

Nghiên cứu ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến cây cao su - *Hevea brasiliensis* giai đoạn vườn ươm

Đoàn Phạm Ngọc Nga^{1*}, Hà Thị Ngọc Trinh¹, Ngô Trần Ngọc Quý², Nguyễn Hữu Hiệp³

¹Trung tâm Hạt nhân TP Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Nông lâm TP Hồ Chí Minh

³Trường Đại học Cần Thơ

Ngày nhận bài 20/12/2017; ngày chuyển phản biện 27/12/2017; ngày nhận phản biện 6/2/2018; ngày chấp nhận đăng 22/2/2018

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của bốn chủng vi khuẩn nội sinh *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei* đến cây cao su (*Hevea brasiliensis*) giai đoạn vườn ươm. Kết quả nhận được cho thấy, bốn chủng có ảnh hưởng đến tỷ lệ nảy mầm ($P \leq 0,01$), tỷ lệ nảy mầm cao nhất nhận được khi ủ hạt cao su với chủng *Bacillus safensis* và thấp nhất khi xử lý hạt bằng *Rhizobium freirei*. Ngược lại, kết quả phần trăm hạt nảy mầm không có sự khác biệt thống kê ($P > 0,05$). Hạt được ủ với bốn chủng vi khuẩn ở mật độ 10^9 CFU/túi cho kết quả cao nhất về chiều dài rễ, chiều dài thân mầm, chiều cao và trọng lượng khô của cây ($P < 0,01$). Kết quả đánh giá bằng kỹ thuật đánh dấu đồng vị N-15 trên cây cao su giai đoạn vườn ươm cho thấy, %N có nguồn gốc từ không khí do *Enterobacter asburiae* và *Stenotrophomonas maltophilia* đóng góp đạt 46,43-47,62%; trong khi, *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei* đạt 35,71-38,69%.

Từ khóa: *Bacillus*, cây cao su, *Enterobacter*, N-15, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas*.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Cao su là cây công nghiệp lâu năm có vai trò quan trọng trong nền kinh tế Việt Nam. Cây cao su đòi hỏi dinh dưỡng đủ để có thể tăng trưởng và duy trì năng suất tốt [1]. Kết quả thí nghiệm cho thấy, thời kỳ kiến thiết cơ bản của cây cao su có thể được rút ngắn nhờ vào chế độ phân bón tối ưu [2]. Còn trên cây cao su trưởng thành, việc sử dụng phân bón có thể cải thiện năng suất mủ lên tới 15-30% [3].

Trong những năm gần đây, nhiều chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ tự nhiên sống nội sinh trong rễ, thân, lá của những cây không thuộc cây họ đậu (ví dụ: Lúa, mía, bắp, cò, dứa...) đã và đang được nghiên cứu phân lập tuyển chọn và ứng dụng [4]. Tại Việt Nam, từ trước đến nay canh tác cây cao su chủ yếu phụ thuộc vào phân bón đạm vô cơ. Tuy nhiên, việc lạm dụng phân đạm vô cơ không những làm cây cao su dễ mắc cảm với dịch hại, giảm năng suất, giảm hiệu quả kinh tế mà còn gây nên tình trạng ô nhiễm môi trường. Chính vì vậy, nghiên cứu và ứng dụng các chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ sẽ góp phần đáng kể cho việc giảm chi phí đầu tư và giảm ô nhiễm môi trường trong canh tác cây cao su. Xuất phát từ nhu cầu thực tế đó, nghiên cứu này nhằm cung cấp cơ sở khoa học cho việc tuyển chọn các chủng vi khuẩn cố định nitơ tiềm năng kích thích sự tăng trưởng của cây cao su giai đoạn vườn ươm.

Nội dung nghiên cứu

Thí nghiệm được thực hiện tại Đồn điền cao su Bến Cui, huyện Dương Minh Châu, tỉnh Tây Ninh. Thời gian thực hiện thí nghiệm từ tháng 10/2015 đến tháng 1/2017. Hạt cao su thuộc dòng vô tính GT1. Để đảm bảo tỷ lệ nảy mầm và đồng nhất, chọn hạt mới thu hoạch, vỏ có màu sáng bóng, ruột còn trắng, đầy và nặng. Các thí nghiệm được tiến hành trong vùng có điều kiện khí hậu nhiệt đới gió mùa. Cây cao su được trồng trong bầu nhựa kích thước 18x40 cm. Thí nghiệm được bố trí trên diện tích 300 m², hàng đơn cách nhau 1 m, vườn ươm được tưới bằng hệ thống tưới phun mưa. Đất vô bầu lấy tại lô thí nghiệm có thành phần cơ giới thịt pha sét cát; mức độ kết vón 10-30% thể tích; pH_{H₂O} 5,5; hàm lượng chất hữu cơ 2,5% (kết quả phân tích của Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam).

Thí nghiệm 1: Đánh giá tác động của các vi khuẩn nội sinh đối với sự nảy mầm và sự phát triển của cây cao su - *Hevea brasiliensis*

Thí nghiệm gồm 2 yếu tố được bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại. Yếu tố thứ 1: Bốn chủng vi khuẩn nội sinh cố định đạm *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei* được phân lập từ rễ cây cao su (nguồn cung

*Tác giả liên hệ: Email: dpngocnga@gmail.com

Effect of diazotrophic bacteria on rubber trees - *Hevea brasiliensis* at the nursery stage

Pham Ngoc Nga Doan^{1*}, Thi Ngoc Trinh Ha¹,
Tran Ngoc Quy Ngo², Huu Hiep Nguyen³

¹Center for Nuclear Techniques in Ho Chi Minh City

²Nong lam University Ho Chi Minh City

³Can Tho University

Received 20 December 2017; accepted 22 February 2018

Abstract:

This study was carried out to investigate the effects of four diazotrophic bacteria: *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus safensis*, and *Rhizobium freirei*, which were isolated from rubber roots planted in Vietnam, on rubber trees at the nursery stage. The results showed that these bacteria had significant influences on the germination rate ($P \leq 0.01$); the germination rate was affected highest by *Bacillus safensis* and lowest by *Rhizobium freirei*. In contrast, the four bacteria had no significant effect on the germination percentage ($P > 0.05$). The best colony forming unit was 10^9 CFU/pot. The bacteria also created statistically significant differences in root length, stem length, height and dry weight ($P < 0.01$). By using ^{15}N dilution technique, *Enterobacter asburiae* and *Stenotrophomonas maltophilia* demonstrated a biological nitrogen fixing contribution to the rubber trees with the ratio of nitrogen driven from air (%Ndfa) of 46.43–47.62% higher than *Bacillus safensis* and *Rhizobium freirei* with the %Ndfa of 35.71–38.69%.

Keywords: *Bacillus*, *Enterobacter*, ^{15}N , *Rhizobium*, rubber tree, *Stenotrophomonas*.

Classification number: 4.1

cấp từ Trung tâm Hạt nhân TP Hồ Chí Minh). Yếu tố thứ 2: *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei* được cho vào mỗi túi trồng cây cao su ở 5 mật số vi khuẩn như sau: 10^9 CFU, 10^8 CFU, 10^7 CFU, 10^6 CFU và 10^5 CFU.

Vi khuẩn được chủng 2 lần: Lần đầu - áo hạt cao su, ngâm hạt cao su trong hỗn hợp vi khuẩn và aginate 2% trong 30 phút; lần thứ 2 là 11 ngày sau khi hạt nảy mầm, rễ cây được nhúng trong hỗn hợp vi khuẩn và aginate 2% trong 30 phút trước khi trồng vào bầu nhựa.

Thí nghiệm 2: Ứng dụng kỹ thuật đánh dấu đồng vị ^{15}N để đánh giá hiệu quả cố định đạm sinh học của vi khuẩn cố định đạm lên cây cao su giai đoạn ươm

Enterobacter asburiae, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei* được xử lý ở mật số vi khuẩn 10^9 CFU/túi và cây đối chứng không chủng vi khuẩn. Urê - N - 15 được sử dụng là 3,2 g urê - ^{15}N /cây có 5,231 % ^{15}N .e (%N-15 atom excess - %N - 15 làm giàu) được bón vào túi nhựa 45 ngày sau khi trồng. Phân chứa P và K được sử dụng theo khuyến cáo của Viện Nghiên cứu Cao su Việt Nam gồm 11 g SSP/túi và 1,9 g KCl/túi. Thí nghiệm được theo dõi và lấy số liệu đến thời điểm 120 ngày sau khi bón phân urê - N - 15.

Xác định khả năng nảy mầm: Theo phương pháp của Djavanshir và Pourberk (1976) [5], giá trị được tính theo công thức:

$$GP = \frac{Ni}{S} \times 100$$

$$GV = (\sum DGS / N) \times \frac{GP}{10}$$

Trong đó: GP là tỷ lệ hạt nảy mầm cuối thí nghiệm, Ni là số lượng hạt nảy mầm và S là tổng số hạt được trồng. GV là giá trị nảy mầm, DGS là tốc độ nảy mầm hàng ngày, tính bằng cách chia tỷ lệ (%) nảy mầm cộng dồn cho số ngày thí nghiệm, tính từ ngày gieo; $\sum DGS$ là tổng số các tốc độ nảy mầm hàng ngày; N là số ngày có đếm nảy mầm, bắt đầu từ ngày có nảy mầm đầu tiên.

Phương pháp phân tích mẫu

N tổng được phân tích theo phương pháp Kjeldahl. %N - 15 a.e được xác định bằng quang phổ kế phát xạ NOI 7PC tại Trung tâm Hạt nhân TP Hồ Chí Minh theo quy trình của G. Hardarson (1990) [6]. Kết quả %N có nguồn gốc từ phân urê N - 15 (%Ndff), %N có nguồn gốc từ đất (%Ndffs) và %N có nguồn gốc từ không khí (%Ndffk) được tính theo công thức:

$$\%Ndff = \frac{\%N-15 \text{ a.e (cây)}}{\%N-15 \text{ a.e (phân urê N-15)}} \times 100$$

Nghiệm thức đối chứng (NF- Non fixing): $\%Ndff_{NF} + \%Ndffs_{NF} = 100$

Tuy nhiên, khi bổ sung vi khuẩn (F- fixing): $\%Ndff_F + \%Ndffs_F + \%Ndffa = 100$

Giả thuyết: NF và F hấp thu lượng N từ phân bón và đất là như nhau thì:

$$\frac{\%N_{dff}-NF}{\%N_{dfs}-NF} = \frac{\%N_{dff}-F}{\%N_{dfs}-F}$$

Xử lý số liệu

Số liệu thực nghiệm được xử lý theo các công thức của phần mềm Microsoft Excel 2007. Phân tích và xử lý thống kê theo chương trình MSTATC. Phép thử Duncan được sử dụng để so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức, độ khác biệt có ý nghĩa ở mức LSD 5%.

Kết quả

Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn cố định đạm lên sự nảy mầm của hạt cao su

Kết quả thống kê từ bảng 1 cho thấy, khi xử lý hạt cao su bằng *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei* không ảnh hưởng đến tỷ lệ nảy mầm (GP) của hạt ($P > 0,05$) nhưng giá trị nảy mầm (GV) có sự khác biệt thống kê giữa các nghiệm thức.

Bảng 1. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn cố định đạm lên sự nảy mầm của hạt cao su.

Nghiệm thức	Tỷ lệ nảy mầm % (GP)	Giá trị nảy mầm (GV)
Đối chứng (không có vi khuẩn)	76,65	40,23 ^c
<i>Enterobacter asburiae</i>	78,27	48,26 ^b
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	78,77	48,42 ^b
<i>Bacillus safensis</i>	78,27	55,89 ^a
<i>Rhizobium freirei</i>	78,03	40,69 ^c
	F_c^{ns} CV% = 7,77	F_v^{**} CV% = 10,12

Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị có cùng ký tự đi kèm thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê; **: Khác biệt rất có ý nghĩa thống kê với $P < 0,01$; ns: khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê.

Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn cố định đạm đến sự phát triển của cây cao su

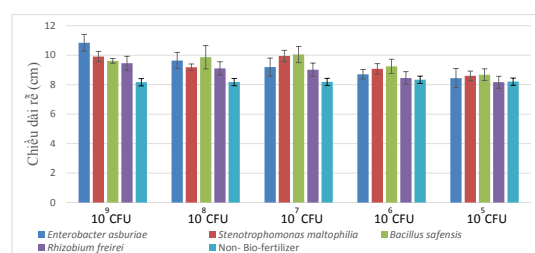
Kết quả từ bảng 2 cho thấy ảnh hưởng tích cực của 4 chủng vi khuẩn cố định đạm đến chiều dài rễ, chiều dài thân và trọng lượng khô của cây cao su giai đoạn vườn ươm ($P < 0,01$). Các chủng vi khuẩn *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia* và *Bacillus safensis* thể hiện ảnh hưởng đến chiều dài rễ và thân vượt trội hơn so với nghiệm thức xử lý chủng *Rhizobium freirei*. Tương tự, trọng lượng khô của cây trong các nghiệm thức xử lý bằng vi khuẩn *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia* và *Bacillus safensis* cũng cao hơn 14-16% so với đối chứng và nghiệm thức ủ với *Rhizobium freirei*.

Bảng 2. Ảnh hưởng của vi khuẩn cố định đạm đến sự phát triển của cây cao su.

Nghiệm thức	Chiều dài rễ (cm)	Chiều dài thân (cm)	Trọng lượng khô (g)
Đối chứng	8,21c	15,11 c	66,26b
<i>Enterobacter asburiae</i>	9,37a	15,58 b	82,06a
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	9,35a	15,83 a	80,86a
<i>Bacillus safensis</i>	9,49a	15,86 a	80,75a
<i>Rhizobium freirei</i>	8,84b	15,18 c	70,06b
F	11,08**	6,13**	13,25**
CV (%)	6,82	1,97	10,22

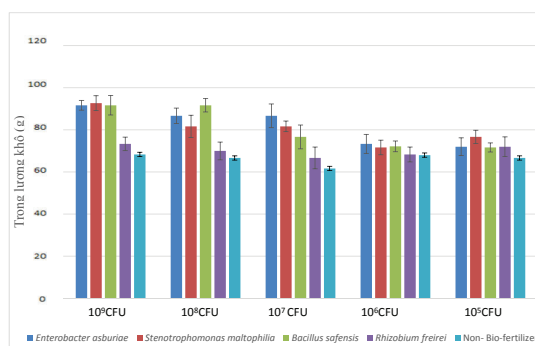
Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị có cùng ký tự đi kèm thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê; **: Khác biệt rất có ý nghĩa thống kê với $P < 0,01$.

Mật số vi khuẩn khác nhau của *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei* ảnh hưởng đến chiều dài rễ ($P < 0,01$). Mật số vi khuẩn càng cao thì càng gây ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của rễ. Mật số vi khuẩn 10^9 CFU cho kết quả chiều dài rễ dài nhất đạt 9,6 cm và thấp nhất là 10^5 CFU đạt 8,42 cm (hình 1).



Hình 1. Ảnh hưởng của mật số vi khuẩn đến chiều dài rễ của cây cao su giai đoạn vườn ươm.

Mật số vi khuẩn khác nhau của *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei* tạo nên sự khác biệt thống kê về trọng lượng khô của cây ($P < 0,01$). Mật số vi khuẩn ở 10^9 CFU cho kết quả trọng lượng khô cao nhất đạt 83,53 g và thấp nhất là 10^5 CFU đạt 70,69 g (hình 2).



Hình 2. Ảnh hưởng của mật số vi khuẩn lên trọng lượng khô của cây cao su giai đoạn vườn ươm.

Theo kết quả từ bảng 3, các chủng vi khuẩn cố định đạm ảnh hưởng đến chiều cao cây ($P < 0,01$). Tại tất cả các thời điểm khảo sát từ 30 ngày đến 150 ngày sau khi nảy mầm, các nghiệm thức được xử lý vi khuẩn cố định đạm đều gia tăng chiều cao cây. Trong bốn chủng vi khuẩn cố định đạm, các nghiệm thức được ủ với *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia* và *Bacillus safensis* luôn có ảnh hưởng gia tăng chiều dài thân nhiều hơn so với nghiệm thức được xử lý bởi chủng *Rhizobium freirei*.

Bảng 3. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn cố định đạm đến chiều cao cây cao su.

Nghiệm thức	Chiều cao cây sau nảy mầm (cm)				
	30 ngày	60 ngày	90 ngày	120 ngày	150 ngày
Đối chứng	28,35 ^b	47,53 ^b	66,95 ^c	98,85 ^c	131,86 ^b
<i>Enterobacter asburiae</i>	30,04 ^a	49,91 ^a	71,78 ^{ba}	106,70 ^{ba}	143,77 ^a
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	29,92 ^a	50,64 ^a	71,89 ^{ba}	107,99 ^a	144,37 ^a
<i>Bacillus safensis</i>	29,90 ^a	50,91 ^a	72,59 ^a	109,07 ^a	144,54 ^a
<i>Rhizobium freirei</i>	29,30 ^a	49,53 ^a	69,77 ^b	104,26 ^b	136,43 ^b
F	7,15 ^{**}	7,42 ^{**}	6,87 ^{**}	10,32 ^{**}	11,31 ^{**}
CV (%)	3,47	3,82	4,79	4,65	4,73

Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị có cùng ký tự đi kèm thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê; **: Khác biệt rất có ý nghĩa thống kê với $P < 0,01$.

Đánh giá đóng góp cố định đạm sinh học của các chủng vi khuẩn cố định đạm cho cây cao su

Bảng 4. Đóng góp của các chủng vi khuẩn cố định đạm cho cây cao su từ quá trình cố định đạm sinh học.

Nghiệm thức	% N-15 a.e	%Ndff	%Ndffs	%Ndffa
Đối chứng (NF)	1,68 ^a	31,57 ^a	68,43 ^a	0
Xử lý vi khuẩn (F):				
<i>Enterobacter asburiae</i>	0,88 ^c	16,54 ^c	35,84 ^c	47,62 ^a
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,9 ^c	16,91 ^c	36,66 ^c	46,43 ^a
<i>Bacillus safensis</i>	1,08 ^{ab}	20,30 ^b	43,99 ^b	35,71 ^b
<i>Rhizobium freirei</i>	1,03 ^{ab}	19,36 ^b	41,95 ^b	38,69 ^b
Urê - N - 15 (g)	5,321			
F	13,32 ^{**}	11,34 ^{**}	10,42 ^{**}	17,54 ^{**}
CV (%)	9,12	10,03	6,17	8,52

Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị có cùng ký tự đi kèm thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê; **: Khác biệt rất có ý nghĩa thống kê với $P < 0,01$.

Kết quả từ bảng 4 thể hiện, ở thời điểm kết thúc thí nghiệm - 120 ngày sau khi bón phân urê - ¹⁵N, NF và F có sự khác biệt thống kê ($P < 0,01$). Nghiệm thức đối chứng - NF luôn thu được hàm lượng ¹⁵Na.e cao hơn so với nghiệm thức

được xử lý 4 chủng vi khuẩn cố định đạm - F. Nghiệm thức xử lý bằng *Enterobacter asburiae* và *Stenotrophomonas maltophilia* cho kết quả %N có nguồn gốc từ không khí là 46,43- 47,62%, cao hơn so với nghiệm thức được xử lý bằng *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei* đạt 35,71- 38,69%. Điều này chứng tỏ khả năng cố định đạm trên cây cao su giai đoạn vườn ươm của chủng *Enterobacter asburiae* và *Stenotrophomonas maltophilia* cao hơn chủng *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei*.

Kết luận

Từ các kết quả nhận được trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

- *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei* là các chủng vi khuẩn cố định đạm rất có tiềm năng trong hỗ trợ phát triển của cây cao su ở giai đoạn vườn ươm.

- Cây cao su có thể thu lợi từ quá trình cố định N sinh học của *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei*.

- Khả năng cố định đạm trên cây cao su giai đoạn vườn ươm của chủng *Enterobacter asburiae* và *Stenotrophomonas maltophilia* cao hơn chủng *Bacillus safensis* và *Rhizobium freirei*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Y.T. Adiwiganda, A. Hardjono, A. Manurung, U.T.B. Sihotang, Darmandono Sudiharto, D.H. Goenadi, H. Sihombing (1994), *Manuring recommendation technique for rubber plantation*, Indonesian Rubber Research Institute.
- [2] Y.T. Adiwiganda, A.E. Siahaan, J.P. Peranginangin, S. Darminta (1995), "Review of rubber nursery aging in PT Goodyear Sumatra Plantations", *Indonesian Rubber Research Institute News*, **14**(2), pp.76-88.
- [3] B.B. Bohlool, J.K. Ladha, D.P. Garrity, T. George (1992), "Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: a perspective", *Plant and Soil*, **141**, pp.1-11.
- [4] M. Park, C. Wookim, J. Jan, H. Lee, W. Shin, S. Kim, T. Sa (2005), *Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria form rhizosphere of agricultural crop of Korea*, **160**, pp.127-133.
- [5] K. Djavanshir, Pourberk (1976), "Germination value: A new formula, Silva", *Genetica journal*, **25**, pp.79-83.
- [6] G. Hardarson (1990), "Use of nuclear techniques in studies of soil-plant relationships", *Training course series No. 2, IAEA-TSC2*, pp.41-52.