



PHÂN LẬP CÁC DÒNG VI KHUẨN NỘI SINH CÓ KHẢ NĂNG TỔNG HỢP IAA VÀ CÓ ĐỊNH ĐẠM TRÊN CÂY CHUỐI

Nguyễn Thị Huỳnh Như¹, Nguyễn Hữu Hiệp¹, Nguyễn Minh Đời¹, Trần Nguyễn Nhật Khoa¹ và Thái Trần Phương Minh¹

¹ Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 07/03/2013

Ngày chấp nhận: 20/08/2013

Title:

Isolation of IAA synthesis and nitrogen fixing bacterial strains associated with banana

Từ khóa:

Achromobacter sp., cố định đạm indole acetic acid, *Pseudomonas aeruginosa*, vi khuẩn nội sinh

Keywords:

Achromobacter sp., endobacterial, indole acetic acid, nitrogen fixing, *Pseudomonas aeruginosa*

ABSTRACT

Application of bio-fertilizer has been interested in order to replace chemical fertilizers because biofertilizer could support high yield and keep the environment clean. In this research, 43 endobacterial strains were isolated from roots of banana planted in some provinces of Mekong delta such as Can Tho city, and Vinh Long, Ben Tre, Tra Vinh and Hau Giang provinces. Among them, 25 strains were isolated on NFb medium and 18 strains were isolated on Baz medium. The morphological characteristics of colonies were circular shape, raised elevation, smooth margin, milky white or pure white on NFb medium, white or yellow on Baz medium; almost bacterial cells had rod shape, motile, Gram negative. All strains were able to fix nitrogen and synthesized indole acetic acid (IAA). Two strains N5 and N12 had the highest ability of N-fixing with 3.16 $\mu\text{g/ml}$ and 4.85 ppm of NH_4^+ concentration, respectively, while two strains D1 and D5 gave highest concentration of IAA at 3.16 $\mu\text{g/ml}$ and 4.85 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Comparing the nucleotide sequences in 16S ribosomal DNA with the gene bank database, the strain N12 was determined as *Achromobacter* sp. with 97% homogeneous level and the strain D1 was *Pseudomonas aeruginosa* with 94% homogeneous level.

TÓM TẮT

Sử dụng phân bón vi sinh để thay thế cho phân bón hóa học là vấn đề đang được quan tâm và chú ý vì phân bón vi sinh không những giúp nâng cao năng suất cây trồng mà còn thân thiện với môi trường. Trong nghiên cứu này, 43 dòng vi khuẩn nội sinh đã được phân lập từ rễ chuối trồng tại một số tỉnh đồng bằng sông Cửu Long như Cần Thơ, Vĩnh Long, Bến Tre, Trà Vinh và Hậu Giang. Trong số các dòng này có 25 dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường NFb và 18 dòng được phân lập từ môi trường Baz. Các dòng vi khuẩn có đặc điểm: Khuẩn lạc có dạng tròn, độ nổi mô, bìa nguyên, chủ yếu có màu trắng sữa hoặc trắng trong trên môi trường NFb và màu trắng hoặc vàng trên môi trường Baz, tế bào có chiều dài dao động trong khoảng 0,5-2,5 μm và chiều rộng dao động trong khoảng 0,5-2 μm , đa số hình que, chuyển động, Gram âm. Tất cả các dòng vi khuẩn phân lập được đều có khả năng tổng hợp chất kích thích tăng trưởng indole acetic acid (IAA) và cố định đạm. Khảo sát khả năng tổng hợp NH_4^+ , các dòng N5 và N12 cho kết quả cao nhất với nồng độ NH_4^+ lần lượt là 3,16 $\mu\text{g/ml}$ và 4,85 $\mu\text{g/ml}$. Trong khi đó các dòng vi khuẩn trên môi trường NFb cho kết quả tổng hợp IAA tốt hơn, hai dòng D1 và D5 cho kết quả cao nhất với nồng độ IAA lần lượt là 3,16 $\mu\text{g/ml}$ và 3,07 $\mu\text{g/ml}$. So sánh mức độ tương đồng chuỗi nucleotide 16S rDNA, dòng N12 được xác định là vi khuẩn *Achromobacter* sp. với độ tương đồng 97%, dòng D1 là *Pseudomonas aeruginosa* với độ tương đồng 94%.

1 GIỚI THIỆU

Ngày nay, việc tìm ra những nguồn nguyên liệu mới để giải quyết vấn đề an ninh năng lượng cũng như hạn chế ô nhiễm môi trường trở nên cấp thiết hơn bao giờ hết. Các chuyên gia nghiên cứu đến từ Trường Đại học Queen, Belfast, Bắc Ai-Len là những người đi tiên phong trong việc khai thác, sử dụng kỹ thuật mới để sản xuất, chế tạo các sản phẩm nhựa dẻo từ cây chuối (<http://www.khoahocphattrien.com.vn>).

Bên cạnh đó, chuối là cây trồng thích hợp với điều kiện khí hậu nước ta. Sản lượng chuối ở nước ta cũng khá cao, theo thống kê năm 2010 diện tích trồng chuối khoảng 100000 ha với sản lượng gần 1,4 triệu tấn (<http://www.cesti.gov.vn>). Ngoài việc tiêu thụ nội địa, chuối còn được xuất khẩu một lượng khá lớn.

Trong chiến lược xuất khẩu hàng nông sản đến năm 2020, Bộ Công thương có đề cập đến việc xuất khẩu chuối và xem đây là một mặt hàng quan trọng mà Việt Nam có nhiều lợi thế. Theo đề án quy hoạch phát triển rau quả, hoa và cây cảnh đến năm 2010, tầm nhìn 2020 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, chuối được nhiều địa phương chọn làm cây chủ lực (<http://vneconomy.vn>).

Phân bón và thuốc hóa học ngày càng được nông dân ưa chuộng và sử dụng đến mức dư thừa. Điều này chẳng những làm tiêu tốn tiền bạc mà còn gây tác hại đến đất trồng, nguồn nước,... và làm cho môi trường bị ô nhiễm và đặc biệt, ảnh hưởng trực tiếp đến cuộc sống con người cũng như những sinh vật sống trong môi trường.

Nhằm thay thế cho phân hoá học và tránh gây ô nhiễm môi trường, tiết kiệm chi phí sản xuất, việc sử dụng các loại phân bón sinh học có chứa các giống vi sinh vật có khả năng tiết ra kích thích tố tăng trưởng giúp tăng thể tích và số lượng rễ làm cho cây trồng có khả năng hấp thu tốt chất dinh dưỡng để có thể sinh trưởng và phát triển tốt ngày càng được sử dụng rộng rãi, trong đó kích thích tố IAA (indole acetic acid) đang được mọi người quan tâm.

Mục tiêu đề tài: Phân lập một số dòng vi khuẩn nội sinh trên cây chuối có khả năng tổng hợp IAA và cố định đạm tốt làm tiền đề cho việc sản xuất phân bón vi sinh nhằm tăng năng suất cây trồng.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện

Nguyên liệu: Mẫu rễ chuối già và chuối xiêm được thu tại Bến Tre, Trà Vinh, Vĩnh Long và Hậu Giang.

Hóa chất: Cồn tuyệt đối (Việt Nam), NaOH (Việt Nam), NaCl (Trung Quốc), CaCl₂ (Trung Quốc) KH₂PO₄, K₂HPO₄ (Trung Quốc), NaFe EDTA (Merk),...

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phân lập các chủng vi khuẩn

Mẫu rễ chuối được lấy từ vị trí thân chính và đào dần ra ngoài đến chóp tận cùng của rễ, rửa kỹ bằng nước, ngâm trong nước rửa chén khoảng 5 phút sau đó để khô. Tiến hành cắt mẫu thành những đoạn dài khoảng 5-7 cm rồi rửa mẫu dưới vòi nước đang chảy trong 5 phút. Ngâm mẫu trong Tween 20, cồn 70°, H₂O₂ 10 %. Dùng cối sứ để nghiền mẫu cho vi khuẩn bên trong mẫu thoát ra ngoài, dùng chày khuấy đều và ép nước mẫu ra. Pha loãng mẫu 10 lần. Sau đó hút 50 µL dịch vi khuẩn cho vào môi trường bán đặc NFb và Baz. Ủ 2-3 ngày, đến khi thấy vòng sáng (pellicle) là dấu hiệu sự phát triển của vi khuẩn nội sinh. Cây chuyển nhiều lần để tách ròng vi khuẩn. Quan sát hình dạng, khả năng chuyển động và tiến hành nhuộm Gram các dòng vi khuẩn đã phân lập.

2.2.2 Xác định khả năng tổng hợp IAA của vi khuẩn bằng phương pháp Salkowski (Glickmann và Dessaux, 1995)

Nhân sinh khối các dòng vi khuẩn đã tách ròng vào môi trường Baz và NFb lỏng, thí nghiệm lặp lại 3 lần.

Ủ lắc các vi khuẩn trên máy lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ phòng, trùm kín các ống nghiệm để tránh IAA sinh ra bị ánh sáng phân hủy.

Định lượng IAA vào các ngày 2, 4, 6, 8 sau khi chủng.

– Xây dựng đường chuẩn IAA: cân 0,0016g IAA tổng hợp hòa tan với 10 mL photphat buffer được dung dịch IAA stock có nồng độ 160 µg/mL. Sau đó pha loãng stock bằng photphat buffer để được các nồng độ 0; 5; 10; 20; 30; 40 µg/mL.

– Tạo phản ứng màu hồng ở các mẫu: Ly tâm mẫu 5.500 vòng/phút trong thời gian 5 phút.

Chuẩn bị 3 ống nghiệm cho mỗi mẫu. Cho vào mỗi ống 2 mL thuốc thử Salkowski, 1 mL mẫu (phần trong sau ly tâm). Trộn đều dung dịch trong ống nghiệm trên máy vortex và để khoảng 15 - 30 phút ở nhiệt độ phòng.

– Đo hàm lượng IAA: Hàm lượng IAA được xác định bằng cách đo cường độ hấp thu màu (OD) ở bước sóng 530 nm. Dựa vào phương trình đường chuẩn và giá trị OD của mẫu tính ra hàm lượng IAA trong các mẫu vi khuẩn.

2.2.3 Đo đạm (NH_4^+) bằng phương pháp Indophenol blue (Alexander, 1965)

Nguyên tắc: xác định nồng độ NH_4^+ nhờ phản ứng giữa phenol và NH_3 dưới sự hiện diện của tác nhân oxy hoá là hypochlorite hình thành phức có màu xanh dưới điều kiện pH kiềm. Sự hiện diện của nitroprusside làm tăng hiệu quả của phản ứng giữa phenol và NH_3 lên khoảng 10 lần. Phản ứng này có thể đo được nồng độ từ NH_4^+ từ 0,2 đến 12,5 ppm.

Định lượng NH_4^+ do vi khuẩn sinh ra trong các ngày 2, 4 và 6 (sau khi chủng).

Số liệu đo được về hàm lượng NH_4^+ sinh ra từ các dòng vi khuẩn được xử lý bằng phương pháp phân tích Anova và Duncan của phần mềm SPSS 13.0.

2.2.4 Giải trình tự DNA để xác định loài

Sau khi phân lập được những dòng vi khuẩn rỗng, kiểm tra và khảo sát đặc tính sinh học, chọn ra hai dòng vi khuẩn có đặc tính cố định đạm và tổng hợp IAA tốt, gửi mẫu đến bộ môn Sinh học Phân tử Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ giải trình tự DNA và so sánh tương quan di truyền với các dòng vi khuẩn có trên ngân hàng dữ liệu NCBI.

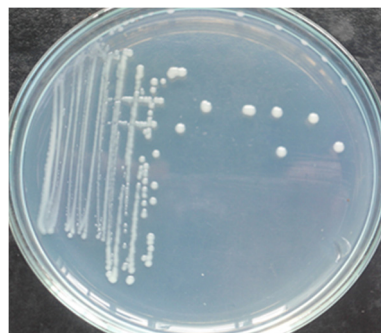
3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập các chủng vi khuẩn

Từ các mẫu rễ chuối thu được đã phân lập được 43 dòng vi khuẩn trên hai loại môi trường NFb và Baz. Trong đó có 25 dòng vi khuẩn được phân lập từ môi trường NFb và 18 dòng được phân lập từ môi trường Baz. Các dòng vi khuẩn rỗng được ký hiệu lần lượt là D1, D2, D3, D4,..., D25 (NFb) và N1, N2, N3,..., N18 (Baz).

Sau 2 - 3 ngày cấy, đa số các khuẩn lạc của vi khuẩn trên đĩa petri chứa môi trường NFb đặc đều

có dạng tròn, độ nổi mô, bìa nguyên, và chủ yếu có màu trắng sữa hoặc trắng trong (Hình 1), đường kính trung bình từ 0,5-2 mm tương tự như nghiên cứu của Caceres (1982) về vi khuẩn *Azospirillum* trên môi trường NFb.



Hình 1: Khuẩn lạc của vi khuẩn D10 trên môi trường NFb



Hình 2: Khuẩn lạc của vi khuẩn N8 trên môi trường Baz

Trên đĩa petri chứa môi trường Baz đặc, sau 2-3 ngày ủ các khuẩn lạc có dạng hình tròn, độ nổi mô, bìa nguyên và có màu trắng hoặc vàng (Hình 2), đường kính trung bình từ 1-1,5 mm.

Các dòng vi khuẩn phân lập được trên môi trường NFb đều có chung tính chất là chúng có khả năng làm thay đổi pH của môi trường kéo theo có sự đổi màu của môi trường NFb (nhận biết nhờ sự có mặt của chất chỉ thị màu Bromoethyl Blue).

Sau khi kiểm tra sự chuyển động bằng phương pháp giọt ép và nhuộm Gram, tất cả các dòng vi khuẩn phân lập rỗng trên cả hai môi trường đều có khả năng chuyển động, thuộc vi khuẩn Gram âm, có dạng hình que hoặc cầu.

Trên môi trường NFb, phân lập được 8 dòng vi khuẩn hình cầu có đường kính tế bào biến thiên từ 0,5-2 μm , tế bào vi khuẩn có chiều dài biến thiên từ 1-2,5 μm và chiều rộng biến thiên từ 0,5-2 μm đối với 16 dòng vi khuẩn hình que được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1: Đặc tính tế bào vi khuẩn được phân lập trên môi trường NFb

STT	Dòng	Hình dạng	Chuyển động *	Gram**	Chiều dài (µm)	Chiều rộng (µm)
1	D1	Que	+	-	2,0	1,0
2	D2	Que	+	-	2,0	1,5
3	D3	Que	+	-	1,5	1,0
4	D4	Que	+	-	1,0	0,75
5	D5	Que	+	-	2,3	1,0
6	D6	Cầu	+	-	0,5	0,5
7	D7	Que	+	-	1,5	1,0
8	D8	Cầu	+	-	1,0	1,0
9	D9	Que	+	-	1,75	1,0
10	D10	Cầu	+	-	1,2	1,2
11	D11	Que	+	-	1,0	0,5
12	D12	Cầu	+	-	2,0	2,0
13	D13	Cầu	+	-	1,0	1,0
14	D14	Cầu	+	-	0,5	0,5
15	D15	Que	+	-	2,5	1,0
16	D16	Que	+	-	2,1	1,0
17	D17	Cầu	+	-	1,0	1,0
18	D18	Cầu	+	-	0,5	0,5
19	D19	Que	+	-	2,5	1,5
20	D20	Que	+	-	2,0	1,5
21	D21	Que	+	-	1,2	0,5
22	D22	Que	+	-	1,5	1,0
23	D23	Que	+	-	1,5	1,0
24	D24	Que	+	-	2,5	1,0
25	D25	Cầu	+	-	1,0	1,0

Chú thích: *(+): có khả năng chuyển động

** (-): Gram âm

Trên môi trường Baz phân lập được 18 dòng vi khuẩn hình que có chiều dài trong khoảng 0,7-2,5 µm và chiều rộng biến thiên trong khoảng 0,5-1,5 µm.

Bảng 2: Đặc tính tế bào vi khuẩn được phân lập trên môi trường Baz

STT	Dòng	Hình dạng	Chuyển động *	Gram**	Chiều dài (µm)	Chiều rộng (µm)
1	N1	Que	+	-	2,0	1,0
2	N2	Que	+	-	1,2	0,7
3	N3	Que	+	-	1,0	0,7
4	N4	Que	+	-	2,0	1,7
5	N5	Que	+	-	1,5	1,0
6	N6	Que	+	-	0,7	0,5
7	N7	Que	+	-	2,0	1,5
8	N8	Que	+	-	2,0	1,0
9	N9	Que	+	-	1,75	1,0
10	N10	Que	+	-	1,3	0,7
11	N11	Que	+	-	1,5	1,0
12	N12	Que	+	-	1,2	0,7
13	N13	Que	+	-	1,5	1,0
14	N14	Que	+	-	2,0	1,0
15	N15	Que	+	-	2,2	1,5
16	N16	Que	+	-	2,1	1,0
17	N17	Que	+	-	1,2	0,5
18	N18	Que	+	-	2,0	1,0

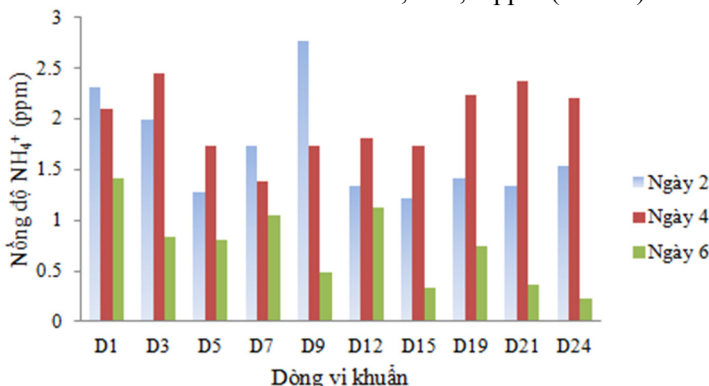
Chú thích: *(+): có khả năng chuyển động

** (-): Gram âm

3.2 Khả năng tổng hợp NH₄⁺ trên môi trường NFb

Dựa vào kết quả khảo sát khả năng tổng hợp NH₄⁺ của 10 dòng vi khuẩn đã được phân lập trên môi trường NFb, cho thấy tất cả các dòng vi khuẩn phân lập được đều có khả năng tổng hợp NH₄⁺ với những lượng khác nhau dao động khá rộng từ 0,22-2,76 ppm.

Sau khi chủng và ủ ở 30°C trong hai ngày đầu, kết quả thu được là tất cả những dòng vi khuẩn phân lập đều có khả năng tổng hợp NH₄⁺ với nồng độ từ 1,22-2,31 ppm. Ở hai ngày tiếp theo, lượng NH₄⁺ được tổng hợp tiếp tục tăng và đạt giá trị cao nhất, lượng NH₄⁺ đo được dao động từ 1,39-2,45 ppm. Tuy nhiên, sau 6 ngày nuôi cấy, nồng độ NH₄⁺ giảm khá mạnh lượng NH₄⁺ thu được từ 0,22-1,41 ppm (Hình 3).

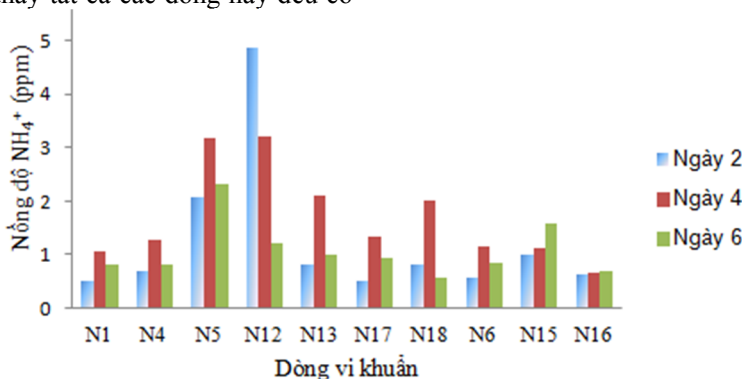


Hình 3: Khả năng tổng hợp NH₄⁺ của 10 dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường NFb

3.3 Khả năng tổng hợp NH₄⁺ trên môi trường Baz

Đối với 10 dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường Baz, nhận thấy tất cả các dòng này đều có

khả năng tổng hợp NH₄⁺ nhưng thấp hơn so với các dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường NFb, ngoại trừ hai dòng vi khuẩn có khả năng tổng hợp NH₄⁺ khá cao là N5 và N12 (Hình 4).



Hình 4: Lượng NH₄⁺ của 10 dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường Baz

Sau hai ngày nuôi cấy, tất cả 10 dòng vi khuẩn đều có khả năng tổng hợp NH₄⁺ trong môi trường Baz lỏng, hàm lượng NH₄⁺ từ 0,50 ppm (N1) đến 4,85 ppm (N12). Vào ngày thứ 4, nồng độ NH₄⁺ do các dòng vi khuẩn sản sinh ra có gia tăng nhưng không đáng kể so với ngày 2 và đạt nồng độ cao nhất (ngoại trừ 2 dòng N15, N16, có nồng độ NH₄⁺ tăng vào ngày 6), dao động từ 0,67 (N16) đến 3,22 ppm (N12). Ngày thứ 6, nồng độ NH₄⁺ giảm so với ngày thứ 4 (ngoại trừ 2 dòng

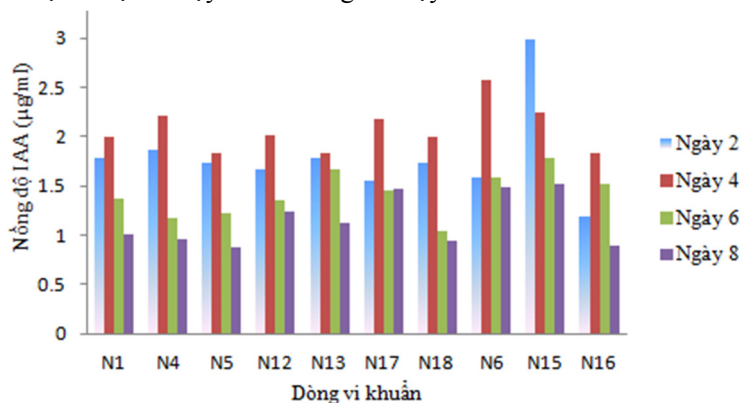
N15 và N16 có nồng độ NH₄⁺ tăng vào ngày 6). Hai dòng vi khuẩn có khả năng tổng hợp NH₄⁺ cao nhất là N12 (4,85 ppm ngày 2) và N5 (3,16 ppm ngày 4).

3.4 Khả năng tổng hợp IAA trên môi trường Baz

Kết quả khảo sát khả năng tổng hợp IAA cho thấy cả 10 dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường Baz đều có khả năng tổng hợp IAA.

Sau 2 ngày chủng, cả 10 dòng vi khuẩn khảo sát đều sản sinh IAA với nồng độ dao động từ 1,19 $\mu\text{g/mL}$ (N16) đến 2,98 $\mu\text{g/mL}$ (N15). Trong đó, nồng độ IAA ở dòng N15 đạt giá trị cao nhất (2,98 $\mu\text{g/mL}$) và khác biệt có ý nghĩa so với các dòng còn lại ở mức độ tin cậy 95%. Sau đó nồng độ IAA lại tiếp tục tăng ngoại trừ dòng N15 có nồng độ IAA giảm. Ở ngày 4, nồng độ IAA cao nhất là 2,58 $\mu\text{g/mL}$ (N6) và khác biệt có ý nghĩa so với các dòng còn lại ở độ tin cậy 95%. Sang

ngày thứ 6 nồng độ IAA ở tất cả các dòng giảm rõ rệt và dao động từ 1,04 $\mu\text{g/mL}$ (N18) đến 1,78 $\mu\text{g/mL}$ (N15), hàm lượng dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy cũng ảnh hưởng đến lượng IAA sinh ra. Nồng độ IAA ở cả 10 dòng vi khuẩn lại tiếp tục giảm ở ngày 8. Như vậy, dòng vi khuẩn N15 và N6 đạt nồng độ IAA cao nhất lần lượt vào ngày 2 và ngày 4, kết quả này khác biệt có ý nghĩa so với các dòng còn lại ở độ tin cậy 95%.



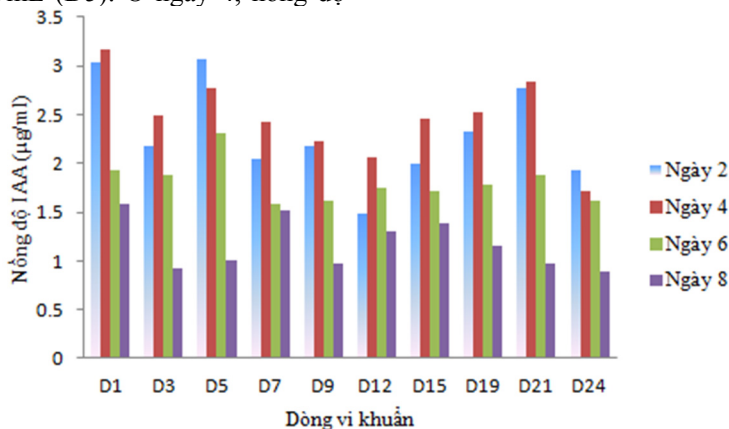
Hình 5: Khả năng tổng hợp IAA của các dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường Baz

3.5 Khả năng tổng hợp IAA của các dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường NFb

Đối với 10 dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường NFb, nhận thấy rằng cả 10 dòng vi khuẩn này đều có khả năng tổng hợp IAA với nồng độ cao hơn các dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường Baz.

Sau 2 ngày nuôi cấy, tất cả 10 dòng vi khuẩn đều có khả năng tổng hợp IAA trong môi trường NFb lỏng với nồng độ dao động từ 1,49 $\mu\text{g/mL}$ (D12) đến 3,07 $\mu\text{g/mL}$ (D5). Ở ngày 4, nồng độ

IAA do các dòng vi khuẩn sản sinh ra tăng đáng kể so với ngày 2 và đạt nồng độ cao nhất trong tất cả các ngày khảo sát ngoại trừ dòng D5. Cụ thể nồng độ IAA cao nhất ở dòng D1 (3,16 $\mu\text{g/mL}$) và khác biệt có ý nghĩa so với các dòng còn lại ở mức độ tin cậy 95%. Tiếp theo là các dòng D21, D5 và D19 với nồng độ IAA lần lượt là 2,83 $\mu\text{g/mL}$, 2,77 $\mu\text{g/mL}$ và 2,53 $\mu\text{g/mL}$. Nồng độ IAA ở tất cả các dòng vi khuẩn giảm đáng kể ở ngày 6 và ngày 8 tương tự như kết quả ở các dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường Baz.



Hình 6: Lượng IAA của các dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường NFb

Dựa vào biểu đồ nồng độ IAA của các dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường NFb cho thấy nồng độ IAA sinh tổng hợp bởi dòng D1 ở ngày 4 và D5 ở ngày 2 là cao nhất và lần lượt đạt 3,16 µg/mL và 3,07 µg/mL. Dựa vào kết quả định danh vi khuẩn thì dòng D1 tương đồng với dòng *Pseudomonas aeruginosa*. Trong một nghiên cứu khảo sát sự ảnh hưởng của L - tryptophan lên khả năng tổng hợp IAA của *P.aeruginosa* thì dòng *P.aeruginosa* có thể tổng hợp được IAA với nồng độ là 0,2 µg/mL, 0,7 µg/mL, 3,8 µg/mL và 8,3 µg/mL khi có sự hiện diện của L-tryptophan với nồng độ lần lượt là 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL và 500 µg/mL (Karnwal, 2009). Từ đó cho thấy nồng độ IAA do dòng D1 tổng hợp được cao hơn trong nghiên cứu này mặc dù không sử dụng L-tryptophan trong môi trường nuôi dưỡng.

3.6 Kết quả định danh vi khuẩn bằng kỹ thuật giải trình tự gen 16S RDNA

Sử dụng kỹ thuật PCR với cặp mồi chuyên biệt ITS1 và ITS4 (White *et al.*, 1990) để giải trình tự hai dòng vi khuẩn N12 và D1 có hoạt tính cao.

ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')

ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

Dòng vi khuẩn N12 thể hiện khả năng cố định đạm cao nhất qua thí nghiệm khảo sát được xác định là dòng vi khuẩn *Achromobacter* sp. Với tổng số nucleotic được giải là 479 nu, tỷ lệ tương đồng 97% với trình tự đã được đăng ký trong ngân hàng Gene NCBI có ký hiệu là HQ162480.1.

Achromobacter sp. được mô tả là nhóm vi khuẩn Gram âm, có dạng hình que và được biết đến là một trong những loài vi khuẩn có khả năng cố định đạm. *Achromobacter* sp. phân bố rộng rãi trong tự nhiên và thường được tìm thấy trong môi trường đất ẩm, được tìm thấy nội sinh trong cây *Prosopis strombulifera*, một loài cây thuộc họ đậu ở Argentina (Sgroy *et al.*, 2009) và trên lúa gạo (Sun *et al.*, 2008). Bên cạnh đó, nhóm vi khuẩn này còn có khả năng kiểm soát của một số tác nhân gây bệnh thực vật (Vaidya *et al.*, 2001), kích thích sự phát triển của thực vật, và ức chế sản xuất aflatoxin trong *Aspergillus* sp. (Yan *et al.*, 2004).

Dòng vi khuẩn D1 qua thí nghiệm khảo sát được đánh giá là dòng vi khuẩn có khả năng tổng hợp IAA cao nhất. Với tổng số nucleotic được giải là 561nu tương đồng 94% với trình tự của

dòng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* đã được đăng ký trong ngân hàng Gene NCBI có ký hiệu là JX284233.1.

Pseudomonas aeruginosa là vi khuẩn Gram âm, có hình que, di chuyển bằng một chiên mao đơn cực và sống trong điều kiện hiếu khí tuyệt đối. Loài vi khuẩn này phát triển ở nhiệt độ tối ưu là 30-37°C. Những nghiên cứu cho thấy *P. aeruginosa* có khả năng tổng hợp IAA một loại kích thích tố thực vật, kích thích sự phát triển của rễ (Khare và Arora, 2010), bên cạnh đó, vi khuẩn này còn thể hiện khả năng hòa tan dạng lân khó tan và kháng nấm gây bệnh trên rễ chuối (Ayyadurai *et al.*, 2006). Ngoài nội sinh trên rễ chuối, *P. aeruginosa* còn được tìm thấy nội sinh ở cây ớt và cũng thể hiện vai trò trong việc kích thích tăng trưởng cho cây. Do đó *P. Aeruginosa* có khả năng được ứng dụng để sản xuất phân bón vi sinh.

LỜI CẢM TẠ

Nhóm nghiên cứu xin trân trọng bày tỏ lòng biết ơn đến Ban Giám hiệu, Khoa và Phòng Ban của Trường đã hỗ trợ và tạo điều kiện tốt để chúng tôi thực hiện thành công đề tài. Cảm ơn thầy hướng dẫn đã tận tình giúp đỡ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alexander, M. and F.E Clark. 1965. Nitrifying bacteria. In *Methods for Soils Analysis, Part 2: Chemical and microbial properties*, ed. C.A Black. American Society of Agronomy Incorporation, USA, pp.1477-1483.
- Ayyadurai, N., P. Ravindra Naik, M. Sreehari Rao, R. Sunish Kumar, S. K. Samrat, M. Manohar and N. Sakthivel. 2006. Isolation and characterization of a novel banana rhizosphere bacterium as fungal antagonist and microbial adjuvant in micropropagation of banana. *J Appl Microbiol*, 100(5):926-937.
- Caceres, E.A. 1982. Improved Medium for Isolation of *Azospirillum* spp. *Appl Environ Microbiol*, 44(4):990-991.
- Đào Thanh Hoàng. 2004. Phân lập và nhận diện các dòng vi khuẩn *Azospirillum* bằng kỹ thuật PCR. Luận văn thạc sĩ chuyên ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
- Glickmann, E. and Y. Dessaux. 1995. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 61(2):793-796.

6. Karnwal, A. 2009. Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice root exudates. *Journal of Plant Pathology*, 91(1):61-63.
7. Khare, E. and N. K. Arora. 2010. Effect of indole-3-acetic acid (IAA) produced by *Pseudomonas aeruginosa* in suppression of charcoal rot disease of chickpea. *Curr Microbiol*, 61(1):64-68.
8. Nguyễn Hữu Hiệp, Phạm Thị Khánh Vân, Trần Văn Chiêu, Đào Thanh Hoàng, và Nguyễn Khắc Minh Loan. 2005. Phân lập và nhận diện các dòng *Azospirillum* bằng kỹ thuật PCR. *Tạp chí Nghiên cứu Khoa học* 2005.
9. Nguyễn Thị Phương Tâm. 2006. Phân lập và tuyển chọn một số dòng vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* trên cây bắp. Luận văn tốt nghiệp Trường Đại học Cần Thơ.
10. Sgroy, V., F. Cassan, O. Masciarelli, M. F. Del Papa, A. Lagares and V. Luna. 2009. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85(2):371-381.
11. Sun, L., F. Qiu, X. Zhang, X. Dai, X. Dong and W. Song. 2008. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microb Ecol*, 55(3):415-424.
12. Vaidya, R. J., I. M. Shah, P. R. Vyas and H. S. Chhatpar. 2001. Production of chitinase and its optimization from a novel isolate *Alcaligenes xyloxydans*: potential in antifungal biocontrol. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(7):691-696.
13. White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White. Academic Press, San Diego, California, USA. pp.315-322.
14. Yan, P. S., Y. Song, E. Sakuno, H. Nakajima, H. Nakagawa and K. Yabe. 2004. Cyclo(L-leucyl-L-prolyl) produced by *Achromobacter xyloxydans* inhibits aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Appl Environ Microbiol*, 70(12):7466-7473.
15. Anh Minh, 2010. Chuối sẽ là mặt hàng xuất khẩu chủ lực?. <http://vneconomy.vn> (ngày truy cập 09/06/2011).
16. Anh Trung, 2010. Chuối ở Việt Nam. <http://www.cesti.gov.vn> (ngày truy cập 9/06/2011).
17. Thu Nguyễn, 2009. Chuối được sử dụng trong sản xuất chất dẻo. <http://www.khoahocphattrien.com.vn> (ngày truy cập 09/06/2011).