

NGHIÊN CỨU SỰ ĐA DẠNG VI SINH VẬT Ở MỘT SỐ MẪU ĐẤT CANH TÁC NÔNG NGHIỆP ĐIỂN HÌNH THU THẬP TỪ VÙNG ĐỒNG THÁP MƯỜI

Ngô Huy Kiên¹ Nguyễn Hùng Cường¹, Phùng Ngọc Trường², Bùi Thị Việt Hà^{3,*}

¹ Viện Quy hoạch và Thiết kế nông nghiệp

² Trung tâm Nghiên cứu và Quy hoạch môi trường

³ Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

* Email: buithivietha@hus.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm khảo sát thành phần và đa dạng của vi sinh vật đất ở vùng Đồng Tháp Mười (DTM). Mẫu đất thu thập từ ba tỉnh: Long An, Đồng Tháp và Tiền Giang trong khoảng từ tháng 6 - 12 năm 2022. Kết quả cho thấy, sự đa dạng của vi sinh vật trong các mẫu đất, với mẫu DT3 (tại xã Thường Lạc, huyện Hồng Ngự, tỉnh Đồng Tháp) là khu vực trồng lúa có mật độ vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm cao nhất. Phân tích metagenomics cho thấy, cổ khuẩn chiếm 5,7%, trong đó có 6 ngành, 11 lớp, 17 bộ, 21 họ và 24 chi. Vi khuẩn chiếm tỉ lệ lớn nhất với 94,3%, gồm 33 ngành, 90 lớp, 161 bộ, 300 họ và 587 chi. Phân tích vùng ITS xác định được 11 ngành, 32 lớp, 67 bộ, 131 họ, 185 chi và 230 loài của giới nấm.

Từ khoá: Đa dạng, vi sinh vật đất, Đồng Tháp Mười, Metagenomics.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi sinh vật trong đất đóng vai trò thiết yếu trong việc duy trì và cải thiện đặc tính của đất canh tác nông nghiệp. Chúng tạo ra một môi trường đất phong phú, giúp cân bằng và cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng cũng như bảo vệ sức khỏe của hệ sinh thái đất. Sự phân hủy chất hữu cơ bằng các sinh vật đất có ảnh hưởng lớn đến độ màu mỡ của đất và phát triển của cây trồng, cấu trúc của đất và chu trình các bon. Đánh giá sự đa dạng của vi sinh vật có thể chỉ ra sự khác biệt sâu sắc trong đất đối với các quần thể và chức năng của vi sinh vật.

Mặc dù chiếm phần lớn trong sinh quyển, nhưng hệ vi sinh vật đất và tương tác giữa chúng hầu hết chưa được nghiên cứu kỹ vì chỉ có một lượng nhỏ chúng có thể nuôi cấy được trên môi trường nhân tạo. Kỹ thuật metagenomics cung cấp một phương pháp mới để đánh giá thế giới vi sinh vật, được coi là một cuộc cách mạng của con người về hiểu biết toàn bộ thế giới sống và chức năng của chúng trong các hệ sinh thái khác nhau.

Trong nghiên cứu này, đã tập trung phân tích sự đa dạng của một số vi sinh vật trong đất nhằm

phần bằng công cụ metagenomics và bước đầu đánh giá được mức độ đa dạng ở các cấp của các nhóm vi sinh vật trong đất thu thập từ vùng DTM. Đây là khu vực có diện tích khoảng 730.000 ha, chiếm 70% diện tích của 3 tỉnh: Long An, Tiền Giang, Đồng Tháp, chiếm 18% diện tích đồng bằng sông Cửu Long. Đây là vùng đồng trũng với 42% diện tích là đất phèn. Các vi sinh vật trong đất bị nhiễm phèn đóng vai trò quan trọng trong việc cải thiện chất lượng đất, giúp hỗ trợ sự phát triển của cây trồng. Tuy nhiên, vi sinh vật cũng phải đối mặt với sự cạnh tranh với các vi sinh vật khác và với ảnh hưởng tiêu cực của phèn, dẫn đến một hệ sinh thái phức tạp và đa dạng.

Nghiên cứu này tập trung vào phân tích sự đa dạng của vi sinh vật trong đất phèn bằng công nghệ metagenomics. Được tiến hành trên mẫu đất thu thập từ khu vực DTM, nơi đất phèn chiếm tỷ lệ lớn. Vi sinh vật trong đất này đóng vai trò quan trọng trong việc cải thiện chất lượng đất và hỗ trợ sự phát triển của cây trồng. Tuy nhiên, chúng phải đối mặt với sự cạnh tranh và ảnh hưởng tiêu cực từ phèn, tạo ra một hệ sinh thái đa dạng và phức tạp.

Đây là bước đầu tiên để đánh giá sâu hơn về mức độ đa dạng của vi sinh vật trong môi trường canh tác nông nghiệp.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu đất: 16 mẫu đất thu thập tại khu vực

ĐTM gồm 3 tỉnh: Long An (LA) (huyện Tân Hưng, Vĩnh Hưng, thị xã Kiến Tường, Mộc Hoá, Tân Thạch, Đức Huệ và 7 xã phía Bắc của huyện Thủ Thừa và Bến Lức); tỉnh Đồng Tháp (ĐT) (huyện Hồng Ngự, Tân Hồng, Tam Nông, Thanh Bình, Cao Lãnh, Tháp Mười) và Tiền Giang (TG) (huyện Cái Bè, Cai Lậy, Châu Thành, Tân Phước).

Bảng 1. Các vị trí thu mẫu và đánh giá đại diện

STT	Ký hiệu	Vị trí lấy mẫu
1	LA 01	Khu vực trồng cây mai, xã Thạnh Lợi, huyện Bến Lức, tỉnh Long An
2	LA 02	Khu vực trồng chanh, xã Thuận Nghĩa Hòa, huyện Thạnh Hóa, tỉnh Long An
3	LA 03	Khu vực đất chuyên canh lúa, xã Nhơn Hòa, huyện Tân Thạnh, tỉnh Long An
4	LA 04	Khu vực đất trồng lúa, xã Tân Lập, huyện Mộc Hóa, tỉnh Long An
5	ĐT01	Khu vực trồng hỗn giao mít, sầu riêng, xã Tân Mỹ, huyện Thanh Bình, tỉnh Đồng Tháp
6	ĐT 02	Khu vực trồng xoài, xã Mỹ Xương, huyện Cao Lãnh, tỉnh Đồng Tháp
7	ĐT 03	Khu vực đất trồng lúa, xã Thường Lạc, huyện Hồng Ngự, tỉnh Đồng Tháp
8	ĐT 04	Khu vực trồng lúa, xã Tân Thành B, huyện Tân Hồng, tỉnh Đồng Tháp
9	ĐT 05	Khu vực trồng lúa, xã Tân Kiều, huyện Tháp Mười, tỉnh Đồng Tháp
10	TG 01	Khu vực trồng dừa, xã Mỹ Phước, huyện Tân Phước, tỉnh Tiền Giang
11	TG 02	Khu vực vườn cây ăn quả, xã Nhị Bình, huyện Châu Thành, tỉnh Tiền Giang
12	TG 03	Khu vực trồng lúa, xã Phú Nhuận, huyện Cai Lậy, tỉnh Tiền Giang
13	TG 04	Khu vực trồng mít, xã Mỹ Tân, huyện Cái Bè, tỉnh Tiền Giang
14	NH 1	Khu vực đất trồng lúa, xã Vĩnh Lợi, huyện Tân Hưng, tỉnh Long An
15	MH 2	Khu vực đất trồng lúa, xã Hưng Thạnh, huyện Tân Hưng, tỉnh Long An
16	MH 3	Khu vực trồng dưa hấu, xã Hưng Thạnh, huyện Tân Hưng, tỉnh Long An

Ghi chú: Thời gian lấy mẫu: 6 - 12/2022.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp lấy mẫu đất

Lựa chọn mẫu đất đại diện trên các loại đất canh tác nông nghiệp vùng ĐTM, mẫu đất tầng mặt (tầng canh tác) ở độ sâu từ 0 - 20 cm, theo TCVN 7538-2:2005 [1]. Mỗi khu vực canh tác nông nghiệp (đất phù sa): LA1, ĐT1, ĐT3, TG3; đất phèn: LA2, LA3, LA4, ĐT2, ĐT4, TG1, TG4, MH1, MH2, MH3; đất cát: ĐT5, TG2. Các mẫu phân tích sẽ được bảo quản tại nhiệt độ - 20°C.

2.2.2. Phương pháp xác định mật độ vi sinh vật

Mẫu đất được pha loãng trong NaCl 0,9% rồi cấy trải trên các đĩa môi trường NA (Nutrientagar), ISP4 và PDA với các điều kiện nuôi (Bảng 2). Sử dụng môi trường thương mại của Merck (Đức).

Các mẫu đất được tiến hành phân tích theo phương pháp đếm số lượng khuẩn lạc trên môi trường thạch đĩa phù hợp cho từng nhóm vi sinh vật. Tính số lượng N vi sinh vật có trong mẫu thử theo trung bình khối lượng từ hai độ pha loãng liên tiếp theo công thức:

$$N = \frac{(\sum C)}{V \times 1,1 \times d}$$

Trong đó: $\sum C$ là tổng số khuẩn lạc đếm được trên hai đĩa được giữ lại từ hai độ pha loãng liên tiếp, trong đó ít nhất một đĩa chứa tối thiểu 10 khuẩn lạc; V là thể tích chất cấy được đưa vào mỗi đĩa, tính bằng mililit (ml); d là độ pha loãng tương ứng với dung dịch pha loãng đầu tiên được giữ lại.

Bảng 2. Sử dụng môi trường thương mại của Merck (Đức)

Nhóm vi sinh vật	Môi trường nuôi cấy	Điều kiện nuôi cấy
Vi khuẩn	Nutrient agar	37°C trong 24 giờ
Xạ khuẩn	ISP4	28 - 30°C trong 120 giờ
Nấm mốc	PDA	25 - 30°C trong 72 giờ

2.2.3. Phân tích mức độ đa dạng bằng công cụ metagenomics

*Quy trình tách chiết DNA tổng số của mẫu đất

Các mẫu thuộc nhóm đất phèn thu về được trộn lẫn theo tỷ lệ bằng nhau để được một mẫu gọi là mẫu gộp (G). Sau đó, tiến hành tách chiết ADN tổng số trực tiếp từ mẫu đất gộp bằng bộ kit Dneasy PowerSoil Pro Kit của QUIAGEN (Đức). Kết quả tách chiết được kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch trên hệ thống máy quang phổ định lượng Eppendorf (Đức) và đã đạt yêu cầu để thực hiện bước tiếp theo.

* Phân tích 16S rRNA và ITS

Mẫu tách DNA được gửi đến LOBI Việt Nam để tiến hành các bước phân tích trình tự gen 16S

rRNA và ITS. Sử dụng công cụ Mothur phân tích dựa vào hai cặp mồi, thứ nhất là cặp mồi 16S rRNA mồi F (341F): (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') và mồi R (806R): (5'GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') [2].

Cặp mồi ITS-1: (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAA CAAGG-3'), R: ITS-2: (5'GCTGCGTTCTTCATCGA TGC-3').

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả xác định mật độ vi sinh vật trong các mẫu đất thu thập

Các vi sinh vật hiếu khí đóng vai trò quan trọng trong việc phân giải các hợp chất hữu cơ trong đất, tạo ra chất mùn và cải thiện độ phì nhiêu cũng như kết cấu của đất. Axit humic trong chất mùn, cùng với các thành phần khác, được biết đến với khả năng kích thích sự phát triển của hệ rễ cây, nâng cao khả năng đề kháng của cây trước bệnh hại và giúp chống chịu với các điều kiện môi trường bất lợi như: Nhiệt đới, lạnh, hạn hán, ẩm ướt và pH cao do phèn...[3]. Do đó, sự hiện diện và số lượng vi khuẩn hiếu khí là một trong những chỉ tiêu quan trọng để đánh giá chất lượng của đất.

Kết quả nghiên cứu trên các mẫu đất cho thấy, mật độ vi khuẩn tổng số dao động $2,3 \times 10^5$ CFU/g - $4,8 \times 10^6$ CFU/g trong 16 mẫu được phân tích. Sự chênh lệch về mật độ vi khuẩn tổng số giữa các mẫu không lớn, khoảng 10 lần. Mẫu có mật độ vi khuẩn tổng số thấp nhất là mẫu LA2 với $2,7 \times 10^5$ CFU/g, là loại đất phèn và đất xám bạc màu được thu thập tại tỉnh Long An. Trong khi đó, mẫu có mật độ vi khuẩn tổng số cao nhất là mẫu ĐT3 với $4,8 \times 10^6$ CFU/g, là mẫu đất được lấy từ tỉnh Đồng Tháp, nằm trong nhóm đất phù sa.

Bảng 3. Mật độ các vi sinh vật phân lập ở 16 mẫu đất thuộc khu vực ĐTM

STT	Tên mẫu	Mật độ vi khuẩn (CFU/g)	Mật độ xạ khuẩn (CFU/g)	Mật độ nấm (CFU/g)	Loại đất
1	LA1	$1,7 \times 10^6$	$1,5 \times 10^4$	$4,8 \times 10^4$	Đất phù sa
2	LA2	$2,7 \times 10^5$	0	$2,5 \times 10^4$	Đất phèn
3	LA3	$2,7 \times 10^6$	0	$5,6 \times 10^3$	Đất phèn
4	LA4	$4,4 \times 10^6$	0	$2,2 \times 10^4$	Đất phèn
5	TG1	$3,7 \times 10^5$	$1,6 \times 10^4$	$3,4 \times 10^4$	Đất phèn

STT	Tên mẫu	Mật độ vi khuẩn (CFU/g)	Mật độ xạ khuẩn (CFU/g)	Mật độ nấm (CFU/g)	Loại đất
6	TG2	$3,3 \times 10^6$	0	$4,6 \times 10^4$	Đất cát
7	TG3	$4,6 \times 10^6$	$2,8 \times 10^4$	$9,6 \times 10^4$	Đất phù sa
8	TG4	$2,3 \times 10^6$	0	$7,3 \times 10^3$	Đất phèn
9	ĐT1	$3,9 \times 10^6$	$1,4 \times 10^4$	$7,2 \times 10^4$	Đất phù sa
10	ĐT2	$2,4 \times 10^6$	0	$2,0 \times 10^4$	Đất phèn
11	ĐT3	$4,8 \times 10^6$	$1,1 \times 10^4$	$9,8 \times 10^4$	Đất phù sa
12	ĐT4	$3,4 \times 10^6$	$2,8 \times 10^2$	$5,8 \times 10^4$	Đất xám bạc màu
13	ĐT5	$3,4 \times 10^6$	0	$7,0 \times 10^4$	Đất cát
14	MH1	$2,3 \times 10^5$	0	$1,2 \times 10^4$	Đất phèn
15	MH2	$1,8 \times 10^6$	0	$2,7 \times 10^4$	Đất phèn
16	MH3	$1,6 \times 10^6$	0	$2,6 \times 10^4$	Đất phèn

Kết quả nghiên cứu của Phan Quốc Hưng (2017) [4] cho thấy, quần thể vi sinh vật hiếu khí trong đất trồng rau tại huyện Thanh Trì, thành phố Hà Nội là $4,68 \times 10^7$ CFU/g, trong khi ở vùng đất phù sa ven sông Hồng dùng để trồng khoai sọ là $7,48 \times 10^7$ CFU/g. Theo Aghedo S.O và cs (2022) [5] mật độ vi khuẩn cao nhất ở khu vực trồng cây cao su 28 năm tuổi tại Nigeria là $11,3 \times 10^6$ CFU/g. Như vậy, mật độ vi sinh vật hiếu khí ở các mẫu đất được khảo sát trong nghiên cứu này thấp hơn khoảng 10 lần so với mật độ của hai nghiên cứu trên. Phân tích mật độ vi sinh vật của các mẫu đất ở đồng bằng sông Cửu Long cho thấy, mật độ vi khuẩn phân lập khác nhau giữa các mẫu khác nhau. Trong đó, mẫu ĐT3 và TG3 có mật độ cao nhất ($2,8 \times 10^4$ CFU/g), trong khi mẫu vi khuẩn hiếu khí không thể phân lập được từ mẫu than bùn và đất xám. Các mẫu LA1, ĐT1, ĐT3, TG3 được thu thập từ các vùng đất phù sa, là loại đất màu mỡ nhất hiện nay, được bồi đắp bồi lắng từ dòng sông nên có khả năng giữ ẩm cực tốt, độ phì cao và nguồn dinh dưỡng dồi dào. Mẫu ĐT5 và TG2 được lấy ở vùng cát (cũng giàu dinh dưỡng). Những môi trường này thuận lợi cho vi sinh vật đất nói chung (thể hiện ở sự phong phú của giun đất và tuyến trùng đất được tìm thấy trong các mẫu đất) và vi khuẩn hiếu khí nói riêng, cho phép chúng phát triển. Các mẫu LA2, LA3, LA4, ĐT2, ĐT4, TG1, TG4, MH1, MH2, MH3 được thu thập ở các vùng đất phèn và đất xám bạc màu có tính axit, nghèo dinh dưỡng và có độc tính cao. Sự phân bố của xạ

khuẩn trong đất phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm: Độ phì của đất, hàm lượng dinh dưỡng, biện pháp canh tác, cấu trúc đất, độ ẩm, độ pH của đất... đất càng giàu, càng có nhiều chất hữu cơ và chất dinh dưỡng thì số lượng xạ khuẩn càng cao, càng đa dạng.

Nấm mốc là loại vi sinh vật ký sinh hoặc hoại sinh, chúng phổ biến trên mọi loại khí hậu (ôn đới, hàn đới, nhiệt đới) và phát triển quanh năm. Chúng gây hại cho mọi loại vật chất như: Đất, phân bón, trái cây, quần áo, cận thực vật, sản phẩm nông nghiệp và thậm chí là các vật dụng không có chất hữu cơ như: Kim loại, vật liệu quang học... Trên thực tế, nấm mốc gây tổn thất nghiêm trọng về chất lượng cho các sản phẩm nông nghiệp được lưu trữ trong kho hoặc bao bì. Nhiều loài nấm mốc phát triển trên các sản phẩm nông nghiệp như: Lúa, ngô, hạt lạc, đậu tương, gây biến đổi trong sản phẩm. Chúng làm hỏng hoa quả, rau cải, hạt ngũ cốc và tạo điều kiện cho sự phát triển của nhiều loại vi khuẩn khác, gây hại cho sản phẩm.

Dựa vào kết quả sau khi nuôi cấy, nấm mốc xuất hiện ít với mức độ đa dạng không cao (Bảng 3). Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Hải Đăng và Cao Thị Hoài (2021) [6] và của Chu Thị Thu Hà và cs (2020) [7] cho thấy, mật độ phân bố và số lượng nấm mốc trong hai nghiên cứu này tương đồng khá nhiều với các địa điểm được khảo sát trong nghiên cứu hiện tại.

3.2. Kết quả phân tích mức độ đa dạng vi sinh vật sử dụng công cụ metagenomics

Từ máy giải trình tự, thu được 4 file dữ liệu fastq, gồm 2 file đọc 2 chiều của đoạn nhân lên của đoạn V3V4 16S rRNA và ITS1. Kết quả đánh giá chất lượng giải trình tự bằng công cụ FastQC cho thấy, cả đoạn xuôi và ngược đều có chất lượng tốt, với điểm trung bình trên 30. Phân bố chiều dài cho thấy, đa số trình tự đọc có độ dài trên 220 bp, đủ để bao phủ đoạn trình tự vùng V3V4 16S rRNA (dài khoảng 422 bp) và đoạn ITS1 (dài khoảng 240 bp).

Từ dữ liệu fastq, các đoạn read R1 và R2 của trình tự V3V4 16S rRNA và ITS1 được ghép thành

các contig bằng công cụ make.contig của Mothur và tinh sạch bằng loạt bước loại bỏ các nucleotide không rõ, contig quá dài và contig trùng lặp. Sau đó, các contig được đóng hàng với cơ sở dữ liệu Silva và UNITEv8_sh_dynamic_s7 để phân loại. Các contig khác biệt nhau ít nhất 4 nucleotide (đối với 16S) và 2 nucleotide (đối với ITS1) được gộp lại. Các chimera sau đó được loại bỏ và các trình tự được phân nhóm thành OTUs với cut-off 0,03 (đối với 16S) và 0,05 (đối với ITS). Kết quả cho thấy, có 132.983 trình tự phân loại vi khuẩn và cổ khuẩn (đối với 16S) và 35.758 trình tự phân loại nấm (đối với ITS).

Bảng 4. Thống kê số trình tự sau khi xử lý

Tên mẫu	Tổng trình tự gốc	Tổng số trình tự sau khi loại bỏ chimera	Tổng số trình tự thuộc vi khuẩn, vi khuẩn cổ (với 16S) và nấm (với ITS)	Số OTUs
G1_16S	153.216	133.069	132.983	9.447
G1_ITS	179.530	128.802	35.758	508

3.2.1. Chỉ số đa dạng Alpha

Để đánh giá độ đa dạng Alpha, đường cong hiếm hoá (rarefaction curves) được sử dụng để biểu diễn số lượng OTU quan sát được dựa trên kích thước mẫu con. Đường cong này thể hiện số lượng loài (OTU) so với số lượng cá thể được lấy mẫu (tức là số lượng trình tự). Thường thì đường cong bắt đầu với độ dốc lớn, sau đó dần trở nên phẳng khi số loài phát hiện trên mỗi mẫu ít hơn và độ dốc của đường cong giảm dần, biểu thị rằng mẫu đã bắt đầu bão hòa và đóng góp ít hơn vào tổng số OTU.

Chỉ số đa dạng Alpha như: Good's coverage, Shannon, Simpson, Chao và ACE index được tính toán với rarefaction point là 53.398 (số trình tự nhỏ nhất trong mẫu). Chỉ số Good's coverage thể hiện mức độ bao phủ của dữ liệu đọc trình tự. Một Good's coverage index bằng 0,96 ngụ ý rằng 4% số read thuộc về các OTU chỉ xuất hiện 1 lần duy nhất trong mẫu. Khi Good's coverage gần bằng 1, độ bao phủ loài của mẫu càng tốt. Các chỉ số Alpha diversity được tính toán trên dữ liệu trình tự gốc (chưa loại bỏ trình tự hiếm).

Bảng 5. Thống kê chỉ số đa dạng Alpha

Mẫu	Số trình tự	Số OTUs	Good's coverage index	Chỉ số Shannon	Chỉ số Simpson	Chỉ số Chao1
G_16S	132.983	9.447	0,96	6,70	0,006	23.417
G_ITS	35.758	508	0,99	3,47	0,072	847

3.2.2. Phân loại taxonomy

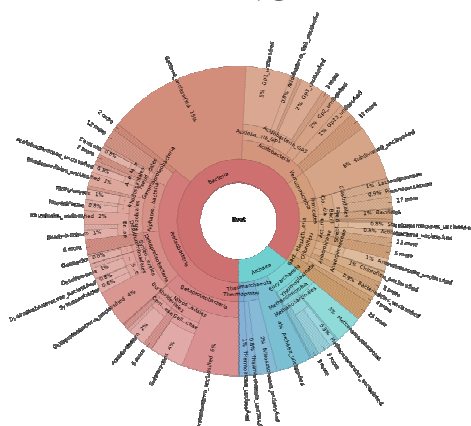
Các chỉ số Shannon, Simpson và mức độ bao phủ được áp dụng để phản ánh sự phân bố đa dạng của cộng đồng vi sinh vật. Chỉ số Shannon cao hơn thể hiện một mức độ đa dạng cao hơn trong hệ

thống sinh học, trong khi chỉ số Simpson cao hơn chỉ ra một mức độ đa dạng thấp hơn. Chỉ số Chao1 được sử dụng để ước lượng số lượng OTU trong cộng đồng, từ đó phản ánh sự phong phú của cộng đồng vi sinh vật. Ngoài ra, Chỉ số Chao1 thường

được sử dụng để ước tính tổng số loài có mặt trong một cộng đồng vi sinh vật. Một giá trị Chao1 cao hơn thể hiện một mức độ giàu có cao hơn của cộng đồng.

Bảng 5 cho thấy, mẫu G_16S và G_ITS có sự phong phú về số lượng và đa dạng của các loài vi khuẩn và nấm. Để minh họa thành phần taxonomy ở các cấp độ khác nhau, một biểu đồ Krona được tạo ra (Hình 1).

3.2.3. Phân tích trình tự gen 16S rRNA



Hình 1. Biểu đồ Krona thành phần vi khuẩn và vi khuẩn cổ mẫu G

Kết quả thành phần loài xác định được bằng giải trình tự gen 16S rRNA cho thấy, các loài phân bố khá đồng đều trong mẫu đất. Ở cấp độ giới, vi khuẩn chiếm đa số (94,3%) và cổ khuẩn chiếm tỉ lệ 5,7%.

3.2.4. Giới cổ khuẩn

Giới cổ khuẩn có 6 ngành, 11 lớp và 17 bộ. Mẫu đất G có các ngành điển hình của giới cổ khuẩn, Euryarchaeota (2,40%) và Archaea (1,84%), Thaumarchaeota (0,59%), Crenarchaeota (0,48%), Pacearchaeota (0,24%), Woesearchaeota (0,11%). Ngành Euryarchaeota theo truyền thống được gọi là methanogens, thường tham gia vào chu trình lưu huỳnh, nitơ và sắt bên cạnh quá trình chuyển đổi hydrocarbon. Bao gồm: 2 lớp cổ khuẩn sinh methane Methanobacteria (0,08%) và Methanomicrobia (0,07%) điển hình cho các vùng đất ngập nước; lớp Thermoplasmata (1,59%), là sinh vật ưa axit, phát triển tối ưu ở độ pH dưới 2, hầu hết Thermoplasmata đều ưa nhiệt.

Lớp Nitrososphaerales (0,24%) và Woesearchaeota_Incertae_Sedis_AR16(0,18%) là các sinh vật được xác định cho đến nay là sinh vật oxy hóa amoniac hóa tự dưỡng và có thể đóng vai trò quan trọng trong các chu trình sinh địa hóa, chẳng hạn như chu trình nitơ và chu trình các bon.

Mẫu có sự tồn tại của Desulfurococcales (0,04%), đây là một bộ gồm một số chi đều là sinh vật ưa nhiệt, tự dưỡng sử dụng năng lượng hóa học, điển hình là bằng cách khử các hợp chất lưu huỳnh bằng hydro.

Các bộ có khả năng sinh methane có độ đa dạng cao nhất với 6 bộ: Methanobacteriales (0,07%), Methanocellales (0,61%), Methanomicrobia_unclassified (0,14%), Methanomicrobiales (0,17%), Methan-osarcinales (0,67%), Methanomassiliicoccales (0,52%). Hầu hết Methanomassiliicoccales chỉ sử dụng metanol để tạo ra khí methane, nhưng chúng có khả năng sử dụng nhiều hợp chất, chẳng hạn như metanol, dimethylamine, trimethylamine, dimethyl sulfide và axetat. Methanocellales tạo ra khí methane bằng cách khử các bon dioxit hoặc axetat. Ở cấp độ thấp hơn, G có 21 họ, 24 chi. Bộ Methanomicrobiales gồm hai Họ: Methanoregulaceae (0,14%) và Methanospirillaceae (0,13%). Methanospirillum tạo ra khí methane bằng cách khử các bon dioxit, formate hoặc axetat và sinh sôi nảy nở nhanh chóng ở nồng độ các bon dioxit cao. Methanoregula phát triển mạnh ở độ pH cực thấp, điều này có thể cho thấy mẫu đất G có thể nhiễm phèn nghiêm trọng.

Họ Methanosarcinaceae (0,04%) là những sinh vật sinh methane kết hợp axit amin pyrrolysine bất thường vào các enzym của chúng, Methanotrichaceae (0,14%) và Methanosarcinales_unclassified (0,17%) thuộc Bộ Methanosarcinales. Nhóm cổ khuẩn sinh methane là nhóm chiếm ưu thế (2,4%) trong giới cổ khuẩn, đặc trưng cho vùng đất ngập nước.

Giới cổ khuẩn bao gồm 6 ngành, 11 lớp và 17 bộ. Mẫu đất G hiện có sự hiện diện của các ngành đặc trưng của giới cổ khuẩn, bao gồm Euryarchaeota (2,40%), Archaea (1,84%), Thaumarchaeota (0,59%), Crenarchaeota (0,48%), Pacearchaeota (0,24%) và Woesearchaeota (0,11%).

Ngành Euryarchaeota thường được biết đến với vai trò sinh methan, tham gia vào các chu trình lưu huỳnh, nitơ và sắt cùng với việc chuyển đổi hydrocacbon.

Trong số các lớp, Thermoplasmata (1,59%) là một loại cổ khuẩn ưa axit, phát triển tốt ở độ pH thấp. Lớp Nitrososphaerales (0,24%) và Woesearchaeota_Incertae_Sedis_AR16 (0,18%) có khả năng oxy hóa amoniac và có thể đóng vai trò trong các chu trình sinh địa hóa như chu trình nitơ và các bon. Desulfurococcales (0,04%) là một bộ gồm nhiều chi các sinh vật ưa nhiệt, tự dưỡng sử dụng năng lượng hóa học bằng cách khử các hợp chất lưu huỳnh.

Các bộ có khả năng sinh methan đạt độ đa dạng cao nhất với 6 bộ: Methanobacteriales (0,07%), Methanocellales (0,61%), Methanomicrobia_unclassified (0,14%), Methanomicrobiales (0,17%), Methanosarcinales (0,67%) và Methanomassiliicoccales (0,52%). Họ Methanospirillaceae (0,13%) và Methanoregulaceae (0,14%) thuộc Bộ Methanomicrobiales. Họ Methanosarcinaceae (0,04%) kết hợp axit amin pyrrolysine vào enzym của chúng. Nhóm cổ khuẩn sinh methane chiếm tỷ lệ cao nhất (2,4%) trong giới cổ khuẩn, đặc trưng cho vùng đất ngập nước.

3.2.5. Giới vi khuẩn

Giới vi khuẩn chiếm phần lớn (>94%) với 33 ngành, 90 lớp, 161 bộ, 300 họ và 587 chi. Các ngành phổ biến nhất bao gồm: Proteobacteria (32,37%), Firmicutes (10,85%), Acidobacteria (9,52%), Verrucomicrobia (5,3%), Actinobacteria (5,25%), Chloroflexi (4,27%) và Bacteroidetes (3,02%). Ở cấp lớp, các lớp phổ biến bao gồm Deltaproteobacteria (13,63%), Betaproteobacteria (8,16%), Clostridia (7,44%), Acidobacteria_Gp1 (2,79%), Acidobacteria_Gp13 (1,13%), Acidobacteria_Gp3 (2,09%), Actinobacteria (2,89%), Thermoleophilia (1,19%), Bacteroidia (1,53%), Anaerolineae (1,52%), Ktedonobacteria (1,26%), Bacilli (2,15%) và nhiều Lớp khác.

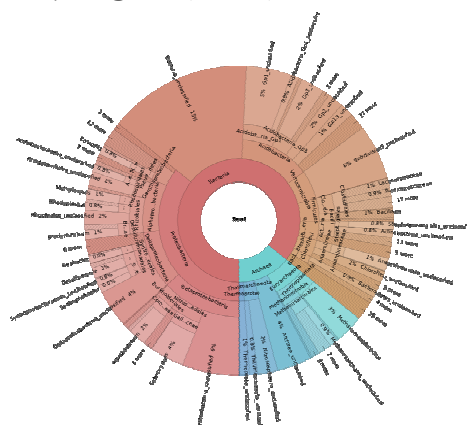
Ở cấp bộ, Clostridiales (7,21%), Syntrophobacteriales (4,08%), Myxococcales (2,35%), Nitrosomonadales (2,05%), Bacillales (1,99%), Rhodospirillales (1,97%), Burkholderiales (1,74%), Rhizobiales (1,66%), Bacteroidales

(1,53%), Anaerolineales (1,37%), Desulfuromonadales (1,32%), Ktedonobacteriales (1,14%) và nhiều Bộ khác có phần trăm phân bố nhỏ (<1%).

Ở cấp chi, *Sideroxydans* (0,94%), *Syntrophobacter* (0,93%), *Desulfomonile* (0,83%), *Geobacter* (0,79%), *Gaiella* (0,55%), *Aquicella* (0,47%), *Anaeromyxobacter* (0,43%), *Hydrogenispora* (0,23%), *Thermoanaerobaculum* (0,22%), *Bacillus* (0,06%) và *Streptomyces* (0,02%) được phát hiện. Đa số các chi vi khuẩn trong mẫu là kỵ khí, tuy nhiên, mẫu cũng chứa các chi có khả năng cố định đạm, cộng sinh với rễ cây để tăng cường nguồn nitơ cho cây và tham gia vào các chu trình sinh hóa khác như sản xuất ethanol-hydro. Chi *Bacillus* và *Streptomyces* chiếm tỷ lệ rất nhỏ trong mẫu (Bảng 3). Xạ khuẩn không xuất hiện ở hầu hết các mẫu đất nhiễm phen. Theo một nghiên cứu tương tự của tác giả Hegyi, A. và cs (2021) khi phân tích metagenomics về sự đa dạng của các chi vi khuẩn trong đất nông nghiệp tại Quảng Trị, Việt Nam cho thấy nhóm Frimicutes, Proteobacteria và Chloroflexi là những họ chiếm ưu thế nhất trong các mẫu đất phân tích. Tuy nhiên, mức độ chiếm ưu thế của các nhóm vi khuẩn sẽ phụ thuộc vào các đặc điểm sinh học của từng mẫu đất [8].

3.2.6. Phân tích trình tự ITS

Kết quả thành phần loài xác định được bằng giải trình tự vùng ITS (Hình 2).



Hình 2. Thành phần phần trăm theo bậc phân loại của nấm có trong mẫu G

Vùng gen ITS hiện được sử dụng rộng rãi để nghiên cứu đa dạng và xác định nhiều loài nấm. Vì tốc độ đột biến trong vùng ITS thường tương ứng

với tốc độ biệt hóa loài, nó được xem như "mã vạch - barcoding" cho nấm. Trong mẫu G, giới nấm có 11 ngành, 32 lớp, 67 bộ, 131 họ, 185 chi và 230 loài.

Ở cấp độ lớp, các lớp chiếm nhiều nhất là Sordariomycetes (25%), Eurotiomycetes (21,3%), Dothideomycetes (10,4%), Agaricomycetes (9,6%), Mortierellomycetes (2,6%), Rozellomycota (2%), Glomeromycetes (1,6%), Kickxellomycetes (1,2%), Mucoromycetes (1,2%),... Ở cấp độ bộ, Eurotiales (15,9%), Pleosporales (7,7%), Capnodiales (1,2%), Onygenales (1,6%), Conioscyphales (1,2%), Hypocreales (4,3%), Sordariales (5,5%), Thelephorales (1,4%), Xylariales (1,2%), Agaricales (2%), Polyporales (1,8%), Glomerales (1,6%), Mortierellales (2,6%)... Ở cấp độ chi, các chi phân bố khá đồng đều nhau, tuy nhiên có một số chi chiếm tỷ lệ phần trăm lớn như: *Talaromyces* (4,7%), *Penicillium* (4,3%), *Aspergillus* (2,4%), *Mortierella* (2,4%), *Westerdykella* (1,8%), *Ramicaldelaber* (1,2%)... Số lượng các loài nấm có trong mẫu G tương đối nhiều và đồng đều nhau.

Trong mẫu G, một số loài nấm gây hại bao gồm: *Aspergillus aculeatus* (0,2%) được coi là tác nhân gây bệnh thực vật và thường có thể được phân lập từ trái cây thối rữa và đất. *Aspergillus flavus* (0,2%) gây hư hỏng cho các loại ngũ cốc, hạt đậu,... sau khi thu hoạch. *Aspergillus penicillioides* (0,2%) được biết đến như một tác nhân gây hại. *Aspergillus terreus* (0,2%) có thể gây nhiễm trùng cơ hội ở những người có hệ thống miễn dịch kém. Chúng đề kháng với amphotericin B, một loại thuốc chống nấm phổ biến. *Penicillium citreonigrum* (0,2%) tạo ra độc tố nấm citreoviridin, có liên quan đến bệnh beriberi hoặc bệnh "lúa vàng" khi gạo bị nhiễm độc sau khi thu hoạch được tiêu thụ. *Fusarium acutatum* (0,2%) có thể gây hoại tử ở bàn chân ở bệnh nhân đái tháo đường. *Thanatephorus cucumeris* (0,2%) gây ra các tổn thương trên tất cả các bộ phận của cây ở trong hoặc gần đất. Nhiễm trùng sớm ở các đỉnh đang phát triển của rễ, lây nhiễm các bộ phận của cây tiếp xúc với đất và từ đó có thể phát triển lên trên, vết bệnh màu nâu và thối trên quả có màu nâu, úng nước và trũng xuống. Bệnh cũng có thể xuất hiện ở kho bảo quản, như củ khoai tây bị đóng vảy (vảy đen), các triệu chứng có thể khác nhau giữa các loại cây trồng... Một số loài nấm có

lợi như: *Penicillium oxalicum* (0,2%) tạo ra axit secalonic D, chitinase, axit oxalic, oxaline và β -N acetylglucosaminidase và xuất hiện phổ biến trong thực phẩm, có thể được sử dụng để chống lại các bệnh có nguồn gốc từ đất như bệnh sương mai ở cà chua. *Penicillium parvum* (0,2%) có khả năng sinh ferrichrome siderophore, một hợp chất tiềm năng đang được nghiên cứu. *Penicillium simplicissimum* (0,2%) có thể thúc đẩy tăng trưởng ở thực vật. *Trichoderma virens* (0,2%) một loại nấm có lợi cho cây trồng, tăng cường sản xuất sinh khối và thúc đẩy sự phát triển của rễ bên. *Cladorrhinum flexuosum* (0,2%) trong các giống khoai tây dextrose, loại nấm có khả năng sản xuất triacontanol và indole-3-carboxaldehyde, cả hai đều có đặc tính kháng khuẩn có thể giúp ngăn ngừa bệnh của vật chủ. *Nigrospora oryzae* (0,2%), có khả năng sinh chất kháng nấm gây bệnh cho thực vật...

4. KẾT LUẬN

Sơ bộ xác định về độ đa dạng của các mẫu đất với từng nhóm vi sinh vật nuôi cấy được từ 16 mẫu đất thuộc 3 tỉnh: Long An, Tiền Giang và Đồng Tháp. Mẫu DT3 (ở xã Thường Lạc, huyện Hồng Ngự, tỉnh Đồng Tháp) là khu vực đất chủ yếu trồng lúa (đất phù sa), có độ đa dạng cao nhất với mật độ vi khuẩn tổng số là $4,8 \times 10^6$ CFU/g, mật độ xạ khuẩn đạt $1,1 \times 10^4$ (CFU/g), mật độ nấm là $9,8 \times 10^4$ (CFU/g), thấp nhất trong các mẫu đất bị nhiễm phèn.

Kết quả phân tích metagenomics, có thể nhận thấy:

- Số lượng vi sinh vật thực tế lớn hơn rất nhiều so với số lượng vi sinh vật nuôi cấy được.

- Kết quả phân tích trình tự gen 16S rRNA cho thấy, cổ khuẩn chiếm 5,7% với 6 ngành, 11 lớp, 17 bộ, 21 họ và 24 chi, trong khi vi khuẩn chiếm 94,3% với 33 ngành, 90 lớp, 161 bộ, 300 họ và 587 chi. Phân tích vùng ITS xác định được giới nấm bao gồm 11 ngành, 32 lớp, 67 bộ, 131 họ, 185 chi và 230 loài.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện và hoàn thành nhờ sự hỗ trợ của Đề tài: "Nghiên cứu xây dựng bộ chỉ thị sinh học đánh giá chất lượng đất phục vụ canh tác nông nghiệp bền vững vùng Đồng Tháp Mười", mã số DTĐL.CN-61/21. Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7538 - 2:2005, (ISO 10381 - 2:2002), Chất lượng đất – Lấy mẫu – Phần 2: hướng dẫn kỹ thuật lấy mẫu.
2. Walters W, Hyde E. R, Berg-Lyons D, Ackermann G, Humphrey G, Parada A, Gilbert J. A, Jansson J. K, Caporaso J. G, Fuhrman J. A, Apprill A, Knight R (2015). Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. *mSystems*. Dec 22; 1(1):e00009 - 15. doi: 10.1128/mSystems.00009-15. PMID: 27822518; PMCID: PMC5069754.
3. Li, X., Du, J. & Long, H (2019). Dynamic analysis of international green behavior from the perspective of the mapping knowledge domain. *Environ Sci Pollut Res* 26, 6087 - 6098. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-04090-1>.
4. Phan Quốc Hưng (2017). Thành phần và số lượng vi sinh vật trong các loại sử dụng đất nông nghiệp ô nhiễm kim loại nặng ven các khu công nghiệp thành phố Hà Nội. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. Số 19, trang 69 - 75
5. Aghedo S. O, A. T. Adekunle, R. O. Okundia, U. Eseimuede and J. A. Omorogbe (2022). Assessment of soil microbial diversity of difernet rubeer plantation age, *Journal of Agriculture and Agricultural Technology*, 8(1), 151 - 157.
6. Nguyễn Hải Đăng, Cao Thị Hoài (2021). Đặc điểm vi sinh vật (vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm mốc) đất rừng Khộp tại huyện Buôn Đôn, tỉnh Đắk Lắk. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Tây Nguyên*. Số 47, trang 14 - 20.
7. Chu Thị Thu Hà, Lê Thị Minh Thành, Hà Thị Quyến (2020). Môi trường và phát triển bền vững, điều tra vi sinh vật trong đất nông nghiệp và nước tưới ở một số xã thuộc tỉnh Hưng Yên. *Hội thảo CRES 2020: Môi trường và phát triển bền vững*, 357 - 365.
8. Hegyi, A., Nguyen, T. B. K., Posta, K. (2021). Metagenomic analysis of bacterial communities in agricultural soils from Vietnam with special attention to phosphate solubilizing bacteria. *Microorganisms* (9), 1796.

STUDYING MICROBIAL DIVERSITY IN SOME SOIL SAMPLES TYPICAL AGRICULTURAL CULTIVATION AND COLLECTION FROM THE DONG THAP MUOI REGION

Ngô Huy Kien¹, Nguyen Hung Cuong¹, Phung Ngoc Truong², Bui Thi Viet Ha³

¹ National Institute of Agricultural Planning and Projection

² Center for Research and Environmental Planning

³ VNU University of Science

Summary

This study aims to survey the research components and diversity of soil microorganisms in the Dong Thap Muoi region. Soil samples collected from three provinces Long An, Dong Thap and Tien Giang during the period from June to December 2022. The results showed the diversity of microorganisms in the soil samples, with sample DT3 (at Thuong Lac commune, Hong Ngu district, Dong Thap province) is the rice growing area with the highest density of bacteria, actinomycetes and fungi. Metagenomics analysis shows that archaea account for 5.7%, including 6 phylum, 11 classes, 17 prders, 21 families and 24 genera. Residential micro-areas use the largest proportion with 94.3%, including 33 branches, 90 classes, 161 orders, 300 families and 587 branches. The subdivision is defined as 11 phylum, 32 classes, 67 orders, 131 families, 185 genera and 230 groups of the Kingdom of Fungi.

Keywords: Diversity, soil microorganisms, Dong Thap Muoi, Metahenomics.

Ngày nhận bài: 16/2/2024

Ngày chuyển phản biện: 19/3/2024

Ngày thông qua phản biện: 15/4/2024

Ngày duyệt đăng: 20/6/2024