

PHÂN LẬP VÀ NHẬN DIỆN VI KHUẨN VÙNG RỄ KÍCH THÍCH SỰ SINH TRƯỞNG (PGPR) TỪ MỘT SỐ LOẠI RAU ĂN LÁ TRỒNG TẠI THÀNH PHỐ CẦN THƠ

Trần Thị Giang¹, Nguyễn Thị Quyên² và Cao Ngọc Diệp¹

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

² Học viên Cao học Sinh Thái, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 23/06/2014

Ngày chấp nhận: 30/12/2014

Title:

Isolation and identification of plant growth-promoting rhizobacteria on leaf-eating vegetables grown in Can Tho City

Từ khóa:

Cố định đạm, hòa tan lân, IAA, rau ăn lá, siderophores, vi khuẩn vùng rễ

Keywords:

IAA, leaf-eating vegetables, nitrogen fixation, phosphate solubilization, rhizosphere bacteria, siderophores

ABSTRACT

Seventy-six isolates were isolated from 25 rhizosphere soil samples of 13 different leaf-eating vegetables species grown in 6 districts of Can Tho City. Among them, 48 isolates had good characteristics as nitrogen fixation, phosphorus solubility and IAA synthesis. Especially, 5 isolates (NBT625, NPD721, NPD855, NOM131 and NBT613) had relatively high abilities of nitrogen fixation, phosphorus solubilization (0.80-2.21 mg/L NH_4^+ , 27.82-50.63 mg/L P_2O_5) and 3 isolates (PBT622, POM112 and POM222) synthesized high IAA levels (7.82-8.25 mg/L). These eight isolates were selected to test the siderophore-producing ability and the results showed that 7 isolates having light and color changes CAS medium. Six/seven isolates were chosen to identify with primers 27F and 1492R, they were sequenced and compared with bacterial 16S rRNA genes in Genbank using BLAST N program. The results showed that NBT613 isolate was a 99% similarity with GQ181060 *Agrobacterium tumefaciens* strain BLN4, NPD855 isolate had a 99% identity with KC934864 *Ensifer adhaerens* strain M27 and JQ322555 *Sinorhizobium meliloti* strain CHW10B, PBT622 isolate was a 97% similarity with KF358257 *Acinetobacter calcoaceticus* strain L14, POM112 isolate had a 97% identity with JQ923444 *Achromobacter xylosoxidans* strain BL6, NBT625 isolate was a 98% similarity with KF870446 *Rhizobium* sp. LS-079, and NPD721 isolate was a 99% similarity with KC833504 *Burkholderia* sp. TCP30, and 5 strains were selected to evaluate their effects on leaf-eating vegetables in the pots and field experiments except POM112 strain.

TÓM TẮT

Bảy mươi sáu dòng vi khuẩn được phân lập từ 25 mẫu đất vùng rễ của 13 loài rau ăn lá trồng tại 6 quận-huyện của Cần Thơ. Trong đó, 48 dòng có cả 3 đặc tính tốt như cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA; với 5 dòng (NBT625, NPD721, NPD855, NOM131 và NBT613) có khả năng cố định đạm, hòa tan lân cao (0,80-2,21 mg/L NH_4^+ , 27,82-50,63 mg/L P_2O_5) và 3 dòng (PBT622, POM112 và POM222) có khả năng tổng hợp IAA cao (7,82-8,25 mg/L). Kết quả khảo sát khả năng sản xuất siderophores, có 7/8 dòng tạo được vòng sáng và làm đổi màu môi trường CAS. Sáu dòng vi khuẩn này được chọn để nhận diện với cặp mồi 27F và 1492R và giải trình tự gen 16S rRNA, so sánh với gen 16S rRNA của vi khuẩn trong GenBank bằng chương trình BLAST N. Kết quả cho thấy dòng NBT613 tương đồng 99% với dòng GQ181060 *Agrobacterium tumefaciens* BLN4, dòng NPD855 tương đồng 99% với dòng KC934864 *Ensifer adhaerens* M27 và JQ322555 *Sinorhizobium meliloti* CHW10B, dòng PBT622 tương đồng 97% với dòng KF358257 *Acinetobacter calcoaceticus* L14, dòng POM112 tương đồng 97% với dòng JQ923444 *Achromobacter xylosoxidans* BL6, dòng NBT625 tương đồng 98% với dòng KF870446 *Rhizobium* sp. LS-079, và dòng NPD721 tương đồng 99% với dòng KC833504 *Burkholderia* sp. TCP30, và 5 dòng vi khuẩn được chọn đánh giá hiệu quả của chúng trên rau ăn lá trong chậu và ngoài đồng trừ dòng POM112.

1 GIỚI THIỆU

Vi khuẩn vùng rễ kích thích sinh trưởng ở thực vật (Plant Growth Promoting Rhizobacteria-PGPR) là vi khuẩn trong đất, sinh sống xung quanh hoặc trên bề mặt rễ, trực tiếp hoặc gián tiếp tham gia việc kích thích sinh trưởng và phát triển của thực vật thông qua sản xuất và tiết ra những chất hóa học khác nhau ở xung quanh vùng rễ. Nói chung, PGPR tạo điều kiện thuận lợi cho sinh trưởng thực vật bởi trực tiếp hoặc hỗ trợ việc thu thập nguồn dưỡng chất (đạm, lân và các khoáng chất thiết yếu) hoặc điều chỉnh hormone thực vật, hoặc gián tiếp làm giảm các tác nhân gây bệnh khác nhau ức chế sinh trưởng thực vật. Nhiều nghiên cứu đã ghi nhận việc ứng dụng PGPR trong trồng trọt làm tăng sức đề kháng và năng suất của các loại cây trồng khác nhau trong cả điều kiện bình thường và bất lợi. Các vi khuẩn vùng rễ thực vật có lợi có thể làm giảm sự phụ thuộc hoàn toàn vào nông dược nguy hại gây bất ổn cho hệ sinh thái nông nghiệp. Có thể nói PGPR là lực lượng tiên phong chi phối việc tái sử dụng các chất dinh dưỡng trong đất. Vì vậy, chúng rất quan trọng đối với khả năng phục hồi của đất. Vì thế, việc ứng dụng những vi khuẩn vùng rễ có lợi này trong sản xuất phân vi sinh bón cho cây trồng nói chung và rau xanh nói riêng, nhằm giảm sử dụng phân bón hóa học, góp phần bảo vệ sức khỏe con người và xây dựng hệ sinh thái nông nghiệp bền vững.

Rau xanh được xem là nguồn thực phẩm dinh dưỡng quan trọng không thể thay thế (Tạ Thu Cúc, 2005), trong rau có đường, đạm, vitamin, acid hữu cơ và các hợp chất khoáng (sắt, kali, canxi...) cần thiết cho sự duy trì và phát triển của con người, rau là vị thuốc tự nhiên có chứa rất nhiều chất dược tính. Hiện nay, phẩm chất rau bị giảm sút do dư lượng hóa chất độc và vi sinh vật gây hại cho con người vượt nhiều so với ngưỡng qui định (Đỗ Thị Trường, 2009). Đặc biệt dư lượng nitrat trong các sản phẩm rau xanh gây nhiều hậu quả nghiêm trọng, từ đó phân bón vi sinh vật cho rau được nghiên cứu và ứng dụng ngày càng rộng rãi nhằm hạn chế ảnh hưởng tiêu cực của phân hóa học.

Tổng diện tích trồng rau các loại năm 2012 ở thành phố Cần Thơ là 6.845 ha, năng suất 125,52 tạ/ha, sản lượng 85.916 tấn, trong đó diện tích rau ăn lá 487,7 ha, năng suất 112,72 tạ/ha, sản lượng 5497,2 tấn (thống kê của Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn Cần Thơ). Dựa trên điều kiện tự nhiên và lợi thế địa lý ở những vùng ven sông, cù lao, kênh rạch bao quanh, Cần Thơ đã và đang xây dựng các vùng sản xuất chuyên canh rau phục vụ

nhu cầu sử dụng của thành phố và cung cấp cho các tỉnh trong vùng. Tuy nhiên, trong khi nhu cầu tiêu thụ rau an toàn ngày càng cao thì thực tế sản xuất rau an toàn ở đây còn gặp nhiều khó khăn. Thực tế vẫn chưa có nhiều đề tài nghiên cứu về vai trò của vi sinh vật có ích trong đất trồng rau nên việc ứng dụng chế phẩm vi sinh để giảm lượng phân bón và thuốc trừ sâu hóa học trên đất trồng rau còn hạn chế.

Mục tiêu nghiên cứu là phân lập và nhận diện vi khuẩn vùng rễ kích thích sự sinh trưởng trên cây rau ăn lá trồng tại Cần Thơ.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Mẫu đất

Các mẫu đất vùng rễ rau ăn lá (khoảng 2 kg đất bao gồm cả cây rau) được thu thập từ các ruộng rau tại 6 quận-huyện (Cái Răng, Bình Thủy, Phong Điền, Ô Môn, Cờ Đỏ, Thốt Nốt) của Cần Thơ. Đất vùng rễ (lớp đất bao quanh rễ khoảng 0,8-10 mm) của từng mẫu rau được để riêng trong túi nilon sạch khuẩn (có ghi nhãn và số thứ tự), trữ trong tủ lạnh (4°C) khi chưa sử dụng. Gỡ lớp đất bao quanh rễ một cách nhẹ nhàng, tách riêng, trộn đều lại để sử dụng cho phân lập vi khuẩn (mô tả ở phần sau).

2.2 Phân lập vi khuẩn vùng rễ kích thích sinh trưởng (PGRR)

Mẫu đất vùng rễ (1 g) được cho vào bình tam giác với 99 ml nước cất đã khử trùng, lắc 12 giờ (200 vòng/phút) cho các hạt đất rời ra và vi khuẩn phân tán đều trong nước. Dịch vi khuẩn được để lắng khoảng 1 giờ; lấy 0,1 ml trải đều trên đĩa petri chứa môi trường Burk không đạm (phát hiện vi khuẩn cố định đạm) (Park *et al.*, 2005) và môi trường NBRIP (phát hiện vi khuẩn hòa tan lân) (Nautiyal, 1999) đã được chuẩn bị sẵn, ủ ở 30°C. Sau 24-48 giờ, các khuẩn lạc mọc trên bề mặt môi trường được tiếp tục cấy chuyển sang môi trường mới vài lần đến khi các khuẩn lạc xuất hiện trên đường cấy rời nhau thì quan sát đặc điểm khuẩn lạc (hình dạng, màu sắc, độ nổi, dạng bia, kích thước).

Các dòng vi khuẩn phân lập được kiểm tra độ thuần bằng phương pháp giọt ép dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 400 lần. Khi thấy vi khuẩn đã thuần nhất tiến hành cấy chuyển sang ống nghiệm chứa môi trường đặc tương ứng để trừ ở 4°C và được xem như một dòng thuần. Các vi khuẩn phát triển được trên môi trường Burk không đạm được cấy sang môi trường NBRIP và ngược lại, chọn những khuẩn lạc phát triển trên cả hai môi trường Burk không đạm và NBRIP như là các dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm và hòa tan lân.

2.3 Định lượng đạm, lân hòa tan, IAA ở những dòng vi khuẩn phân lập được

Các dòng vi khuẩn phát triển trên từng loại môi trường được đo khả năng cố định đạm trong môi trường Burk không đạm lỏng bằng phương pháp so màu Indophenol Blue ở bước sóng 636 nm (OD_{636nm}); đo khả năng hòa tan lân trong môi trường NBRIP lỏng bằng phương pháp so màu Blue-molybden ở bước sóng 880 nm (OD_{880nm}); đo khả năng tổng hợp IAA trong môi trường phân lập lỏng bằng phương pháp so màu Salkowsky ở bước sóng 530 nm (OD_{530nm}).

2.4 Khảo sát khả năng sản xuất siderophores của các dòng vi khuẩn đã tuyển chọn

Vi khuẩn vùng rễ được tăng sinh trong môi trường PS (peptone 10g/L, sucrose 10g/L)(Schwyn và Neilands, 1987), lắc 200 vòng/phút, ở 30°C trong 24 giờ. Nhỏ giọt 50 µl dịch vi khuẩn lên môi trường chorome azurol S (CAS) agar và ủ ở 30°C trong 48 giờ, sau đó quan sát khả năng sản xuất siderophores của từng dòng. Khi vi khuẩn sử dụng sắt trong môi trường thì màu xanh của môi trường CAS xung quanh khuẩn lạc không còn nữa, thay vào đó vòng sáng màu cam xuất hiện quanh khuẩn lạc đó là do có sự hiện diện của siderophores (Schwyn và Neilands, 1987).

2.5 Nhận diện các dòng vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR-16S rRNA

– Tách chiết DNA vi khuẩn theo mô tả của Wilson (1997).

– Sau khi tách chiết DNA từ các dòng vi khuẩn, phản ứng PCR gen 16S rRNA được tiến hành với cặp mồi 27F và 1492R (Weisburg *et al.*, 1991) với trình tự như sau: 27F

(5'AGATTTGATCCTGGCTCAG3'); 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3').

– Thành phần phản ứng PCR (25 µl): H₂O 12 µl; buffer (chất đệm) 10X 2,5 µl; MgCl₂ 25 mM 2 µl; dNTP 4 µl; mồi 27F 1 µl; mồi 1492R 1 µl; BSA 0,25 µl; *Taq* polymerase 0,25 µl; DNA mẫu 2 µl.

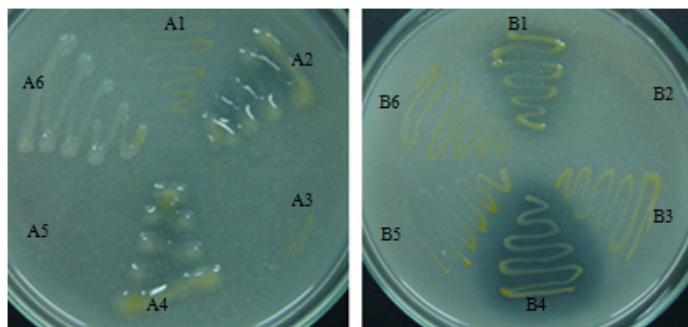
– Phản ứng PCR: 95°C/5'; 30 chu kỳ: (95°C/30", 53°C/30", 72°C/1'30"); 72°C/10'.

– Sử dụng đoạn mồi 27F trong phản ứng PCR để nhận diện vi khuẩn đã mô tả ở trên. Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự bằng hệ thống máy giải trình tự tự động của Công ty MACROGEN (Hàn Quốc). Sử dụng chương trình BLAST N để so sánh trình tự DNA của các dòng vi khuẩn chọn lọc với trình tự DNA của bộ gen ở các loài vi khuẩn trong GenBank và xây dựng cây phả hệ gen giữa các dòng vi khuẩn được giải trình tự bằng phần mềm MEGA 6.05 (Tamura *et al.*, 2011).

Số liệu được phân tích thống kê bằng phần mềm SPSS16, lập bản ANOVA, sử dụng kiểm định Duncan để so sánh sự khác biệt của trị trung bình của từng nghiệm thức.

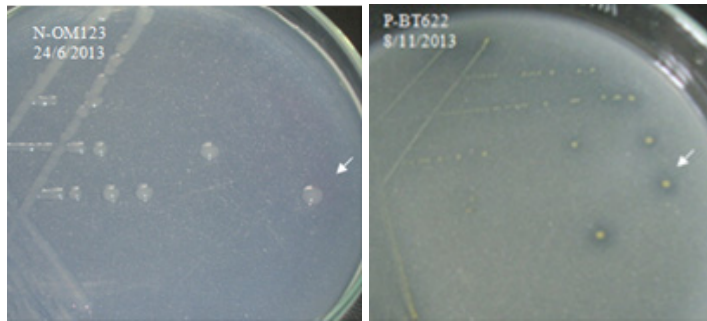
3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Bảy mươi sáu dòng vi khuẩn được phân lập từ 25 mẫu đất vùng rễ của 13 loài rau ăn lá khác nhau thu được ở 6 quận-huyện của Cần Thơ, trong đó có 63 dòng phát triển trên cả hai loại môi trường Burk không đạm và môi trường NBRIP; như vậy 63 dòng vi khuẩn này vừa có khả năng cố định đạm vừa có khả năng hòa tan lân (Hình 1), đa số chúng có khuẩn lạc tròn, trắng hoặc vàng, bìa nguyên, độ nổi mô (Hình 2); tế bào hình que hay ovan, có khả năng chuyển động (Hình 3).

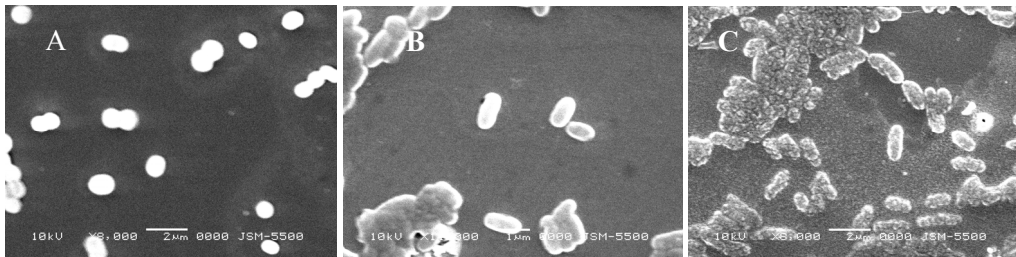


Hình 1: Khuẩn lạc vi khuẩn phân lập ở môi trường Burk không N phát triển trên môi trường NBRIP sau 48 giờ

Chú thích: A1=NCD534; A2=NOM131; A3=NBT614; A4=NOM232; A5=NPD725; A6=NCD565; B1=NOM222; B2=NTN422; B3=NOM214; B4=NPD721; B5=NBT625; B6=NBT622



Hình 2: Đặc điểm khuẩn lạc (dạng tròn; trắng trong, độ nổi mô) của một số dòng (isolate) vi khuẩn phân lập



Hình 3: Hình dạng một số dòng vi khuẩn dưới kính hiển vi điện tử quét

Chú thích: (A): Dòng PBT622 (X8.000); (B): dòng POM112 (X10.000), (C) dòng NBT613 (X8.000)

Kết quả Bảng 1 và 2 cho thấy khả năng cố định đạm của 63 dòng vi khuẩn sau 8 ngày ủ, trong đó

có 11 dòng vi khuẩn nổi bật thông qua hàm lượng NH_4^+ tổng hợp khá cao (0,80-2,21 mg/L).

Bảng 1: Khả năng cố định đạm của 38 dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường Burk không đạm

Stt	Dòng vi khuẩn	Lượng NH_4^+ (mg/L)	Stt	Dòng vi khuẩn	Lượng NH_4^+ (mg/L)	Stt	Dòng vi khuẩn	Lượng NH_4^+ (mg/L)
1	DC	0,00 r	15	NCR921	0,32 q	29	NOM231	0,01 r
2	NBT612	0,28 p	16	NCR933	0,01 r	30	NOM232	0,65 j
3	NBT613	0,80 h	17	NCR934	0,71 l	31	NOM243	0,85 g
4	NBT614	0,64 j	18	NCR936	0,01 r	32	NPD721	1,94 b
5	NBT622	0,59 m	19	NOM112	0,01 r	33	NPD723	0,42 o
6	NBT625	2,21 a	20	NOM123	0,38 p	34	NPD855	0,90 f
7	NBT626	0,01 r	21	NOM131	1,53 c	35	NTN312	0,83 g
8	NBT651	0,75 k	22	NOM135	0,01 r	36	NTN411	0,31 q
9	NCD534	0,74 k	23	NOM143	1,00 d	37	NTN414	0,01 r
10	NCD545	0,78 h	24	NOM154	0,52 n	38	NTN421	0,94 e
11	NCD546	0,01 r	25	NOM155	0,01 r	39	NTN424	0,17 q
12	NCD565	0,63 j	26	NOM214	0,01 r		CV%	7,84
13	NCD574	0,94 e	27	NOM221	0,01 r			
14	NCR912	0,03 r	28	NOM222	0,70 l			

Những số theo sau cùng một chữ có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức độ 1%

Bảng 2: Khả năng cố định đạm của 25 dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường NBRIP

Stt	Dòng vi khuẩn	Lượng NH ₄ ⁺ (mg/L)	Stt	Dòng vi khuẩn	Lượng NH ₄ ⁺ (mg/L)	Stt	Dòng vi khuẩn	Lượng NH ₄ ⁺ (mg/L)
1	DC	0,00 n	11	POM111	0,20 f	21	PPD723	0,16 h
2	PBT622	0,27 b	12	POM112	0,17 gh	22	PPD734	0,01 n
3	PBT623	0,09 j	13	POM114	0,13 l	23	PPD812	0,11 i
4	PBT651	0,24 c	14	POM215	0,25 c	24	PTN311	0,23 d
5	PCD534	0,89 a	15	POM217	0,09 j	25	PTN312	0,14 l
6	PCD537	0,18 g	16	POM222	0,17 gh	26	PTN427	0,24 d
7	PCD541	0,10 i	17	POM224	0,22 e			
8	PCD546	0,07 m	18	POM243	0,28 b			
9	PCD565	0,17 gh	19	POM244	0,10 i			
10	PCD572	0,01 n	20	POM247	0,01 n			
							CV(%)	7,18

Những số theo sau cùng một chữ có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức độ 1%

Sau khi định lượng đạm, 26 dòng vi khuẩn phân lập ở môi trường Burk không đạm và 22 dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường NBRIP được chọn để định lượng lân hòa tan và khả năng tổng hợp indol-3-acetic acid (IAA). Kết quả Bảng 3 và 4 cho thấy khả năng hòa tan lân của 48 dòng vi

khẩn sau 20 ngày ủ và lượng IAA tổng hợp được sau 8 ngày ủ. Trong đó, 11 dòng vi khuẩn có hàm lượng P₂O₅ cao từ 41,43 mg/L đến 50,63 mg/L và 4 dòng vi khuẩn nổi bật thông qua hàm lượng IAA khá cao (7,55-8,25 mg/L) là các dòng PBT622, PCD534, POM112 và POM222.

Bảng 3: Khả năng hòa tan lân và sinh tổng hợp IAA của 26 dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường Burk không đạm

STT	Dòng vi khuẩn	Lượng P ₂ O ₅ (mg/L)	Lượng IAA (mg/L)	STT	Dòng vi khuẩn	Lượng P ₂ O ₅ (mg/L)	Lượng IAA (mg/L)
1	ĐC	0,00 n	0,00 l	16	NOM143	48,11 ab	1,60 g
2	NBT612	23,28 h	2,32 c	17	NOM154	30,92 e	1,41 g
3	NBT613	27,82 fg	1,60 g	18	NOM222	46,85 b	1,11 h
4	NBT614	15,48 jm	2,21 d	19	NOM232	35,87 d	1,44 g
5	NBT622	26,32 g	2,86 a	20	NOM243	42,90 c	1,77 f
6	NBT625	29,05 e	1,90 ef	21	NPD721	50,63 a	1,58 g
7	NBT651	28,33 ef	1,59 g	22	NPD723	20,90 i	1,92 ef
8	NCD534	24,33 h	1,14 h	23	NPD855	41,34 c	2,05 de
9	NCD545	28,44 ef	1,01h	24	NTN312	42,65 c	1,25 h
10	NCD565	13,52 m	2,14 d	25	NTN411	17,58 ij	2,04 de
11	NCD574	27,60 fg	1,19 h	26	NTN421	30,94 e	2,17 d
12	NCR921	29,90 e	2,35 c	27	NTN424	31,96 e	2,16 d
13	NCR934	15,25 jm	1,47 g			CV (%)	8,53
14	NOM123	20,65 i	2,44 b				9,06
15	NOM131	36,60 d	1,81 f				

Những số theo sau cùng một chữ có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức độ 1%

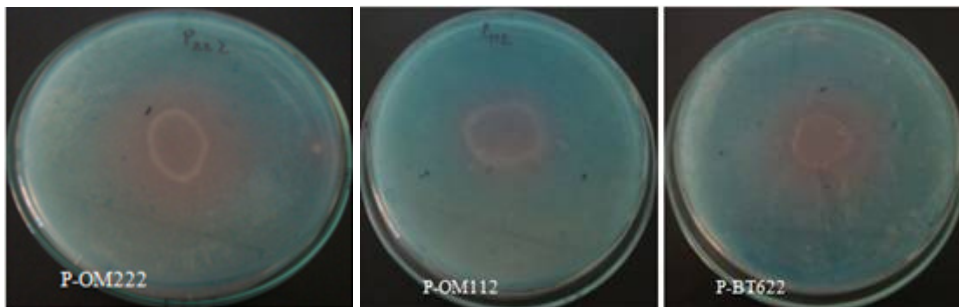
Bảng 4: Khả năng hòa tan lân và sinh tổng hợp IAA của 22 dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường NBRIP

STT	Dòng vi khuẩn	Lượng P ₂ O ₅ (mg/L)	Lượng IAA (mg/L)	STT	Dòng vi khuẩn	Lượng P ₂ O ₅ (mg/L)	Lượng IAA (mg/L)
1	DC	0,00 l	0,00 h	14	POM217	39,49 c	4,08 e
2	PBT622	32,94 d	7,82 ab	15	POM222	26,00 f	8,25 a
3	PBT623	21,46 g	4,48 d	16	POM224	33,14 d	4,87 d
4	PBT651	21,73 g	5,10 c	17	POM243	18,83 gh	3,82 e
5	PCD534	30,52 d	7,55 b	18	POM244	28,10 f	3,40 f
6	PCD537	20,30 g	3,88 e	19	PPD723	36,79 c	3,83 e
7	PCD541	26,46 f	2,48 g	20	PPD812	45,79 b	4,83 d
8	PCD546	27,31 f	3,93 e	21	PTN311	49,66 a	3,10 f
9	PCD565	33,50 d	3,27 f	22	PTN312	48,02 a	2,59 g
10	POM111	16,82 h	3,44 f	23	PTN427	42,93 bc	3,46 f
11	POM112	28,18 f	8,19 a			CV (%)	9,53
12	POM114	42,56 bc	3,45 f				9,75
13	POM215	20,87 g	3,64 ef				

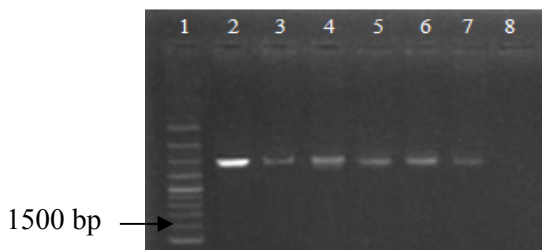
Những số theo sau cùng một chữ có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức độ 1%

Sau khi định lượng đạm, lân hòa tan và IAA, 8 dòng vi khuẩn hữu hiệu nhất (có khả năng cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA tốt và ổn định qua các ngày quan sát) được chọn để khảo sát khả năng sản xuất siderophores; đó là các dòng NBT613, NBT625, NOM131, NPD721, NPD855, PBT622, POM112, POM222. Kết quả cho thấy 7

dòng vi khuẩn có khả năng làm thay đổi màu xanh của môi trường CAS thành màu cam xung quanh khuẩn lạc, qua đó cho thấy chúng có khả năng sử dụng sắt trong môi trường, góp phần ức chế vi sinh vật gây bệnh cho cây trồng (dòng NPD855 không có khả năng sản xuất siderophores)(Hình 4).



Hình 4: Các dòng vi khuẩn làm xuất hiện vòng sáng màu cam sau 48 giờ phát triển trên môi trường CAS agar



Hình 5: Phổ điện di sản phẩm PCR được nhân lên từ DNA của 6 dòng vi khuẩn vùng rễ

Ghi chú: 1=thang DNA chuẩn 100 bp plus, 2=NBT613, 3=NPD855, 4=PBT622, 5=POM112, 6=NBT625, 7=NPD721, 8=đối chứng âm

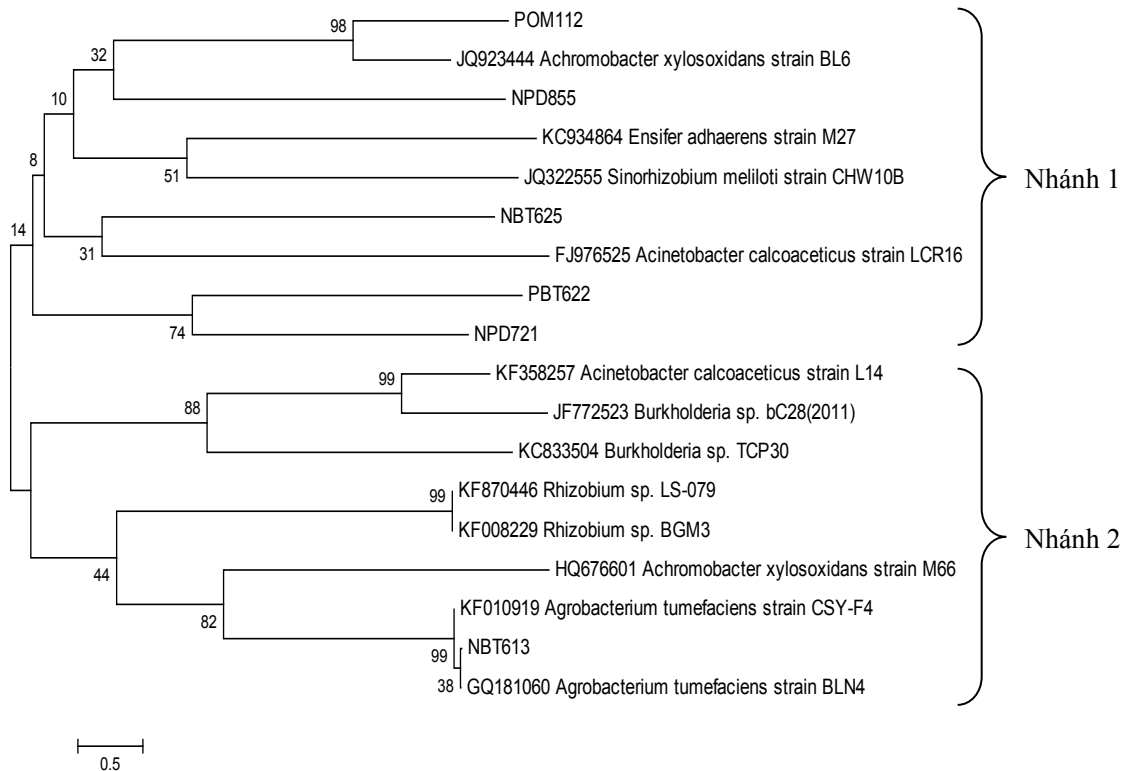
Đồng thời, 8 dòng vi khuẩn này được nhận diện bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi 27F và 1492R. Kết quả có 6 dòng cho band ở vị trí khoảng 1500 bp so với thang DNA chuẩn 100 bp plus (Hình 5).

Các dòng NBT613, NPD855, PBT622, POM112, NBT625, NPD721 được giải trình tự đoạn gen 16S rRNA với kết quả như sau: dòng NBT613 (1126 nu) có tỉ lệ tương đồng 99% với trình tự DNA của GQ181060 *Agrobacterium tumefaciens* strain BLN4 và KF010919 *Agrobacterium tumefaciens* strain CSY-F4; dòng NPD855 (1285 nu) có tỉ lệ tương đồng 99% với trình tự DNA của KC934864 *Ensifer adhaerens*

strain M27 và JQ322555 *Sinorhizobium meliloti* strain CHW10B; dòng PBT622 (1305 nu) có tỉ lệ tương đồng 97% với trình tự DNA của KF358257 *Acinetobacter calcoaceticus* strain L14 và FJ976525 *Acinetobacter calcoaceticus* strain LCR16. BGM3; dòng POM112 (1262 nu) có tỉ lệ tương đồng 97% với trình tự DNA của JQ923444 *Achromobacter xylosoxidans* strain BL6 và HQ676601 *Achromobacter xylosoxidans* strain M66; dòng NBT625 (1219 nu) có tỉ lệ tương đồng di truyền 98% với trình tự DNA của KF870446

Rhizobium sp. LS-079 và KF008229 *Rhizobium* sp. BGM3; dòng NPD721 (1321 nu) có tỉ lệ tương đồng di truyền 99% với trình tự DNA của KC833504 *Burkholderia* sp. TCP30 và JF772523 *Burkholderia* sp. bC28 (2011).

Như vậy, trừ dòng POM112 đồng hình với dòng vi khuẩn có tác động xấu đến môi trường (nên loại ra), 5 dòng còn lại đều là vi khuẩn có ích sống ở vùng rễ hay nội sinh đã được công bố ở nhiều quốc gia khác nhau trong ngân hàng dữ liệu của NCBI.



Hình 6: Cây phả hệ (phylogenetic tree) trình bày mối quan hệ di truyền giữa 6 dòng vi khuẩn vùng rễ đã được phân lập và nhận diện (theo Neighbor-joining)

Cây phả hệ được xây dựng bằng phần mềm MEGA 6.05

Cây phả hệ (Hình 6) cho thấy 6 dòng vi khuẩn phân lập nằm trên 2 nhánh với nhánh 1 gồm các dòng NBT625, NOM131, NPD721, NPD855, PBT622, POM112, POM222, trong khi ở nhánh 2 chỉ có dòng NBT613.

Vi khuẩn cùng rễ kích thích sự tăng trưởng đã được Kloepper và Schroth (1978) tìm ra và đặt tên cho nhóm vi khuẩn sống ở vùng rễ thực vật nhưng có nhiều ích lợi cho thực vật như cung cấp N sinh học, hòa tan lân khó tan, tổng hợp IAA, tạo siderophore giúp đối kháng lại nhóm vi sinh vật

gây hại cho thực vật (Bashan và de-Bashan, 2005). Vi khuẩn *Alcaligenes*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Pseudomonas* là những PGPR có khả năng cố định N sinh học (Hurel *et al.*, 1994; Baldani *et al.*, 1997; Riggs *et al.*, 2001; Cakmakci *et al.*, 2008). Gutierrez-Manero *et al.* (2001) tìm thấy *Bacillus pumilus* và *Bacillus licheniformis* tạo nhiều IAA sống vùng rễ cây xà lách và Toro *et al.* (1997) tìm thấy *Bacillus subtilis* là những PGGR gia tăng lượng lân hòa tan sống ở rễ cây hành lá. Gần đây (Farima *et al.*, 2012) phân lập và nhận diện các

dòng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* là những PGGR có khả năng tổng hợp IAA, cố định N sinh học, hòa tan lân khó tan và tạo siderophores trong rễ cây canola. Ngoài ra, vi khuẩn *Achromobacter xylosoxidans* được tìm thấy trong đất, nước (McGuckin *et al.*, 1982), là vi khuẩn gram âm hiếu khí, di động, hình que, được mô tả lần đầu vào năm 1971 bởi Yabuuchi và Ohyama, hai ông phát hiện chúng ở những bệnh nhân viêm tai giữa mãn tính vì vậy dòng này không được dùng để ứng dụng trên cây trồng mặc dù chúng cũng có những đặc tính mong muốn. Những kết quả đạt được trong nghiên cứu này cũng phù hợp với những kết quả trước đây đã báo cáo kể cả dòng *Achromobacter xylosoxidans*, có lẽ dòng vi khuẩn là những mầm bệnh tiềm sinh trong đất nhưng cũng có những đặc tính như các PGGR để chúng có thể tồn tại trong điều kiện tự nhiên khi không có ký chủ.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Bốn dòng vi khuẩn (NBT625, NBT613, NPD721, NPD855) có khả năng cố định đạm, hòa tan lân cao và dòng PBT622 có khả năng tổng hợp IAA cao đồng thời có khả năng ức chế vi sinh vật gây bệnh cho cây trồng, chúng được chọn để đánh giá hiệu quả của chúng trên rau ăn lá trồng trong chậu và ngoài đồng nhằm tiến tới sản xuất phân sinh học cho rau xanh.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả chân thành cảm ơn Trường Đại học Cần Thơ đã hỗ trợ kinh phí thực hiện đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Baldani, J.I., Caruso, L., Baldani, V.L.D., Goi, S.R., and Dobereiner, J, 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol. Biochem.*, 29:911-922.
2. Bashan, Y., and de-Bashan, L.E., 2005. Bacteria/plant growth-promotion. In: Hillel (ed.) *Encyclopedia of soils in the environment*. Elsevier, Oxford. pp. 103-115.
3. Cakmakci, R., Erdogan, U., Kotan, R., Oral, B., and Donmez, M.F., 2008. Cultivable heterotrophic N₂-fixing bacterial diversity in wild red raspberries soils in the coruh valley. In: *Proceedings of IV, National Plant Nutrition and Fertilizer Congress*, pp. 706-717 (in Turkey).
4. Đỗ Thị Trường, 2009. Thử nghiệm ảnh hưởng của một số môi trường dinh dưỡng đến sự sinh trưởng, năng suất và phẩm chất

của rau cải xanh bằng kỹ thuật thủy canh tại Đà Nẵng. *Tạp chí Khoa học Công nghệ*, số 5:103-104.

5. Farina, R., Beneduzi, A., Ambrosini, A., de Campos, S.B., Lisboa, B.B., Wendish, V., Vargas, L.K., and Pasaglia, L.M.P., 2012. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. *Applied Soil Ecology*, 55:44-52.
6. Gutierrez-Manero, F.J., Ramos-Solamo, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F.R., and Talon, M., 2001. The plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol. plant*, 245:83-93.
7. Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., Van Montagu, M., and Kellenberger, E., 1994. Root colonization and systemic spreading of *Azoacus* sp. strain BH72 in grasses. *J. Bact.*, 176:1913-1923.
8. Kloepper, J.W., and Schroth, M.N., 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radies, In: *Proceedings of the fourth international conference on plant pathogenic bacteria*. Vol 2:879-892.
9. McGuckin, M.B., Thorpe, R.J., Koch, K.M., Alavi, A., Staum, M., and Abrutyn, E., 1982. An outbreak of *Achromobacter xylosoxidans* related to diagnostic tracer procedures. *Am. J. Epidemiol.*, 115:785-793.
10. Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letter*, 170:265-207.
11. Park, M., Kim, C., Yang, J., Lee, H., Shin, W., Kim, S., and Sa, T., 2005. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research*, 160:127-133.
12. Riggs, P.J., Chelius, M.K., Iniguez, A.L., Kaeppler, S.M., and Triplett, E.W., 2001. Enhanced maize productivity with diazotrophic bacteria. *Aust. J. Plant Physiol.*, 28:829-836.
13. Schwyn, B., and Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay of the detection

- and determination of siderophores. *Analytical Biochem*, 160:47-56.
14. Tạ Thu Cúc, 2005. Giáo trình kỹ thuật trồng rau. Nhà xuất bản Hà Nội. Hà Nội. Trang 5-83.
 15. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S., 2001. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Bio. Evol*, 28:2731-2739.
 16. Toro, M., Azcon, R., and Barea, J.M., 1997. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (32-P) and nutrient cycling. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:4408–4412.
 17. Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol*, 173:697–703.
 18. Wilson, K., 1997. In: Preparation of genomic DNA from bacteria. In: *Current protocols in molecular biology*, Vol 2, eds. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K.. John Wiley and Sons, New York. pp. 241-245.
 19. Yabuuchi, E., and Ohyama, A., 1971. *Achromobacter xylosoxidans* from human ear discharge. *Jpn J Microbiol.*, 15:477-81.