al, 2017, Plant growth-promoting bacteria from salinated soils: biodiversity and physiological properties, *Plant and Soil*, 410(1), 245–259.
- [29] Heeb, S., et al., 2005, *Regulation of secondary metabolism in Pseudomonads*, *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 279–310.
- [30] Da Costa M. S., Santos H., & Galinski E. A., 1998, An overview of the role and diversity of compatible solutes in bacteria and archaea, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 61, 117–153.
- [31] Wood J. M., 2011, *Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(2), 234–265.
- [32] Krulwich T. A., et al., 2011, *Bacterial Na⁺/H⁺ antiporters: molecular biology and physiology*, *Nature Reviews Microbiology*, 9(5), 291–302.
- [33] Vreeland R. H., 1987, *Mechanisms of halotolerance in microorganisms*, *Critical Reviews in Microbiology*, 14(4), 311–356.
- [34] Russell N. J., 1989, Adaptive modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganisms, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 21(1), 93–113.
- [35] Raaijmakers J. M., Paulitz T. C., Steinberg C., Alabouvette C., & Moënne-Loccoz Y., 2009, The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms, *Plant and Soil*, 321(1), 341–361.

- [36] Ramos J. L., Duque E., Gallegos M. T., Godoy P., Ramos-González M. I., Rojas, A., ... & Segura A., 2002, *Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria*, *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 743–768.
- [37] Silby M. W., Cerdeno-Tárraga A. M., Vernikos G. S., Giddens S. R., Jackson R. W., Preston G. M., ... & Levy S. B., 2009, Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*, *Genome Biology*, 10(5), R51.
- [38] Sandhya V., Ali S. Z., Grover M., Reddy G., & Venkateswarlu B., 2010, Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress, *Plant Growth Regulation*, 62(1), 21–30.
- [39] Siddikee M. A., Glick B. R., Chauhan P. S., Yim, W. J., & Sa, T., 2011, Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase activity, *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(4), 427–434.
- [40] Nies D. H., 1999, *Microbial heavy-metal resistance*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(6), 730–750.
- [41] Karatan E., & Watnick P., 2009, Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(2), 310–347.
- [42] Kloepper J. W., & Schroth M. N., 1978, Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, 2, 879–882.
- [43] Patten C. L., & Glick B. R., 1996, Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid, *Canadian Journal of Microbiology*, 42(3), 207–220.
- [44] Vessey J. K., 2003, Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers, *Plant and Soil*, 255(2), 571–586.
- [45] Rodríguez H., & Fraga R., 1999, Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion, *Biotechnology Advances*, 17(4-5), 319–339.

- [46] Glick B. R., 1995, The enhancement of plant growth by free-living bacteria, *Canadian Journal of Microbiology*, 41(2), 109–117.
- [47] Silby F. D., et al., 2011, *Pseudomonas* genomics: the genus reimaged. Annual Review of Phytopathology, 49, 137-161.
- [48] Egamberdieva D., et al., 2017, *Pseudomonas* species as a tool to improve plant growth under saline conditions, *Journal of Plant Growth Regulation*, 36(1), 22-31.
- [49] Munns R., & Tester M., 2008, Mechanisms of salinity tolerance, *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.
- [50] Singh R. P., et al., 2015, Alleviation of salt stress in plants by PGPR: current status and future prospects, *Applied Soil Ecology*, 96, 171-182.
- [51] Glick B. R., 2012, Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications, *Scientifica*, 2012.
- [52] Khan M. S., et al., 2009, Phosphate solubilizing microorganisms and their role in plant growth promotion, *Annals of Microbiology*, 59(2), 183-191.
- [53] Johnsen K., et al., 2001, Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas putida*: effect of substrate concentration, temperature, and pH, *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1640-1646.
- [54] Raaijmakers J. M., et al., 2002, Role of phenazines in plant protection by *Pseudomonas fluorescens* 2-79, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(1), 47-51.
- [55] Sharma S. B., & Pandey M., 2007, Optimization of carbon and nitrogen sources for biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens*, *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research*, 2(10), 209-214.
- [56] Zaidi S., et al., 2009, Phosphate solubilizing bacteria: potential for enhanced plant growth and soil fertility, *African Journal of Biotechnology*, 8(15).
- [57] Box G. E., & Behnken D. W., 1960, Some new three level designs for the study of quantitative variables, *Technometrics*, 2(4), 455-475.
- [58] Chung H, et al., 2005, Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea, *Soil Biol. Biochem.*, 37(10), pp.1970-1974.

- [59] Ames B.N., 1966, Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphate, *Methods in Enzymology*, 8, pp.115-118.
- [60] Viện Thổ nhưỡng nông hóa (1998), Sổ tay phân tích đất, nước, phân bón, cây trồng, tập 1, NXB Nông nghiệp Hà Nội.
- [61] Qurashi A. W., & Sabri A. N, 2012, Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress, *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 1183-1191.
- [62] Singh R.P., et al., Isolation and characterization of exopolysaccharides from seaweed associated bacteria *Bacillus licheniformis*, *Carbohydrate Polymers*, 2011, **84**(3): p. 1019–1026.
- [63] Nkoh Nkoh J., et al., An electrokinetic perspective into the mechanism of divalent and trivalent cation sorption by extracellular polymeric substances of *Pseudomonas fluorescens*, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019. **183**: p. 110450.
- [64] Boukhelata N., Taguett F., and Kaci Y., Characterization of an Extracellular Polysaccharide Produced by a Saharan Bacterium *Paenibacillus tarimensis* REG 0201M, *Ann. Microbiol.*, 2019. **69**: p. 93–106.
- [65] Andrew M., and Jayaraman G., Molecular characterization and biocompatibility of Exopolysaccharide produced by moderately Halophilic Bacterium *Virgibacillus dokdonensis* from the Saltern of Kumta Coast, *Polymers*, 2022. **14**(19): p. 3986.
- [66] Maciejewska A., Lugowski C., and Lukasiewicz J., First Report on the *Streptococcus gallolyticus* (S. bovis Biotype I) DSM 13808 Exopolysaccharide Structure, *Int J Mol Sci.*, 2022. **23**(19): p. 11797.
- [67] Binmad S., et al., *Characterization of novel extracellular polymeric substances produced by Bacillus velezensis P1 for potential biotechnological applications.* 2022. **33**(8): p. 2470-2479.
- [68] Madigan M. T., Bender K. S., Buckley D. H., Sattley W. M., & Stahl D. A., 2015, *Brock Biology of Microorganisms* (14th ed.). Pearson Education.
- [69] Madigan M. T., et al., 2015, *Brock Biology of Microorganisms* (14th ed.). Pearson Education.

- [70] Zhu J., Shimizu, K., 2008, Effects of oxygen and agitation on the physiology and metabolism of microorganisms in bioreactors, *Journal of Biotechnology*, 136(1-2), 1–10.
- [71] Gaiind S., & Gaur A. C., 1991, Thermotolerant phosphate-solubilizing microorganisms and their interaction with mungbean. *Plant and Soil*, 133(1), 141–149.
- [72] Shuler M. L., & Kargi F., 2002, *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*, Prentice Hall.
- [73] Singh A., Sharma R. K., & Verma A., 2011, Influence of inoculum size on the growth of bacterial cultures. *Indian Journal of Biotechnology*, 10(3), 367–371.
- [74] Juwon A. A., et al., 2016, Effects of inoculum size on growth kinetics and biomass production of selected bacterial strains. *African Journal of Biotechnology*, 15(18), 697–703.
- [75] Shuler M. L., & Kargi F., 2002, *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. Prentice Hall.
- [76] Stanier R. Y., Palleroni N. J., & Doudoroff M., 1966, The aerobic pseudomonads: a taxonomic study, *Journal of General Microbiology*, 43(2), 159–271.
- [77] Neidhardt F. C., Ingraham J. L., & Schaechter M, 1990, *Physiology of the Bacterial Cell: A Molecular Approach*. Sinauer Associates.
- [78] Díaz-Rodríguez A. M., et al., 2014, Growth kinetics of *Pseudomonas putida* KT2440 in different carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(5), 2253–2262

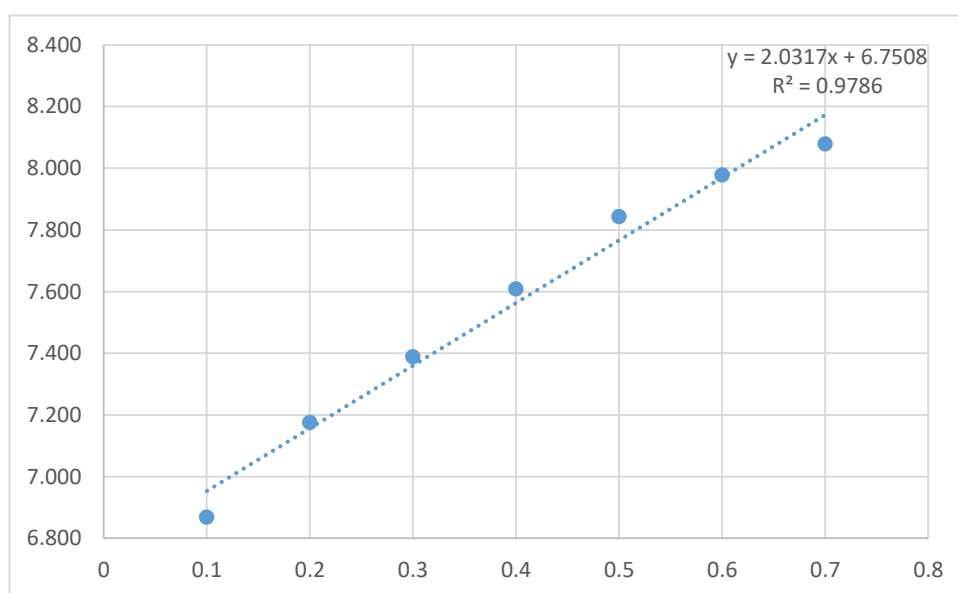
PHỤ LỤC

Phụ lục 1:

Xây dựng đồ thị tương quan giữa OD₆₀₀ và mật độ tế bào

Để xây dựng đường tương quan giữa OD₆₀₀ với mật độ tế bào của chủng *Pseudomonas putida* TSD-B5.7 trên môi trường nuôi cấy PVK, tiến hành xác định mật độ vi khuẩn ở những giá trị đo OD₆₀₀ tương ứng.

OD ₆₀₀	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
Mật độ (CFU/mL)	7,4.10 ⁶	1,5. 10 ⁷	2,45. 10 ⁷	4,06. 10 ⁷	6,98. 10 ⁷	9,51. 10 ⁷	1,2.10 ⁸
log Mật độ (N/mL)	6.869	7.176	7.389	7.609	7.844	7.978	8.079



Hình 4.1. Đường tương quan tuyến tính giá trị OD₆₀₀ với mật độ tế bào vi khuẩn TSD-B5.7 trên môi trường PK

Thực hiện phân tích hồi quy tuyến tính (linear regression) để tìm ra phương trình đường thẳng có dạng: $Y = aX + b$ ($Y = 2.0317X + 6.7508$)

Trong đó:

($Y = \log_{10}(\text{CFU/ml})$; $X = \text{OD}_{600\text{nm}}$; a = Độ dốc của đường thẳng (hệ số góc); b = Điểm cắt trục tung)

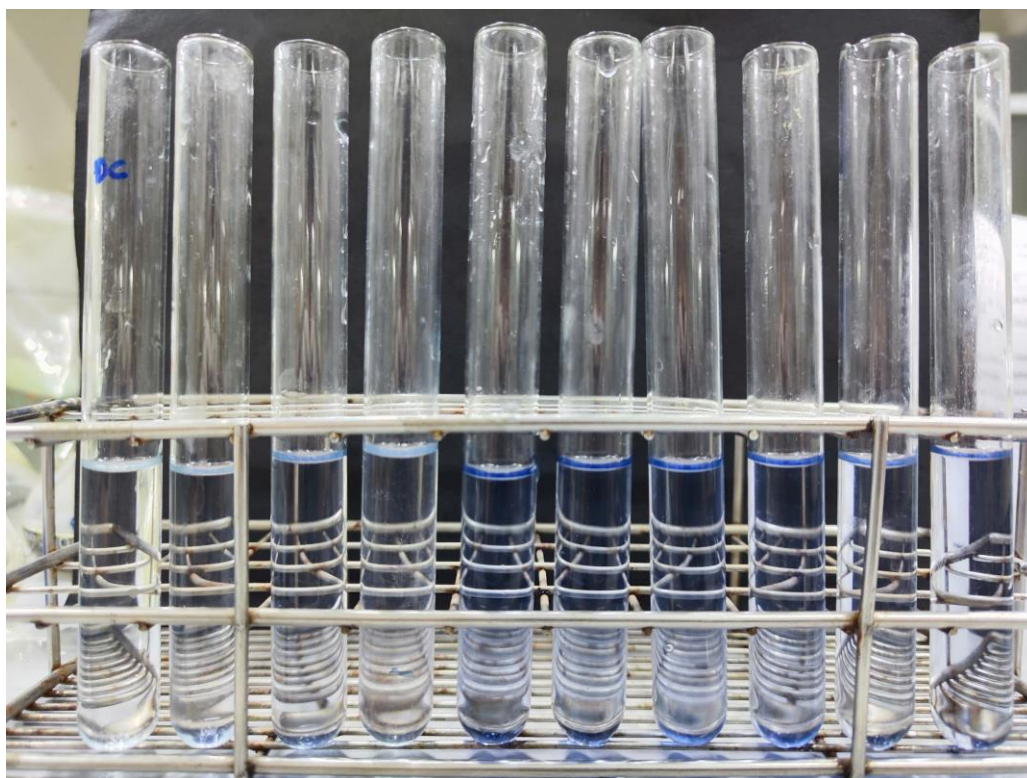
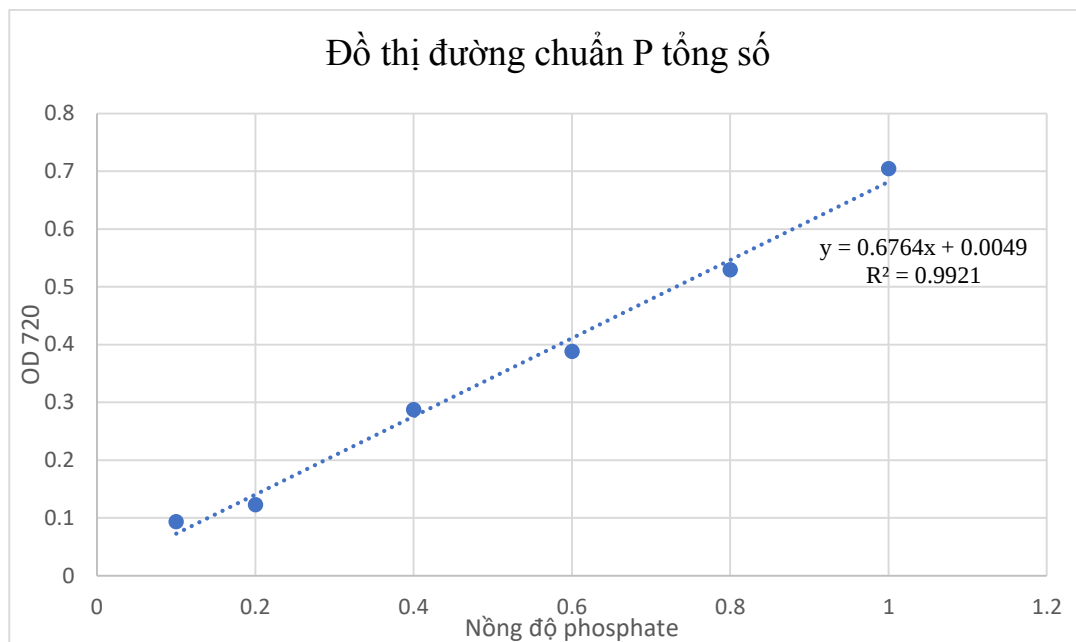
Từ đó thay vào phương trình ta tính được giá trị OD₆₀₀ khi biết mật độ (CFU/mL) và ngược lại.

$$X = \frac{\log_{10}(Y) - 6.7508}{2.0317}$$

(X là giá trị OD₆₀₀; Y là giá trị mật độ (CFU/mL))

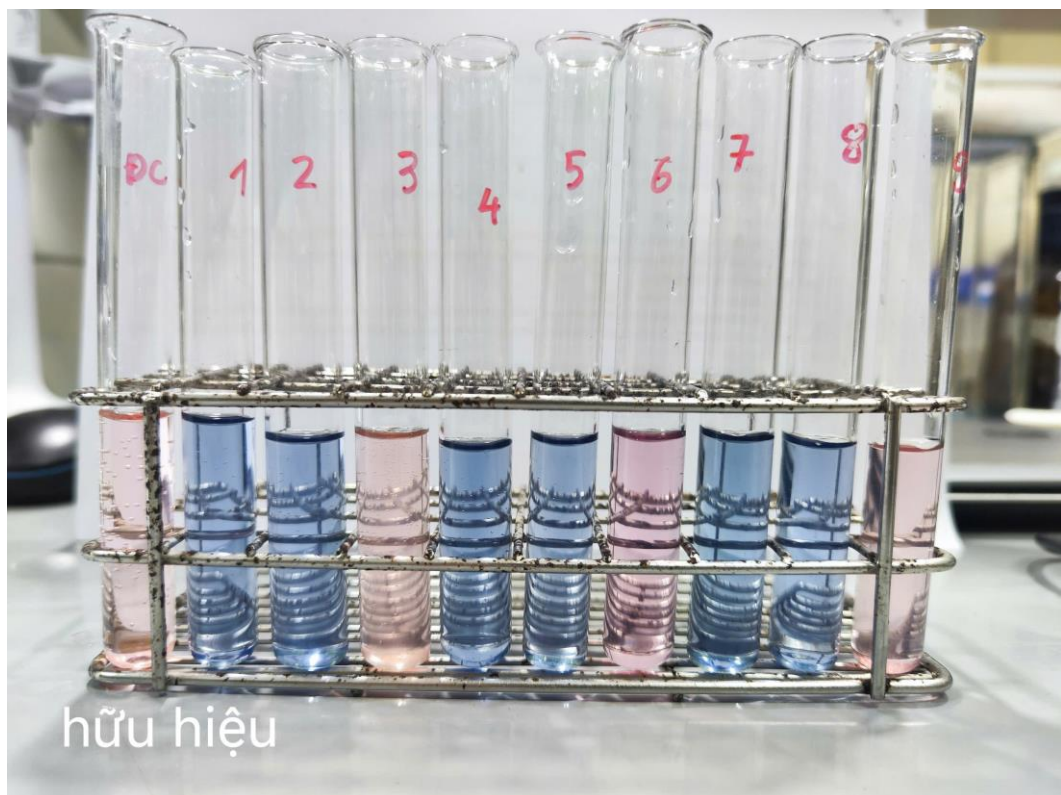
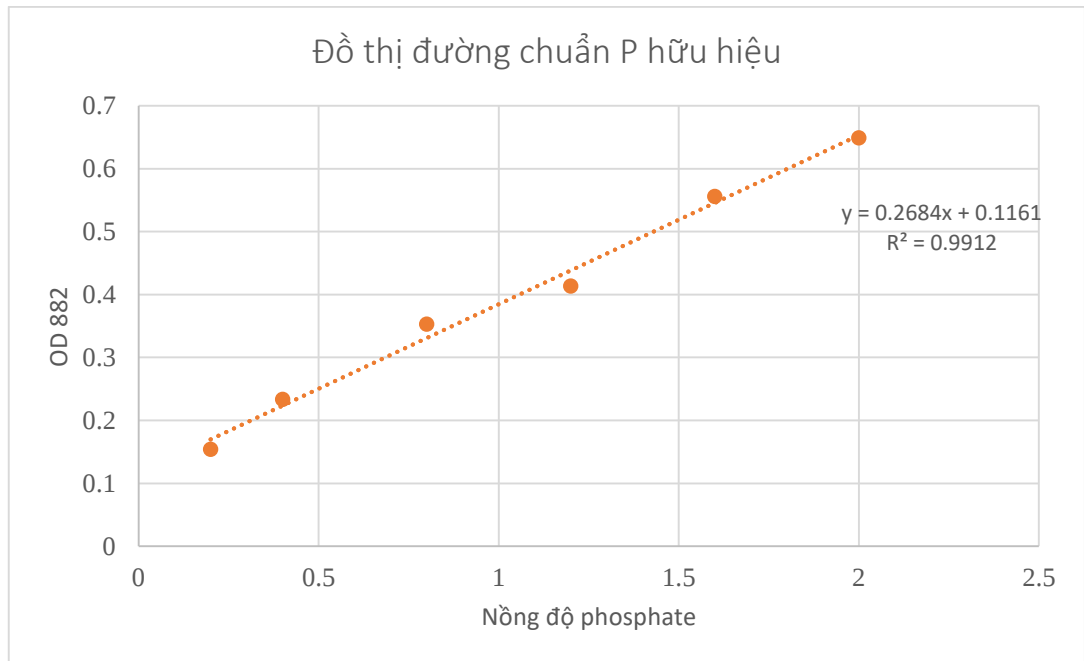
Phụ lục 2:

2.1. Xây dựng đồ thị đường chuẩn Phosphate tổng số



Hình 4.2. Thí nghiệm xây dựng đường chuẩn phosphate tổng số

2.2. Xây dựng đồ thị đường chuẩn Phosphate hữu hiệu



Hình 4.3. Thí nghiệm đánh giá phosphate hữu hiệu trong các mẫu đất

Phụ lục 3: Quá trình theo dõi đánh giá chuyển hóa phosphate của chủng TSD-B5.7 đối với sự phát triển của cây trồng qua 5 tuần.

Thí nghiệm phosphate

Tuần 2



Tuần 3



Tuần 4



Tuần 5

