

XÁC ĐỊNH TÊN VÀ MỘT SỐ ĐIỀU KIỆN SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN CỦA BỐN CHỦNG VI SINH VẬT SỬ DỤNG TRONG CẢI TẠO ĐẤT Ô NHIỄM KIM LOẠI NẶNG (Cu, Pb, Zn)

Phan Quốc Hưng¹, Nguyễn Hữu Thành¹
Lê Như Kiều², Nguyễn Việt Hiệp²

TÓM TẮT

Ô nhiễm kim loại nặng trong đất có thể được gây ra bởi nhiều nguyên nhân nhưng đều để lại những hậu quả khôn lường cho hệ sinh thái và sức khỏe của con người. Xử lý ô nhiễm kim loại nặng bằng biện pháp sinh học thông qua việc lựa chọn một tổ hợp thực vật-vi sinh vật là lợi dụng khả năng của các sinh vật loại bỏ kim loại nặng khỏi đất. Dựa trên các vi sinh vật được phân lập từ mẫu đất ô nhiễm kim loại nặng, đã đánh giá được khả năng chống chịu kim loại nặng là chủng vi khuẩn TB22, chủng nấm mốc TM39, chủng nấm men HY4 và chủng nấm rễ AMF4; việc phân loại được tiến hành theo phương pháp PCR-sequencing (các chủng nấm mốc, nấm men và vi khuẩn) và phương pháp quan sát hình thái bào tử và bảng màu của Morton (chủng nấm rễ). Đã xác định được chủng vi khuẩn là *Bacillus subtilis*, chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, chủng nấm mốc *Gibberella moniliformis*, chủng nấm rễ *Glomus australe*. Kết quả đánh giá đặc tính sinh học cho thấy các chủng vi sinh vật đều thuộc nhóm mọc nhanh (mọc trước 72 giờ), thuộc nhóm vi sinh vật ưa ấm (phát triển mạnh ở khoảng nhiệt độ 30-35°C). Các chủng nấm rễ, vi khuẩn và nấm men thích ứng khoảng pH trung tính (6-7), trong khi đó chủng nấm mốc thích khoảng pH hơi chua (4-5). Khả năng kháng kháng sinh của các chủng khá tốt, tất cả các chủng vẫn mọc được ở mức Streptomycin là 1000 mg/l. Chủng nấm rễ AMF4 có thể xâm nhiễm và cộng sinh với rễ cây hướng dương và mương dứng đạt tỷ lệ 57,64% và 48,37%.

Từ khoá: *Chống chịu, đặc tính sinh học, vi sinh vật, kim loại nặng, ô nhiễm.*

1. BẬT VẤN ĐỀ

Ô nhiễm kim loại nặng trong đất có thể do nhiều nguyên nhân nhưng chủ yếu là do các hoạt động của con người đã thải vào đất các chất thải rắn, nước thải hay khí thải của các hoạt động công nghiệp, giao thông vận tải, các khu dân cư, hóa chất bảo vệ thực vật và phân hoá học,... Tuy nhiên, nhờ khả năng tự làm sạch của đất với vai trò vô cùng to lớn của hệ sinh vật đất trong đó chủ yếu là vi sinh vật và thực vật mà phần lớn đất đai nói chung và đất sản xuất nông nghiệp nói riêng chưa bị ô nhiễm mặc dù vẫn phải hứng chịu nhiều chất độc từ các nguồn khác nhau theo thời gian.

Hiện nay, xu hướng trên thế giới và Việt Nam là lựa chọn phương pháp sinh học với việc sử dụng thực vật và vi sinh vật trong quá trình xử lý các vùng đất ô nhiễm dựa trên khả năng chuyển hóa kim loại nặng của vi sinh vật cùng với sự tích lũy các chất ô nhiễm trong cơ thể các loài thực vật. Việc ưu tiên lựa chọn biện pháp sinh học trong xử lý ô nhiễm đất không chỉ do tính an toàn với môi trường sinh thái

mà còn bởi tính hiệu quả, dễ áp dụng cũng như chi phí thấp của phương pháp này. Các vi sinh vật vùng rễ sinh sống trên các khu vực ô nhiễm kim loại nặng ngoài khả năng chịu được hàm lượng kim loại nặng cao trong đất, chúng còn có thể kết hợp với thực vật tạo nên tổ hợp loại bỏ kim loại nặng khỏi đất một cách hữu hiệu và nhanh chóng.

Trên thế giới, nhiều nhà khoa học đã tìm hiểu về khả năng sử dụng các vi sinh vật trong việc kết hợp với thực vật loại bỏ kim loại nặng khỏi các vùng đất ô nhiễm. Tác giả H. S. Husein (2008) [3] đã nghiên cứu mối liên hệ giữa 3 chủng vi khuẩn thuộc giống *Bacillus* là *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringiensis* và *Bacillus biosubtyl* với khả năng tích lũy Cd, Se và Cr của cây mù tạt Ấn Độ; kết quả đã cho thấy đối với Cd chỉ có chủng *Bacillus licheniformis* đã tăng mức độ tích lũy của cây, trong khi đó cả 3 chủng đều tăng sự tích lũy nguyên tố Cr trong cây với mức tăng lần lượt cho 3 chủng vi khuẩn là 0,93, 0,76 và 0,24 lần. Đối với nguyên tố Se chỉ có chủng *Bacillus biosubtyl* làm tăng mức tích lũy 0,65 lần.

Khi sử dụng hai chủng vi khuẩn kháng Cd là *Pseudomonas* sp. RJ10 và *Bacillus* sp. RJ16 để đánh

¹ Đại học Nông nghiệp Hà Nội

² Viện Thổ nhưỡng Nông hoá-Viện KHNN Việt Nam

giá ảnh hưởng của vi khuẩn đến sự hòa tan Cd và Pb, kích thích sinh trưởng của thực vật cũng như sự hấp thu Cd và Pb của cây cà chua, tác giả Lin-Yan Hea và cộng sự (2009) đã xác nhận rằng chúng có ảnh hưởng tới cả sự tích lũy kim loại nặng và sinh khối của cây. Nghiên cứu cho thấy trên đất ô nhiễm kim loại nặng, các cây được nhiễm vi khuẩn đã tăng mức tích lũy Cd và Pb từ 58-104% so với đối chứng. Các chủng vi khuẩn cũng sản sinh chất kích thích sinh trưởng IAA, siderophore và enzym ACC deaminaza có ý nghĩa quan trọng trong việc tăng sinh trưởng và sinh khối của thực vật.

Nghiên cứu của Abou-Shanab R. A. và cộng sự (2003) [2] đã chứng minh vai trò to lớn của vi khuẩn vùng rễ đến việc làm tăng sự linh động của Ni trong đất, qua đó làm tăng sự tích lũy Ni của cây *Alyssum murale*. Ba chủng vi khuẩn vùng rễ là *Sphingomonas macrogoltabidus*, *Microbacterium liquefaciens* và *Microbacterium arabinogalactanolyticum* đã làm tăng mức độ tích lũy Ni trong cây *Alyssum murale* với tỷ lệ tương ứng là 17%, 24% và 32,4% so với đối chứng không nhiễm vi khuẩn.

Như vậy, nghiên cứu của các tác giả nước ngoài hầu hết tập trung vào các chủng giống vi khuẩn vùng rễ như *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Microbacterium* mà chưa nghiên cứu các chủng vi sinh vật khác. Hơn nữa, những nghiên cứu về tập hợp vi sinh vật gồm cả nấm mốc, nấm men, vi khuẩn, nấm rễ nhằm tạo thành một tổ hợp vi sinh vật hỗ trợ thực vật trong xử lý ô nhiễm kim loại nặng trong đất để tận dụng được những ưu điểm của từng loài chưa được chú trọng. Bên cạnh đó, đánh giá các điều kiện ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của các chủng vi sinh vật nhằm xác định khả năng thích ứng của các chủng vi sinh vật nêu trên với các điều kiện ngoại cảnh cần được thực hiện, qua đó tìm hiểu những yếu tố cần thiết để tạo chế phẩm vi sinh vật kết hợp với thực vật trong xử lý ô nhiễm kim loại nặng.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Các chủng giống vi sinh vật sử dụng gồm:

- Chủng vi khuẩn TB22.
- Chủng nấm mốc TM39.
- Chủng nấm men HY4.
- Chủng nấm rễ AMF4.

2. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật

Sử dụng môi trường TSA (Tryptic Soy Agar) cho vi khuẩn, môi trường GYA (Glucose Yeast Extract Agar) cho nấm mốc, môi trường SA (Saboraud Agar) cho nấm men.

Sử dụng các miếng giấy lọc cát khoan tròn đường kính 10 cm thấm nước hay dung dịch để bọc kín bằng giấy than để xác định tỷ lệ nảy mầm của bào tử nấm rễ AMF. Xác định khả năng xâm nhiễm và cộng sinh với ký chủ của nấm rễ AMF thông qua việc đưa bào tử trực tiếp trên cát sạch vô trùng, thực vật sử dụng hướng dương và mương đứng.

3. Phương pháp nghiên cứu

a. Phương pháp phân loại các chủng vi sinh vật

+ Đối với các chủng nấm men, vi khuẩn và nấm mốc

Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction)

Hỗn hợp phản ứng gồm: Nước cất khử trùng 22,3 μ l, đệm 10xPCR 2 μ l, dNTPs 1,6 μ l, MgCl₂ 0,6 μ l, primer 1 μ l – tùy thuộc từng loại vi sinh vật nghiên cứu, Taq-DNA polymeraza 0,5 μ l và ADN khuôn 1 μ l (10 ng). Phản ứng nhân bản gien được thực hiện trên máy Temp Control System PC- 800 và sử dụng chương trình chu kỳ nhiệt như sau: bước 1: 94°C 2 phút; bước 2 gồm 30 chu kỳ: 94°C 1 phút; 50°C 1 phút và 72°C 1,5 phút; bước 3: 72°C 5 phút. Sản phẩm PCR được làm sạch theo protocol QIA quick PCR Purification và phân tích trên gel agarosa 1% [8].

Phương pháp Sequence

Sản phẩm PCR gien 16S rARN của vi sinh vật được tinh sạch bằng kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN Inc.) và gắn vào vector pGEM®-T (Promega Corp., Madison, Wis.), theo qui trình của nhà cung cấp kit. Vector tái tổ hợp được biến nạp vào chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α và nuôi cấy trên môi trường LB (Luria Broth: Difco Bacto Tryptone 10 g, Difco Bacto Yeast Extract 5 g, NaCl 5 g, H₂O 1000 ml), mỗi đĩa môi trường được bổ sung 20 μ l IPTG 100 mM, 20 μ l XGal 40 ng/ml và 40 μ l ampicillin 25 ng/ml), ủ ở nhiệt độ 37°C trong 18 ÷ 24 giờ. Những khuẩn lạc có màu trắng (đã gắn gien tái tổ hợp) được sử dụng để tách plasmit tái tổ hợp, những plasmit này sau khi nhân bản và tinh sạch bằng kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN Inc.) được dùng để tạo chuỗi (sequence). Quá trình tạo chuỗi (sequence) được tiến hành với bộ hoá chất FS -DNA sequencing

kit, theo qui trình của nhà sản xuất và giải trình tự bằng máy tự động ABI 377 PRISM (Perkin Elmer) [8].

Sử dụng chương trình BLASTN để phát hiện những trình tự tương đồng với các trình tự nghiên cứu đã được công bố trong ngân hàng gen, nhằm xác nhận trình tự đích và chọn một số trình tự có độ tương đồng cao để so sánh và phân tích. Sử dụng chương trình phần mềm máy tính MEGA2 để đối chiếu. Phân tích và xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng phương pháp tối thiểu (Maximum Parsimony (MP) method) và phương pháp tiến hoá tối thiểu (Minimum Evolution (ME) method) trên cơ sở khoảng cách di truyền theo mô hình Kimura. Giá trị bootstrap (tự vươn lên) của cây phát sinh chủng loại ME và MP được tính với 1000 lần lấy mẫu thử (resampling), dựa vào cây phả hệ ta xác định được mối quan hệ của các chủng vi khuẩn cần kiểm tra.

+ Đối với chủng nấm rễ

Xác định hình dạng và kích thước của bào tử. Bảng so sánh của Morton (1988) [6].

Màu sắc của bào tử. Xác định bằng bảng màu chuẩn 4 nhân tố CMYB

(Cyan/Magenta/Yellow/Black) (theo INVAM [4]).

Xác định tên chi và loài: Theo Schenck và Yvonne Pérez (1990) [10].

b. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố đến sinh trưởng của các chủng vi sinh vật

+ Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng của các chủng vi sinh vật

Phương pháp nuôi cấy trực tiếp trên môi trường chuyên tính ở các mức pH_{KCl} khác nhau, cụ thể là: pH = 4,0, pH = 5,0, pH = 6,0, pH = 7,0, pH = 8,0. Riêng nấm rễ nuôi bào tử trên giấy lọc được thấm dung dịch có các mức pH khác nhau nêu trên và theo dõi khả năng nảy mầm của bào tử, tính tỷ lệ %. Thí nghiệm được thực hiện, nhắc lại 3 lần [1].

+ Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của các chủng vi sinh vật

CCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGC
TCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCC
GGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCT
ACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGC
GTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTC
GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCT

Sử dụng phương pháp cấy các chủng vi sinh vật trên môi trường thạch bằng chuyên tính, nuôi các hộp petri ở các mức nhiệt độ khác nhau 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C. Quan sát khả năng mọc của các chủng giống vi sinh vật. Riêng nấm rễ nuôi bào tử trên giấy lọc được làm ẩm bằng nước cất đến độ ẩm 90%, quan sát khả năng nảy mầm của bào tử, tính tỷ lệ % [1].

+ Ảnh hưởng của kháng sinh đến sinh trưởng của các chủng vi sinh vật

Áp dụng phương pháp nuôi cấy trực tiếp trên môi trường có streptomycin với các nồng độ khác nhau: 300, 500, 600, 800, 1000 và 1200 mg/1lít môi trường (Obtin, 1971). Riêng nấm rễ được nuôi bào tử trên giấy lọc có thấm dung dịch có nồng độ streptomycin nêu trên và đã được quan sát khả năng nảy mầm, tính tỷ lệ % [1].

+ Xác định tỷ lệ xâm nhiễm của chủng nấm AMF4

Lây nhiễm chủ động bào tử nấm rễ AMF4 vào chậu chứa 1 kg cát ẩm tiệt trùng với lượng 50 bào tử/chậu; công thức đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không lây nhiễm nấm rễ AMF4. Có hai thí nghiệm trồng hướng dương và mương dứng. Mỗi thí nghiệm nhắc lại 4 lần. Mẫu rễ của cây được thu sau 30 ngày trồng. Xác định tỷ lệ xâm nhiễm (%) theo phương pháp quan sát (visual) của Giovannetti M. và Mosse B. (1980) [11].

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Phân loại các chủng vi sinh vật

Bằng kỹ thuật PCR-sequencing tiến hành tại Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học – Đại học Quốc gia Hà Nội, đã định danh được các chủng vi khuẩn TB22, nấm mốc TM39 và nấm men HY4. Riêng đối với chủng nấm rễ AMF4 đã sử dụng phương pháp hình thái dựa trên màu sắc, hình dạng, kích thước của bào tử. Kết quả như sau:

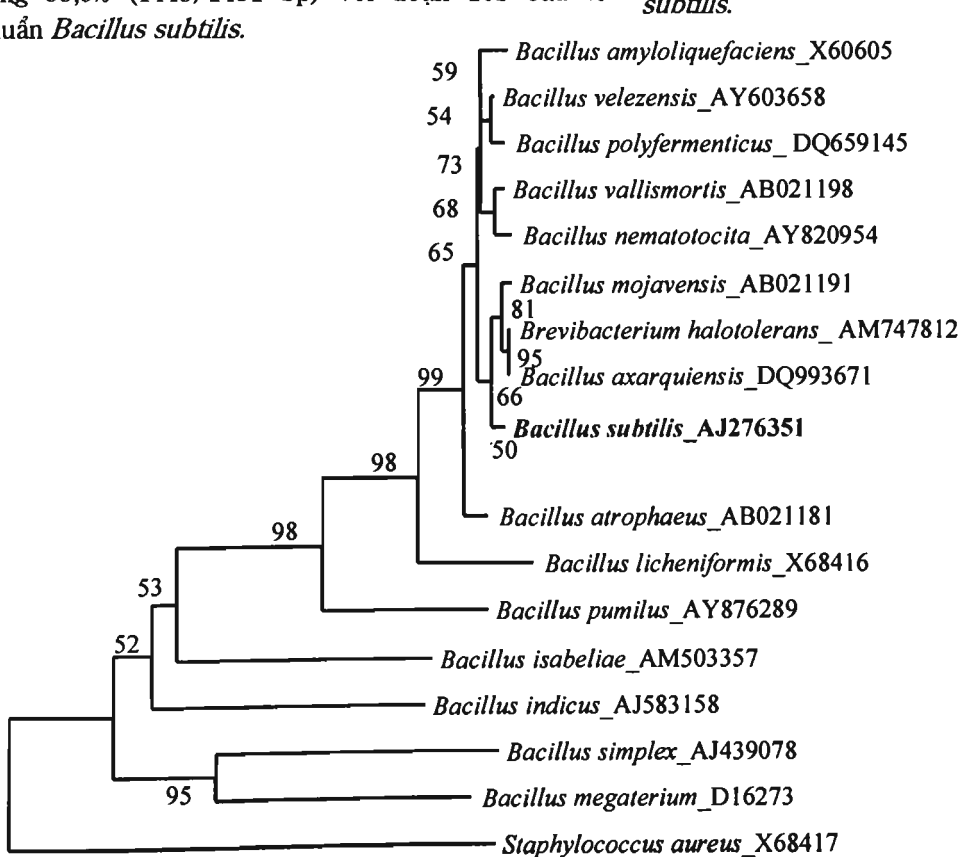
a. Chủng vi khuẩn TB22

** Trình tự ADNr 16S*

AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGG
 AATTATTGGGCGTAAAGGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGG
 GAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAA
 ATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAG
 CGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGT
 GTTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGC
 AAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCA
 ACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGC
 AGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA
 GCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGG
 AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGAC
 AGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGT
 CTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT
 CCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTT
 TATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGA
 AGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

Trình tự gen rARN 16S của chủng TB22 tương đồng 99,9% (1449/1451 bp) với đoạn 16S của vi khuẩn *Bacillus subtilis*.

* *Cây phát sinh của chủng vi khuẩn Bacillus subtilis.*



Phân tích cây phả hệ dựa trên đoạn rARN 16S ta thấy chủng vi khuẩn TB22 có quan hệ khá gần gũi với một số chủng vi khuẩn như *Bacillus axarquiensis*, *Brevibacterium halotolerans* nhưng lại khá xa so với một số chủng vi khuẩn thuộc họ *Bacillus* khác như *Bacillus licheniformis* hay *Bacillus megaterium*.

Bacillus subtilis là vi khuẩn gram dương khá phổ biến trong đất. Là một thành viên trong giống *Bacillus* nên có dạng hình que, có thể sinh bào vệ bào tử nội sinh chống chịu với các điều kiện ngoại cảnh bất thuận [5]. Theo nghiên cứu của nhiều nhà khoa học, *Bac. subtilis* không gây hại đối với người

[9], Mặc dù có thể xâm nhiễm vào thức ăn nhưng rất hiếm khi gây ngộ độc. *Bac. subtilis* có thể sản sinh enzym phân giải protein subtilisin. Bào tử của vi khuẩn này có thể chịu được nhiệt độ cao. Đối với *Bac. subtilis* có thể sử dụng phương thức sinh sản vô tính theo kiểu phân đôi để tạo thành hai tế bào con hoặc hay sinh sản dạng bất đối xứng tạo thành một bào tử nội sinh chống lại những yếu tố môi trường bất thuận như nhiệt độ, axit, muối. Thời kỳ sản sinh bào tử nội sinh vi khuẩn có thể trở nên di động được

AAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTCGGGCCCAGAGTTGTAATTTGTAGAGGATACTTTTGATGCGGTGCCCTCCGAGTTCCTTGGAACGGGACGCCATAGAGGGTGAGAGCCCCGTCTGGTTGGATGCCAAATCTCTGTAAAGTTCCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCTAAATGGGAGGTATATGTCTTCTAAAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGATAGCGACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGTTTATGACCAGACTTGGGGCTTGGTTAATCATCTGGGGTTCTCCCCAGTGCACITTCCAGTCCAGGCCAGCATCAGTTTTCCCGGGGGATAAAGACTTCGGGAATGTGGCTCTCTTCGGGGA GTGTTATAGCCCGTTGTGTAATACCCTGGGGGGGACTGAGGTTTCGCGCATCTGCAAGGATGCTGGCGT AATGGTCATCAACGACCCGTCTTGAAACACGGACCAC

Trình tự gen rARN 26S của chủng TM39 tương đồng 100% (501/501 bp) với gen 26S của nấm *Gibberella moniliformis*

nhờ việc xuất hiện một lông roi [7].

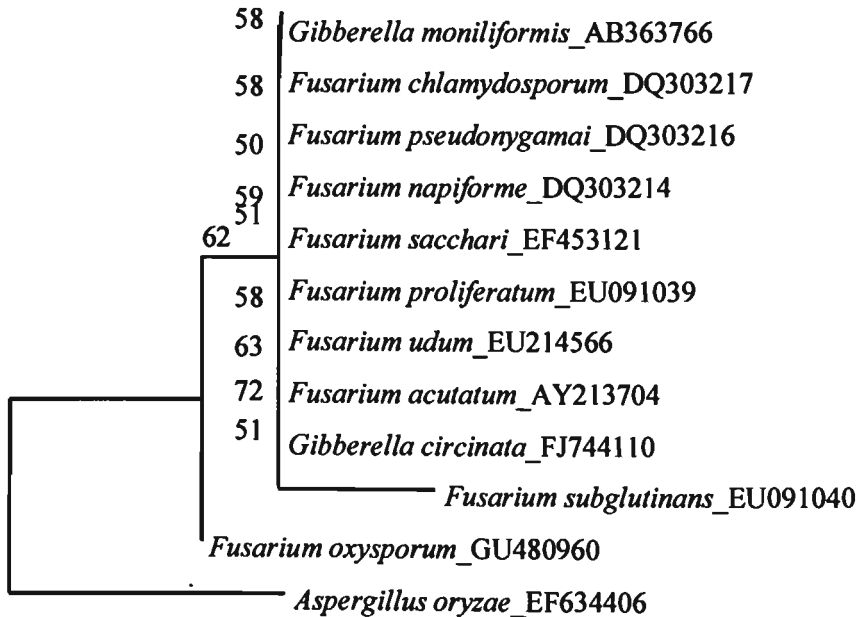
Bac. subtilis được sử dụng trong nhiều mục đích khác nhau như trong phòng thí nghiệm để nghiên cứu vi sinh vật, sử dụng trong công nghiệp thực phẩm (tại Nhật Bản và Hàn Quốc), y học, xử lý chất thải (đặc biệt là chất thải phóng xạ như thorium (IV), plutonium (IV)...), dùng sản xuất enzym amylaza...[7].

b. *Chủng nấm mốc TM39*

* *Trình tự rARN 26S*

* *Cây phát sinh của chủng nấm Gibberella moliniformis*

0.002



Vị trí phân loại của chủng *Gibberella moniliformis* và các loài có quan hệ gần dựa vào trình tự gen rARN 26S

Dựa trên cây phả hệ của nấm TM39 nêu trên có thể thấy chủng nấm này có họ hàng khá gần gũi với các chủng nấm thường thấy trong tự nhiên ở Việt Nam như *Fusarium chlamydosporum*, *Fusarium acutatum*, *Gibberella circinata*... Trong khi đó lại khác nhánh so với chủng nấm *Aspergillus oryzae*.

Xác định khả năng gây bệnh trên người và động vật tại trang web:

<http://www.absa.org/riskgroups/fungisearch.php?genus=Giberrella> cho thấy chủng nấm mốc *Gibberella moniliformis* thuộc nhóm 2 an toàn cho người và động vật.

c. *Chủng nấm men HY4*

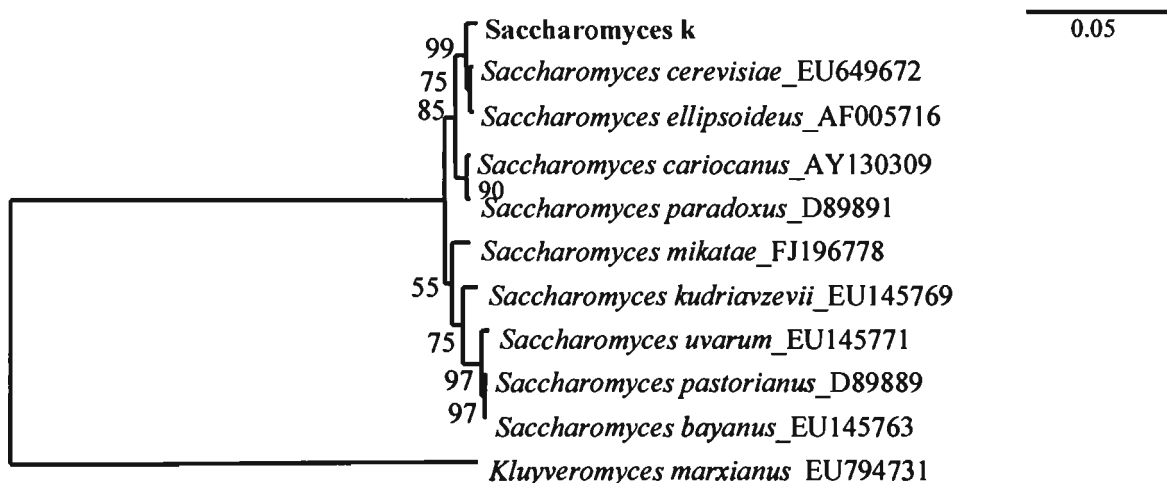
* Trình tự rARN 16S của chủng nấm men HY4

AAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATTTTTTTTTTTGTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGC
 AAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAG
 TTTCTTTCTTGCTATTCCAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATAAAACCGTTTCA
 ATACAACACACTGTGGAGITTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAG
 AGGTTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCAATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAAGTGA
 AATTTTAAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA
 TCGGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCACGGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTG
 GTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATAC
 TCTTTGGAGTTAACTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTTTCCAAGAGAGGTTTCTCT
 GCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACT
 GAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGT

Trình tự gien rARN 16S của chủng HY4 tương
 đồng 98% (750/760 bp) với đoạn 16S của nấm
Saccharomyces cerevisiae.

* Cây phát sinh chủng nấm men *Saccharomyces*

cerevisiae



Cây phát sinh chủng nấm men HY4 cho thấy chủng nấm có sự gần gũi với hầu hết các chủng nấm men thuộc họ *Saccharomyces* như *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces ellipsoideus*...nhưng khác nhánh với chủng nấm men *Kluyveromyces marxianus*.

Saccharomyces cerevisiae là chủng nấm men thuộc nhóm nấm này chồi, được sử dụng phổ biến trong làm bánh mỳ và sản xuất rượu bia. Tế bào nấm có dạng hình tròn hoặc ôvan, đường kính từ 5-10 µm. Sinh sản theo phương thức nảy chồi.

d. *Chủng nấm rễ AMF4*

Để xác định tên chủng nấm rễ AMF4, đã áp dụng phương pháp phân loại dựa trên hình thái bào tử và bảng màu Morton. Dựa trên hình dạng bào tử của chủng AMF4 có hình cầu, gấn hình cầu, màu sắc từ trắng tới kem hoặc vàng đậm (mã màu 00/30/20/00 đến 00/30/100/10 theo bảng màu Morton), kích thước 280 - 300 µm. Thành bào tử có 3 - 5 lớp. Đã xác định tên của chủng AMF4 là *Glomus australe*. Chi tiết về phân loại

chủng này như sau (theo (Berk.) S. M. Berch, 1983).

Ngành: Glomeromycota; lớp: Glomeromycetes; bộ: Glomerales; họ: Glomeraceae; giống: *Glomus*; loài: *Glomus australe*.

2. Đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố đến sinh trưởng của các chủng vi sinh vật

Khả năng sinh trưởng dưới ảnh hưởng của các điều kiện khác nhau của môi trường là rất quan trọng đánh giá khả năng sống sót, sinh trưởng và phát triển trong môi trường thực tế. Các yếu tố như pH, nhiệt độ, kháng sinh ...còn nhằm xác định những điều kiện cần thiết tiến tới phối trộn các chủng vi sinh vật với chất mang để đạt được tiêu chuẩn quy định về chế phẩm vi sinh vật.

Tiến hành đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố tới sinh trưởng của các chủng vi sinh vật gồm khả năng thích ứng với pH, khả năng thích ứng với nhiệt độ và khả năng kháng kháng sinh và thu được kết quả như sau (Bảng 1):

Bảng 1. Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng và phát triển của các chủng vi sinh vật

TT	Ký hiệu chủng	Khả năng thích ứng với các mức pH				
		4,0	5,0	6,0	7,0	8,0
1	<i>Bacillus subtilis</i> (CFU/ml)	3,55.10 ⁵	2,54.10 ⁸	4,62.10 ⁸	3,24.10 ⁴	2,82.10 ⁴
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CFU/ml)	2,34.10 ⁵	4,28.10 ⁶	4,46.10 ⁷	3,52.10 ⁸	1,25.10 ⁶
3	<i>Gibberella moniliformis</i> (CFU/ml)	3,72.10 ⁵	4,62.10 ⁸	4,12.10 ⁸	2,56.10 ⁶	1,32.10 ⁵
4	<i>Glomus australe</i> (% bào tử nảy mầm)	25	45	75	95	53

Bảng 1 cho thấy các chủng vi sinh vật đều thuộc nhóm ưa môi trường pH trung tính đến hơi chua.

Các chủng nấm mốc ưa môi trường chua pH từ 4-5. Trong khi đó các chủng vi khuẩn, nấm rễ và nấm men ưa khoảng pH trung tính từ 6-7.

Bảng 2. Khả năng kháng kháng sinh của các chủng vi sinh vật

TT	Chủng VSV	Khả năng kháng kháng sinh				
		C ₃₀₀	C ₅₀₀	C ₈₀₀	C ₁₀₀₀	C ₁₂₀₀
1	<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++	+	+	
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+++	++	+	+	-
3	<i>Gibberella moniliformis</i>	+++	++	++	+	
4	<i>Glomus australe</i>	100%	80%	52%	20%	0%

Ghi chú: +++ mọc khoẻ (>50 CFU/đĩa môi trường), ++ mọc trung bình (25-50 CFU/đĩa môi trường); + mọc yếu (<25 CFU/đĩa môi trường), - không mọc

Theo các nhà khoa học, các chủng vi sinh vật có khả năng kháng kháng sinh cao thường có tính chống chịu với điều kiện môi trường bất thuận tốt, sức cạnh tranh cao do đó có thể phát triển mạnh. Kết quả đánh giá cho thấy tất cả các chủng vi sinh vật đều có khả năng phát triển tốt ở môi trường có nồng độ streptomycin từ thấp đến trung bình (300 – 500 mg/l môi trường), mọc yếu dần ở các nồng độ cao hơn (từ

500 – 1000 mg/l môi trường), số lượng khuẩn lạc của các chủng vi sinh vật giảm theo chiều tăng nồng độ streptomycin.

Cũng từ bảng 2 ta thấy: Các chủng nấm mốc và nấm rễ có khả năng mọc tốt ở tất cả các nồng độ nghiên cứu; điều này chứng tỏ các chủng này có khả năng chống chịu tốt với điều kiện ngoại cảnh bất thuận tốt hơn các chủng khác.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng và phát triển của các chủng vi sinh vật

TT	Tên chủng	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C
1	<i>Bacillus subtilis</i> (CFU/ml)	3,25.10 ⁷	4,84.10 ⁸	4,22.10 ⁷	3,64.10 ⁴	3,25.10 ⁴
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CFU/ml)	4,15.10 ⁶	3,48.10 ⁸	2,35.10 ⁶	4,52.10 ³	4,15.10 ³
3	<i>Gibberella moniliformis</i> (CFU/ml)	3,26.10 ⁶	5,82.10 ⁸	4,12.10 ⁵	3,62.10 ³	3,26.10 ³
4	<i>Glomus australe</i> (% bào tử nảy mầm)	96	100	72	63	20

Bảng 3 chứng minh đa số các chủng đều phát triển tốt ở 30°C, còn ở các nhiệt độ khác phát triển kém hơn hoặc không phát triển. Điều này chứng tỏ các chủng vi sinh vật nghiên cứu thích hợp với điều kiện khí hậu nhiệt đới như ở Việt Nam; do đó khả năng đưa vào thực tiễn sản xuất là khá cao.

Kết quả ở bảng 4 cho thấy nấm rễ *Glomus australe* có khả năng xâm nhiễm vào rễ các cây thí nghiệm, chứng tỏ chúng có thể cộng sinh với các loài thực vật này cũng như góp phần cải thiện sinh trưởng của cây. Số liệu thí nghiệm cũng thể hiện tỷ lệ xâm nhiễm của nấm rễ so với đối chứng chênh lệch ở mức có ý nghĩa tại p=0,05.

Như vậy, xét về điều kiện sinh trưởng, các vi sinh vật được tuyển chọn có những đặc tính phù hợp với mục tiêu tạo chế phẩm kết hợp với thực vật trong xử lý đất ô nhiễm kim loại nặng.

Bảng 4. Tỷ lệ xâm nhiễm của chủng nấm rễ *Glomus australe* trên một số thực vật

Công thức	Tỷ lệ xâm nhiễm trên cây hương dương (%)	Tỷ lệ xâm nhiễm trên cây muồng đúng (%)
Đối chứng	0.53	0.67
Thí nghiệm	57.64	48.37
CV (%)	1.24	2.66
LSD 0,05	10.45	9.52

IV. KẾT LUẬN

- Các chủng vi sinh vật phân lập được gồm chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis*, chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, chủng nấm mốc *Gibberella moniliformis*, chủng nấm rễ *Glomus australe*.

- Các chủng vi sinh vật đều thuộc nhóm vi sinh vật ưa ấm (phát triển mạnh ở khoảng nhiệt độ 30-35°C). Các chủng nấm rễ, vi khuẩn và nấm men thích ứng khoảng pH trung tính (6-7), trong khi đó chủng nấm mốc thích hợp khoảng pH hơi chua (4-5). Khả năng kháng kháng sinh của các chủng khá tốt, tất cả các chủng đều mọc từ trung bình đến khoẻ ở các mức streptomycin từ 300-500 mg/l, mọc yếu ở mức từ 800-1000 mg/l. Nấm rễ có thể xâm nhiễm và cộng sinh với rễ một số cây sử dụng trong cải tạo đất ô nhiễm kim loại nặng. Nhìn chung, các đặc tính trên cho thấy chúng hoàn toàn thích ứng với điều kiện khí hậu nước ta, có khả năng cạnh tranh tốt với các vi sinh vật khác trong môi trường và có thể sử dụng để tạo chế phẩm vi sinh vật kết hợp với thực vật trong xử lý đất ô nhiễm kim loại nặng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Xuân Thành và cộng sự (2007). *Thực tập vi sinh vật chuyên ngành*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội. Tr. 38-40.

2. Abou-Shanab R. A., Angle J. S., Delorme T. A., Chaney R. L., van Berkum P., Moawad H., Ghanem K. and Ghazlan H. A. (2003). Rhizobacterial Effects on Nickel Extraction from Soil and Uptake by *Alyssum murale*. *New Phytologist*. 158(1), pp. 219-224.

DETERMINATION OF NAME AND GROWTH CONDITIONS OF FOUR MICROORGANISM STRAINS USED FOR IMPROVEMENT OF SOIL POLLUTED WITH HEAVY METALS (Cu, Pb, Zn)

Phan Quoc Hung, Nguyen Huu Thanh
Le Nhu Kieu, Nguyen Viet Hiep

Summary

Soil is a vital role in human life. Polluted soil be able to cause by some reason but its consequence is dangerous for eco-system and health of human. Bioreclamation is using a combination plant-microorganism to discharge heavy metal from contamination soil. It have four micro-organisms which have been estimated tolerance heavy metal in prevous research are used to name them. They are a bacteria TB22, a mould TM39, a yeast HY4, an abuscular mycorrhizal fungi AMF4. Method for name micro-organisms is PCR-sequencing (for bacteria, mould, yeast species) and observe spores formation and colour table of Morton (for AMF species). Result show that name of TB22 is *Bacillus subtilis*, TM39 is *Gibberella moniliformis*, HY4 is *Saccharomyces cerevisiae*, AMF4 is *Glomus australe*. Bio-characteristics of micro-organisms are estimated, results show that they like warm (robust growth in 30-35°C). Micro-organisms grow good in pH from 6 to 7 are bacteria, AMF and yeast species. The mould species like pH little acidity (from 4 to 5). They can tolerate concentration Streptomycin of 1000 mg.l⁻¹. Abuscular mycorrhizal fungi AMF4 species could infect in roots of sun flower and common willow herb with 57.64 and 48.37 percentage. Key words: Bio-characteristic, contamination soil, heavy metal, micro-organism, tolerance.

Người phản biện: PGS.TS. Phạm Văn Toàn

3. Hussein H. S. (2008). Optimization of Plant-Bacteria Complex for Phytoremediation of Contaminated Soils. *International Journal of Botany*. 4(4), pp. 437-443.

4. INVAM (1992). *INVAM color chart*, access date 11-2-2011, in website <http://invam.caf.wvu.edu/otherinfo/articles/colorchart.htm>.

5. Madigan M. and Martinko J., eds (2005). *Brock Biology of Microorganisms*. 11th ed, Prentice Hall.

6. Morton J. B. (1988). Taxonomy of mycorrhizal fungi: Classification nonmenclature and identification. *Mycotaxon*. 32, pp. 276 – 324.

7. Nakano M. M. and Zuber P. (1998). Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annu. Rev. Microbiol.* 52, pp. 165–90.

8. Rivas R., Velázquez E., Zurdo-Piñeiro J. L., Mateos P. F. and Martínez Molina E. (2004). Identification of microorganisms by PCR amplification and sequencing of a universal amplified ribosomal region present in both prokaryotes and eukaryotes. *J. Microbiol. Methods*. 56(3), pp. 413-26.

9. Ryan K. J. and Ray C. G., eds (2004). *Sherris Medical Microbiology*. 4th ed, McGraw Hill.

10. Schenck N. C. and Perez Y. (1990). *Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi*. 3rd ed., Synergistic Publications, Gainesville, F. L.

11. Giovannetti M. and Mosse B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *The new phytologist*. 84, pp. 489-500.