



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.041

TUYỂN CHỌN VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG CỐ ĐỊNH ĐẠM, HÒA TAN LÂN, TỔNG HỢP IAA NỘI SINH TRONG CÂY CÀ PHÊ VỎI (*Coffea canephora* PIERRE EX A. FROEHNER) TRỒNG TẠI TỈNH ĐẮK LẮK

Nguyễn Hoàng Nhựt Lynch^{1*} và Nguyễn Hữu Hiệp²

¹Phòng Quản lý Khoa học, Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh An Giang

²Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Hoàng Nhựt Lynch (email: nhutlynh@gmail.com)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 21/03/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

Title:

Selection of nitrogen fixing, phosphate solubilizing and IAA synthesizing bacterial endophytes in *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner grown in Dak Lak province

Từ khóa:

Cà phê vối, cố định đạm, hòa

Keywords:

Coffea canephora, endophytic bacteria, indol acetic acid, nitrogen fixation, phosphate solubilizing

ABSTRACT

Coffea canephora is an industrial plant for the people of Tay Nguyen. The application of bio-fertilizer has been conducted in order to replace inorganic fertilizers because bio-fertilizer could support high yield and keep the healthy environment. In this research, one hundred bacterial strains were isolated from roots, leaves and berries of *Coffea canephora*, grown in Ea H'leo and Krong Nang districts, Dak Lak province. The morphological characteristics of almost colonies were round shape, raised or convex elevation, entire margin, pure white or milky white or yellow. Almost bacterial cells had rod shape, motile, Gram negative and all of them made pellicles in LGIP, NFb and BAZ semi solid media after seventy-two hours of incubation. The results showed that strain L.R150-3 had the highest ability of N₂-fixing with 0.289 mg/L of NH₄⁺ concentration, while strain B.R157-2 had the highest ability of solubilizing insoluble phosphate with 4.30 mg P₂O₅/mL and strain L.R150-1 gave the highest amount of indole acetic acid at 19.206 µg/mL. Three strains L.R150-3, B.R157-2 and L.R150-1 were determined respectively as *Kosakonia* sp. L.R150-3, *Burkholderia* sp. strain Eb-6 (KJ865578.1) B.R157-2 and *Enterobacter* sp. L.L150-1.

TÓM TẮT

Cây cà phê vối là cây công nghiệp mang lại lợi ích to lớn cho đồng bào Tây Nguyên. Sử dụng phân bón vi sinh để thay thế cho phân bón vô cơ đang được quan tâm vì phân bón vi sinh không những giúp nâng cao năng suất cây cà phê mà còn thân thiện với môi trường. Trong nghiên cứu này, 100 dòng vi khuẩn nội sinh đã được phân lập từ rễ, lá và trái cây cà phê vối trồng tại huyện Ea H'leo và Krông Năng, tỉnh Đắk Lắk. Đa số các dòng vi khuẩn có khuẩn lạc dạng tròn, độ nổi lồi hoặc mô, bìa nguyên, chủ yếu có màu trắng trong, trắng đục hoặc vàng và đều tạo thành vòng pellicle sau 72 giờ nuôi cấy trong môi trường LGIP, NFb và BAZ bán đặc. Kích thước tế bào vi khuẩn dao động trong khoảng 0,17 - 1,20 × 0,2 - 0,5 µm, đa số hình que, chuyển động và Gram âm. Kết quả khảo sát khả năng cố định đạm, hòa tan lân khó tan và sinh tổng hợp IAA cho thấy dòng L.R150-3 có khả năng tổng hợp ammonium cao nhất là 0,289 mg/L; dòng B.R157-2 có khả năng hòa tan lân khó tan đạt 4,3 mg P₂O₅/mL; dòng L.R150-1 có khả năng sinh tổng hợp IAA tốt đạt 19,206 µg/mL. Ba dòng L.R150-3, B.R157-2 và L.L150-1 được nhận diện theo thứ tự là *Kosakonia* sp. L.R150-3, *Burkholderia* sp. B.R157-2 và *Enterobacter* sp. L.L150-1.

Trích dẫn: Nguyễn Hoàng Nhựt Lynch và Nguyễn Hữu Hiệp, 2019. Tuyển chọn vi khuẩn có khả năng cố định đạm, hòa tan lân, tổng hợp IAA nội sinh trong cây cà phê vối (*Coffea canephora* Pierre ex A. froehner) trồng tại tỉnh Đắk Lắk. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(2): 34-40.

1 GIỚI THIỆU

Cây cà phê là một loại cây công nghiệp có hiệu quả kinh tế rất cao, giúp xóa đói giảm nghèo, tạo việc làm cho người lao động ở miền núi mà chủ yếu là đồng bào các dân tộc thiểu số (Trần Khải, 1999). Theo số liệu của Tổng cục Thống kê, trong 7 tháng đầu mùa vụ 2013/2014 Việt Nam đã xuất khẩu 1,1 triệu tấn cà phê các loại (cà phê nhân, cà phê rang, cà phê xay và cà phê hòa tan) với kim ngạch khoảng 2,2 tỷ USD, chỉ đứng sau lúa gạo. Mùa vụ 2013-2014, sản lượng cà phê đạt gần 1,8 triệu tấn, trong đó cà phê vối chiếm trên 95% và đưa Việt Nam trở thành quốc gia xuất khẩu cà phê vối lớn nhất thế giới (Anh Tùng, 2015).

Trong những năm gần đây, rất nhiều nghiên cứu về các vi khuẩn có ích đã được thực hiện, những vi khuẩn này có thể nội sinh hay ngoại sinh có khả năng cố định đạm tự do hoặc hòa tan các phosphate khó tan làm tăng năng suất cây trồng, đồng thời khắc phục được một số hạn chế khi sử dụng phân bón hóa học, đặc biệt là nhóm vi khuẩn nội sinh của cây trồng. Nhóm vi sinh vật này gọi là PGPB (plant growth promoting bacteria) và có những dòng thể hiện ưu điểm mạnh như *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* và *Gluconacetobacter*,... Ngoài khả năng cố định đạm, hòa tan lân khó tan, các nhóm vi khuẩn này còn có khả năng tổng hợp chất kích thích sinh trưởng thực vật IAA (indole-3-acetic acid), IBA (indole-3-butyric acid), GA (gibberelin),... (Bashan and de-Bashan, 2005) góp phần nâng cao độ phì nhiêu của đất, kích thích tăng trưởng và tăng năng suất cây trồng, hạn chế bón phân hóa học, góp phần phát triển nông nghiệp bền vững.

Nhiều nghiên cứu về PGPB trên cây cà phê đã được tiến hành từ lâu ở một số nơi trên thế giới như Mexico (Jimenez-Salgado *et al.*, 1997). Ở Việt Nam, đã có nhiều nghiên cứu phân lập vi khuẩn nội sinh trong cây lúa (Cao Ngọc Diệp và *ctv.*, 2007), cây bắp (Nguyễn Hữu Hiệp và Nguyễn Thị Mai Khanh, 2010). Tuy nhiên, nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh trong cây cà phê vối vẫn chưa được tiến hành. Vì vậy, việc phân lập và tuyển chọn một số dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm, hòa tan lân khó tan và tổng hợp IAA tốt nội sinh trong cây cà phê vối (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) trồng ở tỉnh Đắk Lắk được thực hiện.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Mẫu vật gồm lá, rễ, trái cây cà phê vối trồng tại huyện Ea H'leo và Krông Năng (Đắk Lắk). Các mẫu được thu vào buổi sáng sớm và chiếu mát vào tháng 6 năm 2016. Mẫu thu được bảo quản trong túi nylon

sạch khuẩn sau đó mang về tiến hành xử lý mẫu và phân lập tại Phòng thí nghiệm Vi sinh vật thuộc Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phân lập vi khuẩn

Mẫu sau khi thu được chuyển về phòng thí nghiệm và tiến hành khử trùng bề mặt theo mô tả của Nguyễn Hữu Hiệp và Nguyễn Thị Mai Khanh (2010).

Mẫu đã khử trùng đạt yêu cầu chuyển 2 g cho vào cối sứ vô trùng già nhuyễn rồi thêm 2 mL nước cất vô trùng vào cối. Dung dịch sau khi nghiền tiến hành pha loãng theo dãy nồng độ 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} sau đó hút 50 μ L dung dịch ở các nồng độ pha loãng được chuyển vào các môi trường LGIP (Cavalcante and Dobereiner, 1988), NfB (Kirchhof *et al.*, 1997) và BAZ (Santos *et al.*, 2001) bán đặc. Môi trường được ủ 2 - 3 ngày đến khi thấy vòng sáng (pellicle) xuất hiện là dấu hiệu sự phát triển của vi khuẩn nội sinh thì cấy 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 (Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp, 2002).

2.2.2 Khảo sát khả năng tổng hợp ammonium, tổng hợp IAA, hòa tan lân khó tan của những dòng vi khuẩn phân lập được

Các dòng vi khuẩn ròng được khảo sát khả năng tổng hợp ammonium trong môi trường LGIP, NfB và BAZ lỏng bằng phương pháp so màu indophenol blue ở bước sóng 636 nm ($OD_{636\text{ nm}}$); khảo sát khả năng tổng hợp IAA trong môi trường LGIP, NfB và BAZ lỏng có bổ sung tryptophan (100 mg/L) bằng phương pháp so màu salkowsky ở bước sóng 530 nm ($OD_{530\text{ nm}}$); khảo sát khả năng hòa tan lân khó tan bằng phương pháp định tính sử dụng môi trường nuôi vi khuẩn NBRIP (Nautiyal, 1999); xác định hiệu quả hòa tan lân $E\% = (\text{đường kính vòng sáng halo}/\text{đường kính khuẩn lạc}) \times 100$ (Nguyen *et al.*, 1992); định lượng lân hòa tan bằng phương pháp so màu molybdenum blue ở bước sóng 880 nm ($OD_{880\text{ nm}}$).

2.2.3 Nhận diện các dòng vi khuẩn triển vọng bằng kỹ thuật sinh học phân tử

DNA vi khuẩn được chuẩn bị theo quy trình của Trần Nhân Dũng và Nguyễn Vũ Linh (2011), sau đó tiến hành phản ứng PCR vùng gene 16S-rRNA bằng cặp mồi 27F và 1492R (Lane, 1991) với trình tự như sau: 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTC-3'); 1492R (5'-TACGTTACCTTGTTACGACT-3'). Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự tại công ty First BASE Laboratories Sdn Bhd

(Malaysia). Công cụ BLAST N được sử dụng để so sánh trình tự DNA của các dòng vi khuẩn triển vọng với trình tự DNA của bộ gene các loài vi khuẩn trong ngân hàng dữ liệu NCBI để định danh

2.2.4 Xử lý số liệu

Số liệu trong nghiên cứu được xử lý bằng chương trình Microsoft Excel 2010, phân tích ANOVA và kiểm định Tukey HSD bằng phần mềm thống kê MiniTab 17.1.0.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập vi khuẩn nội sinh

Từ 50 mẫu rễ, lá và trái của cây cà phê vối thu tại huyện Ea H'leo và Krông Năng (Đắk Lắk), 100 dòng vi khuẩn đã được phân lập, trong đó 25 dòng từ rễ, 61 dòng từ lá và 14 dòng từ trái.

Kết quả kiểm tra khả năng phát triển của 100 dòng vi khuẩn trong 72 giờ đã tuyển chọn được 50 dòng vi khuẩn phát triển tốt trên từng loại môi trường để tiếp tục theo dõi các đặc điểm khuẩn lạc và tế bào, đồng thời làm cơ sở tiến hành các thí nghiệm khảo sát khả năng tổng hợp ammonium, hòa tan lân khó tan và tổng hợp IAA

Bảng 1: Đặc điểm khuẩn lạc vi khuẩn phân lập

Đặc điểm khuẩn lạc	Mô tả	Số lượng dòng vi khuẩn	Tỷ lệ (%)
Hình dạng	Tròn	50	100,0
	Trắng trong	30	60,0
	Trắng đục	16	32,0
	Vàng nhạt	2	4,0
Màu sắc	Vàng	2	4,0
	Nguyên	48	96,0
	Không đều	2	4,0
Dạng bìa	Mô	13	26,0
	Lài	35	70,0
Độ nổi	Phẳng	2	4,0

Bảng 2: Đặc điểm vi khuẩn phân lập

Đặc điểm tế bào	Mô tả	Số lượng dòng vi khuẩn	Tỷ lệ (%)
Hình dạng	Hình que	42	84,0
	Hình cầu	8	16,0
Gram	-	50	100,0
	+	0	0,0
Chuyển động	-	14	28,0
	+	36	72,0

Đa số các dòng vi khuẩn có khuẩn lạc tròn, màu trắng trong, độ nổi lồi, có dạng bìa nguyên, kích thước khuẩn lạc dao động từ 0,1 - 4,0 mm sau 2 ngày nuôi cấy trên 3 loại môi trường (Bảng 1). Đa số các

dòng vi khuẩn phân lập được đều có khả năng chuyển động và tất cả đều là vi khuẩn Gram âm (Bảng 2). Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Santos *et al.* (2001), Jimenez-Salgado *et al.* (1997), Vega *et al.* (2005) về các vi khuẩn nội sinh cây cà phê thuộc các chi *Burkholderia*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*... đều thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm. Tế bào vi khuẩn có dạng hình que hoặc hình cầu, kích thước tế bào biến động trong khoảng 0,17 - 1,20 $\mu\text{m} \times 0,2 - 0,5 \mu\text{m}$.

3.2 Khả năng tổng hợp ammonium

Năm mươi dòng vi khuẩn phân lập đều có khả năng tổng hợp NH_4^+ từ 0,121-0,289 mg/L và các dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường LGIP có khả năng tổng hợp NH_4^+ cao hơn so với các dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường BAZ và NFb. Từ 50 dòng vi khuẩn thử nghiệm tuyển chọn được 10 dòng vi khuẩn có khả năng tổng hợp NH_4^+ tốt (Bảng 3). Kết quả cho thấy khả năng tổng hợp NH_4^+ của 10 dòng vi khuẩn triển vọng sau 6 ngày ủ đều được phân lập trên môi trường LGIP và các dòng vi khuẩn phân lập từ rễ có khả năng tổng hợp NH_4^+ cao hơn các dòng vi khuẩn phân lập từ lá và trái của cây cà phê vối. Jimenez-Salgado *et al.* (1997) cho biết các dòng vi khuẩn nội sinh và vi khuẩn vùng rễ cây cà phê phân lập được có khả năng cố định đạm tốt.

Bảng 3: Hàm lượng đạm do 10 dòng vi khuẩn triển vọng tổng hợp theo thời gian (mg/L NH_4^+)

Dòng vi khuẩn	Nguồn gốc vi khuẩn	Ngày 4	Ngày 6
L.H137-1	Trái	0,265 ^{abc}	0,185 ^a
L.L109-1	Lá	0,257 ^{a-c}	0,157 ^{c-f}
L.L120-2	Lá	0,286 ^a	0,121 ⁱ
L.R150-1	Rễ	0,268 ^{ab}	0,183 ^{ab}
L.R150-3	Rễ	0,289 ^a	0,150 ^{e-h}
L.R151-2	Rễ	0,261 ^{a-d}	0,170 ^{a-d}
L.R152-1	Rễ	0,264 ^{abc}	0,152 ^{d-g}
L.R155-3	Rễ	0,274 ^{ab}	0,149 ^{e-h}
L.R156-1	Rễ	0,268 ^{ab}	0,125 ⁱ
L.V135-1	Vỏ trái	0,241 ^{b-f}	0,156 ^{c-f}
CV (%)		4,921	4,279

Trong cùng một ngày, các số trung bình theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% (theo phép thử Tukey HSD)

Các dòng vi khuẩn này có khuynh hướng tổng hợp NH_4^+ cao vào ngày thứ 4 và giảm dần đến ngày thứ 6. Nguyên nhân do vi khuẩn phát triển và tăng sinh khối theo thời gian nên lượng NH_4^+ tổng hợp tăng dần. Ngày thứ 4 thì lượng NH_4^+ tổng hợp tăng cao. Khi lượng NH_4^+ trong môi trường tăng cao vượt quá giới hạn sẽ ức chế ngược lại vi khuẩn, vi khuẩn sử dụng lượng NH_4^+ có sẵn trong môi trường và không tổng hợp thêm NH_4^+ nên lượng NH_4^+ khảo sát

vào ngày thứ 6 giảm (Van and Sloger, 1981). Nguyên nhân thứ hai là do hàm lượng dinh dưỡng trong môi trường dần cạn kiệt theo thời gian ức chế sự phát triển của các dòng vi khuẩn và ức chế quá trình tổng hợp NH_4^+ .

Các dòng vi khuẩn này có khuynh hướng tổng hợp NH_4^+ cao vào ngày thứ 4 và giảm dần đến ngày thứ 6. Nguyên nhân do vi khuẩn phát triển và tăng sinh khối theo thời gian nên lượng NH_4^+ tổng hợp tăng dần. Ngày thứ 4 thì lượng NH_4^+ tổng hợp tăng cao. Khi lượng NH_4^+ trong môi trường tăng cao vượt quá giới hạn sẽ ức chế ngược lại vi khuẩn, vi khuẩn sử dụng lượng NH_4^+ có sẵn trong môi trường và không tổng hợp thêm NH_4^+ nên lượng NH_4^+ khảo sát vào ngày thứ 6 giảm (Van and Sloger, 1981). Nguyên nhân thứ hai là do hàm lượng dinh dưỡng trong môi trường dần cạn kiệt theo thời gian ức chế sự phát triển của các dòng vi khuẩn và ức chế quá trình tổng hợp NH_4^+ .

3.3 Khả năng tổng hợp IAA

Kết quả thí nghiệm cho thấy 10 dòng vi khuẩn triển vọng đều có khả năng tổng hợp IAA. Kết quả nghiên cứu của Ahemad and Kibret (2014) và Santoyo *et al.* (2016) thì các dòng vi khuẩn nội sinh có khả năng tổng hợp IAA giúp kích thích cây chủ phát triển tốt.

Bảng 4: Hàm lượng IAA do 10 dòng vi khuẩn triển vọng tổng hợp theo thời gian ($\mu\text{g/mL}$)

Dòng vi khuẩn	Ngày 2	Ngày 4	Ngày 6
L.H137-1	14,30 ^b	18,38 ^b	13,95 ^c
L.L109-1	3,63 ^e	7,12 ^f	5,39 ^e
L.L120-2	3,04 ^e	2,14 ^g	0,63 ^f
L.R150-1	11,17 ^c	15,03 ^d	19,21 ^a
L.R150-3	30,99 ^a	17,45 ^{bc}	12,92 ^c
L.R151-2	13,92 ^b	16,42 ^c	15,61 ^b
L.R152-1	3,82 ^e	7,96 ^f	6,54 ^e
L.R155-3	8,37 ^d	10,45 ^c	8,53 ^d
L.R156-1	13,42 ^b	10,86 ^c	9,60 ^d
L.V135-1	11,24 ^c	19,43 ^a	13,98 ^c
CV (%)	3,10	2,91	4,19

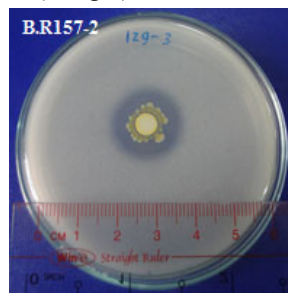
Trong cùng một ngày, các số trung bình theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% (theo phép thử Tukey HSD)

Ngoài khả năng tổng hợp NH_4^+ , các dòng vi khuẩn phân lập được trong nghiên cứu này còn có khả năng tổng hợp IAA và dòng L.R150-1 được xem là triển vọng so với các dòng còn lại, hàm lượng IAA do dòng này tổng hợp tăng dần theo thời gian từ ngày thứ 2 đến ngày thứ 4 và đạt cao nhất vào ngày thứ 6 (19,21 $\mu\text{g/mL}$).

3.4 Khả năng hòa tan lân khó tan

3.4.1 Độ hữu hiệu của các dòng vi khuẩn hòa tan lân khó tan

Hai mươi sáu dòng vi khuẩn có khả năng hòa tan lân từ dạng khó tan thành dạng dễ hấp thu và làm biến đổi màu môi trường NBRIP từ màu trắng đục sang màu vàng do chúng tiết ra các acid hữu cơ (acid gluconic, acid 2-ketogluconic,...) để hòa tan lân khó tan trong môi trường (Hình 1). Kết quả nghiên cứu của Teshome *et al.* (2017) cho thấy các dòng vi khuẩn phân lập từ cây cà phê ở phía Nam Ethiopia có khả năng hòa tan lân rất tốt. Kết quả tương tự cũng được tìm thấy bởi Muleta *et al.* (2013) khi nghiên cứu các dòng vi khuẩn hòa tan lân từ cây cà phê trồng ở Tây Nam của Ethiopia. Chín dòng vi khuẩn phân lập được từ cây cà phê vối có khả năng hòa tan lân tốt (Bảng 5).



Hình 1: Vòng sáng halo của dòng vi khuẩn B.R157-2 trên môi trường NBRIP đặc

Đa số các dòng vi khuẩn này có hiệu suất hòa tan lân khó tan tăng dần theo thời gian từ ngày thứ 2 đến ngày thứ 4 và đạt cao nhất vào ngày thứ 6. Một số dòng vi khuẩn có hiệu suất tăng cực đại vào ngày thứ 4 và giảm dần đến ngày thứ 6 chứng tỏ các dòng vi khuẩn này sử dụng lượng lân hòa tan để phát triển sinh khối (Imazu *et al.*, 1998).

Bảng 5: Hiệu suất hòa tan lân của 9 dòng vi khuẩn triển vọng (E%)

Dòng vi khuẩn	Ngày 2	Ngày 4	Ngày 6
B.L117-2	133,3 ^{d-h}	176,4 ^{b-f}	192,2 ^{a-d}
B.R153-1	128,6 ^{d-h}	166,7 ^{c-g}	193,5 ^{a-d}
B.R157-2	211,1 ^a	250,0 ^a	241,3 ^a
L.L112-1	155,6 ^{b-f}	227,8 ^{ab}	230,4 ^{ab}
L.L113-1	144,4 ^{c-h}	176,2 ^{b-f}	190,5 ^{a-d}
L.L116-1	177,8 ^{abc}	222,2 ^{abc}	227,8 ^{ab}
L.L120-2	161,1 ^{b-e}	185,7 ^{b-e}	214,3 ^{abc}
L.V135-1	154,8 ^{b-g}	180,6 ^{b-e}	191,6 ^{a-d}
N.L102-1	166,7 ^{bcd}	204,2 ^{a-d}	223,6 ^{abc}
CV (%)	8,5	7,8	7,7

Trong cùng một ngày, các số trung bình theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% (theo phép thử Tukey HSD)

3.4.2 Định lượng lân hòa tan của các dòng vi khuẩn triển vọng

Kết quả nghiên cứu cho thấy 9 dòng vi khuẩn triển vọng đều có khả năng hòa tan lân khó tan. Các

dòng vi khuẩn có lượng lân hòa tan tăng dần theo thời gian từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 15 sau đó giảm dần đến ngày thứ 20. Hàm lượng lân hòa tan dao động từ 1,32 - 4,30 mg/mL (Bảng 6).

Bảng 6: Hàm lượng lân hòa tan đo được bởi 9 dòng vi khuẩn theo thời gian

Dòng vi khuẩn	Ngày 5	Ngày 10	Ngày 15	Ngày 20
B.L117-2	1,71 ^{bc}	1,92 ^{ab}	3,34 ^c	3,25 ^{bc}
B.R153-1	1,32 ^d	1,80 ^b	3,94 ^{ab}	3,20 ^{bc}
B.R157-2	1,56 ^{cd}	2,15 ^a	4,30 ^a	4,17 ^a
L.L112-1	1,66 ^{bc}	1,95 ^{ab}	4,08 ^{ab}	2,88 ^c
L.L113-1	1,92 ^{ab}	2,12 ^a	3,39 ^c	2,23 ^d
L.L116-1	1,97 ^{ab}	2,09 ^{ab}	3,44 ^c	2,99 ^c
L.L120-2	1,43 ^{cd}	2,00 ^{ab}	3,76 ^{bc}	3,69 ^{ab}
L.V135-1	2,05 ^a	2,05 ^{ab}	4,18 ^{ab}	3,65 ^{ab}
N.L102-1	1,42 ^{cd}	1,98 ^{ab}	4,25 ^a	2,82 ^c
CV (%)	6,68	5,14	3,92	5,83

Trong cùng một ngày, các số trung bình theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5%(theo phép thử Tukey HSD)

3.5 Kết quả nhận diện các dòng vi khuẩn nội sinh

Ba dòng vi khuẩn triển vọng L.R150-3, B.R157-2 và L.R150-1 có độ tương đồng 95-96% với 3 dòng vi khuẩn trong ngân hàng gene NCBI (Bảng 7).

Dòng vi khuẩn L.R150-3 tương đồng với vi khuẩn *Kosakonia oryzae* VITPSCQ3 (95%). Loài *Kosakonia oryzae* được biết đến với tên trước đây là

Enterobacter oryzae trong nhiều nghiên cứu trước năm 2013 (Oren and Garrity, 2013). *Kosakonia oryzae* (*Enterobacter oryzae*) là một trong những vi khuẩn có khả năng cố định đạm (Ruppel and Merbach, 1995), tổng hợp các phytohormone như các hợp chất auxin (indole-3-acetic acid), hòa tan lân khó tan và có thể ức chế sự phát triển của một số nấm gây bệnh (Harodoim *et al.*, 2013).

Bảng 7: Kết quả so sánh trình tự các dòng vi khuẩn phân lập với cơ sở dữ liệu NCBI

Dòng vi khuẩn	Vi khuẩn tương đồng trên cơ sở dữ liệu	Mức độ tương đồng (%)	Accession number
L.R150-3	<i>Kosakonia oryzae</i> VITPSCQ3	95	KR149275.1
B.R157-2	<i>Burkholderia cepacia</i> Eb-6	96	KJ865578.1
L.R150-1	<i>Enterobacter cloacae</i> Klu 13f	95	KF912873.1

Dòng vi khuẩn B.R157-2 tương đồng với vi khuẩn *Burkholderia cepacia* Eb-6 (96%). Vào năm 2005, nhóm nghiên cứu của Vega *et al.* đã phân lập được dòng *Burkholderia cepacia* từ rễ cây cà phê chè tại Colombia và sau đó, loài này cũng đã được phân lập từ cây thông đất (*Lycopodium cernuum* L.) trên môi trường NBRIY trong nghiên cứu của Ghosh *et al.* (2016). *Burkholderia cepacia* có khả năng cố định đạm, hòa tan lân khó tan và tổng hợp IAA cao (Ghosh *et al.*, 2016), giúp cây trồng tăng khả năng kháng nấm bệnh từ đó giảm lượng thuốc trừ sâu sử dụng (Hebbar *et al.*, 1998). Castro-Toro and Rivillas-Osorio (2002) đã sử dụng *Burkholderia cepacia* để kiểm soát nấm *Rosellinia bunodes* gây bệnh thối cổ rễ ở cây cà phê. Điều này cho thấy loài này có khả năng ứng dụng trong sản xuất phân hữu cơ sinh học và là tác nhân kiểm soát sinh học phục vụ công tác quản lý bệnh cây.

Dòng vi khuẩn L.R150-1 tương đồng với vi khuẩn *Enterobacter cloacae* Klu 13f (95%). *Enterobacter cloacae* phân lập từ lúa mì (*Triticum aestivum* L.) có khả năng cố định đạm, hòa tan lân khó tan (7,14±1,27 µg/mL) và tổng hợp IAA tốt (3,117±0,2 µg/mL) (Singh *et al.*, 2017). Ngoài ra, nghiên cứu của Suprapta *et al.* (2014) cũng cho thấy *Enterobacter cloacae* giúp thúc đẩy tăng trưởng và tăng năng suất cây lúa.

4 KẾT LUẬN

Năm mươi dòng vi khuẩn nội sinh từ rễ, lá, trái cây cà phê vối trồng tại tỉnh Đắk Lắk đã được phân lập và tuyển chọn. Ba dòng vi khuẩn triển vọng L.R150-3, B.R157-2 và L.L150-1 được nhận diện theo thứ tự là *Kosakonia* sp. L.R150-3, *Burkholderia* sp. B.R157-2 và *Enterobacter* sp. L.L150-1. Các thí nghiệm đồng ruộng ứng dụng 3 dòng vi khuẩn này cần được thực hiện trước khi tiến

hành sản xuất phân bón vi sinh cho cây cà phê vối trồng ở tỉnh Đắk Lắk

LỜI CẢM ƠN

Chân thành cảm ơn anh Trần Cao Khải (Chi cục Thú y tỉnh Đắk Lắk), anh Lê Rể (Phòng Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn huyện Krông Năng), anh Hoàng Văn Minh (Phòng Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn huyện Ea H'Leo), các anh/chị Phòng Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn huyện Krông Năng và huyện Ea H'Leo đã tận tình hỗ trợ trong suốt thời gian thu mẫu tại tỉnh Đắk Lắk.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ahemad, M. and Kibret, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobia: current perspective. *J. King Saud Univ.*, 26: 1-20.

Anh Tùng, 2015. Cà phê Việt Nam những năm qua. *Tạp chí Thông tin Khoa học và Công nghệ.* 3: 8-12.

Bashan, Y. and Bashan, L.E. 2005. Plant Growth-Promoting. In: Hillel, D. (Editor). *Encyclopedia of soils in the environment.* Elsevier. Oxford. The United Kingdom. Paper 103-115.

Castro-Toro, A.M. and Rivillas-Osorio, C.A. 2002. *Entrophospora colombiana*, *Glomus manihotis* y *Burkholderia cepacia* en el control de *Rosellinia bunodes*, agente causante de la llaga negra del café. *Cenicafé*, 53(3): 193-218.

Cavalcante, V.A. and Döbereiner, J. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, 108(1): 23-31.

Trần Nhân Dũng và Nguyễn Vũ Linh, 2011. *Giáo trình Tin Sinh học.* Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ. 154 trang.

Cao Ngọc Điệp và Nguyễn Hữu Hiệp, 2002. *Giáo trình thực tập vi sinh vật đại cương.* Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ. 52 trang.

Cao Ngọc Điệp, Phạm Thị Khánh Vân và Lăng Ngọc Đậu, 2007. Phát hiện vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* nội sinh trong cây lúa mùa cao sản (*Oryza sativa* L.) trồng ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Tuyển tập Báo cáo Khoa học Hội nghị toàn quốc 2007 - Nghiên cứu cơ bản trong Khoa học sự sống*, ngày 10 tháng 08 năm 2007, Quy Nhơn. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật. Trang 456-459.

Ghosh, R., Barmana, S., Mukherjee, R. and Mandala, N.C. 2016. Role of phosphate solubilizing *Burkholderia* spp. for successful colonization and growth promotion of *Lycopodium cernuum* L. (*Lycopodiaceae*) in lateritic belt of Birbhum district of West Bengal, India. *Microbiological Res.* 183: 80-91.

Hardoim, P.R., Naziri, R., Sessitsch, A., Elhottová, D., Korenblum, E., Overbeek, L.S. and Elsas, J.D. 2013. The new species *Enterobacter oryziphilus* sp. nov. and *Enterobacter*

oryzendorphyticus sp. nov. are key inhabitants of the endosphere of rice. *BMC Microbiology*, 13: 1-3.

Imazu, K., Tanaka, S., Kuroda, A., Anbe, Y., Kato, J. and Ohtake, H. 1998. Enhanced Utilization of Phosphonate and Phosphite by *Klebsiella aerogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10): 3754-3758.

Jimenez-Salgado, T., Fuentes-Ramirez, L.E., Tapia-Hernandez, A., Mascarua-Esparza, M.A., Martinez-Romero, E. and Caballero-Mellado, J. 1997. *Coffea arabica* L., a New Host Plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and Isolation of Other Nitrogen-Fixing Acetobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9): 3676-3683.

Trần Khải, 1999. Lời giới thiệu. Trong: Đoàn Triệu Nhạn, Hoàng Thanh Tiệm và Phan Quốc Sùng (Chủ biên). *Cây cà phê ở Việt Nam.* Nhà xuất bản Nông Nghiệp. Trang 3-4.

Kirchhof, G., Reis, V.M., Baldani, J.I., Eckert, B., Döbereiner, J. and Hartmann, A. 1997. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. *Plant and Soil*, 194(1): 45-55.

Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E. and M. Goodfellow (Editors). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics.* John Wiley and Sons. Chichester. The United Kingdom. Paper 115-175.

Muleta, D., Assefa, F., Borjesson, E. and Granhall, U. 2013. Phosphate-solubilising rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forests of southwestern of Ethiopia. *J. Saudi Society of Agric. Sci.* 12: 73-84.

Nautiyal, CS. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1): 265-270.

Nguyen, C., Yan, W., Le Tacon, F. and Lapeyrie, F. 1992. Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton. *Plant and Soil*, 143(2): 193-199.

Nguyễn Hữu Hiệp và Nguyễn Thị Mai Khanh, 2010. Phân lập và nhận diện một số chủng vi khuẩn cố định nitơ trên cây bắp. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, số 16(a): 151-156.

Nguyễn Hữu Hiệp, Renato Fani, Lê Ngọc Thúy, Ngô Bảo Ngọc, Trần Thị Ngọc Tố và Phạm Thị Khánh Vân, 2008. Phân lập các dòng vi khuẩn nội sinh để sản xuất phân vi sinh ở quy mô phòng thí nghiệm cho cây mía trồng tại tỉnh Sóc Trăng. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ.* 8: 149-157.

Oren, A. and Garrity, G.M. 2013. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of*

- Systematic and Evolutionary Microbiology, 63: 3931-3934.
- Ruppel, S. and Merbach., W. 1995. Effects of different nitrogen sources on nitrogen fixation and bacterial growth of *Pantoea agglomerans* and *Azospirillum* sp. in bacterial pure culture: An investigation using $^{15}\text{N}_2$ incorporation and acetylene reduction measures. *Microbiological Res*, 150: 409-418.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G. and Orozco-Mosqueda, MD C. 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Res*. 183: 92-99.
- Santos, P.E.D.L., Bustillos-Cristales, R. and Caballero-Mellado, J. 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(6): 2790-2798.
- Singh, R.P., Jha, P. and Jha, P.N. 2017. Bio-inoculation of Plant Growth-promoting Rhizobacterium *Enterobacter cloacae* ZNP-3 Increased Resistance Against Salt and Temperature Stresses in Wheat Plant (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, 36(3): 783-798.
- Suprpta, D.N., Maulina, N.M.I. and Khalimi, K. 2014. Effectiveness of *Enterobacter cloacae* to Promote the Growth and Increase the Yield of Rice. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 4(1): 44-50.
- Teshome, B., Wassie, M. and Abatneh, E. 2017. Isolation, Screening and Biochemical Characterization of phosphate solubilizing Rhizobacteria Associated with *Coffea arabica* L. *J. Fertilizers and Pesticides*. 8 (3): 1-6.
- Van, B.P. and Sloger, C. 1981. Ontogenetic variation of nitrogenase, nitrate reductase and glutamin synthetase activities in *Oryza sativa* Rice. *Plant Physiol.*, 68: 722-726.
- Vega, F.E., Pava-Ripoll, M., Posada, F. and Buyer, J.S. 2005. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. *J. Basic Microbiol.*, 45(5): 371-380.