

# ĐẶC TÍNH VI KHUẨN NỘI SINH PHÂN LẬP TRONG CÂY KHÓM TRỒNG TRÊN ĐẤT PHÈN VĨNH THUẬN, TỈNH KIÊN GIANG

Cao Ngọc Điệp<sup>1</sup> và Nguyễn Thành Dũng<sup>2</sup>

## ABSTRACT

One hundred and three bacterial isolates were isolated from aerial tissues of pineapples cultivated on acid sulphate soil of Vinhthuan district, Kiengiang province. Eighty-five isolates were identified as endophytic bacteria with 16S-rDNA PCR technique, 38/85 endophytes with several good composite characteristics (such as IAA biosynthesis, phosphate solubilization and fixing nitrogen) were detected based on biochemical tests. Sequencing 16S-rDNA gene of 3/38 these endophytes, the results showed that LK4 isolate (LGI medium) and BK1 isolate (Baz medium) had 99.2% and 99.4% identity with *Burkholderia tropica* NR\_028965, respectively while the identity of NK2 isolate (NFb medium) with *Enterobacter hormaechei* GQ9006 was 99.6%. Interestingly, LK4, NK2, BK1 endophytes had the best composite characteristics, they will be suggested for bio-fertilizer production.

**Keywords:** Bio-fertilizer, Endophytic bacteria, IAA biosynthesis, nitrogen fixation, phosphate solubilization

**Title:** Characteristics of endophytic bacteria isolated from pineapples cultivated on acid sulphate soil of Vinh Thuan district, Kien Giang province

## TÓM TẮT

Một trăm lẻ ba dòng vi khuẩn được phân lập trong cây khóm trồng ở huyện Vĩnh Thuận, tỉnh Kiên Giang trong đó có 85 dòng được xác định là vi khuẩn nội sinh bằng kỹ thuật PCR 16S-rDNA. Sử dụng phép thử sinh hóa đã xác định được 38/85 dòng vi khuẩn nội sinh có đủ 3 đặc tính tốt (cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA). Tuy nhiên, khi giải trình tự đoạn gen 16S-rDNA của 3/38 dòng vi khuẩn này, xác định được dòng LK4 được phân lập trên môi trường LGI và dòng BK1 được phân lập trên môi trường BAZ có tỉ lệ đồng hình của đoạn gen 16S-rDNA với loài *Burkholderia tropica* NR\_028965 là 99,2% và 99,4% theo thứ tự; tỉ lệ đồng hình đoạn gen 16S-rDNA của dòng NK2 được phân lập trên môi trường NFb với loài *Enterobacter hormaechei* GQ 9006 là 99,6%. Đề nghị đưa ba dòng vi khuẩn (LK4, NK2, BK1) có các đặc tính tốt này vào sản xuất phân sinh học bón cho cây trồng.

**Từ khóa:** Cố định đạm sinh học, hòa tan lân khó tan, Phân sinh học, sinh tổng hợp IAA, Vi khuẩn nội sinh

## 1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Khóm (dứa) (*Ananas comosus* [L.] Merr) đã được trồng ở nhiều vùng rộng lớn trong những nước nhiệt đới (Weber *et al.*, 1999). Ở nước ta, khóm là một trong ba loại cây ăn quả hàng đầu: chuối, khóm, cam quýt (Trần Thế Tục và Vũ Mạnh Hải, 2000) và khóm được trồng ở nhiều vùng trong cả nước, nhưng được trồng nhiều ở

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học

<sup>2</sup> Trường THPT An Minh, Kiên Giang

các tỉnh phía Nam, chiếm 75,43% tổng diện tích trồng khóm của cả nước, trong đó các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) chiếm đến 69,36% diện tích khóm cả nước, những tỉnh có diện tích trồng khóm lớn là: Kiên Giang, Cà Mau, Bạc Liêu, Hậu Giang, Sóc Trăng và trái khóm dùng để ăn tươi hoặc chế biến thành các sản phẩm xuất khẩu. Ở ĐBSCL, trên đất phèn, khóm là cây tiên phong đi mở đường cho các loại hoa màu và các cây trồng khác như: mía, chuối, rau đậu... Quả khóm được xem là “hoàng hậu” của các loại quả vì hương vị thơm ngon, giàu chất dinh dưỡng (Đường Hồng Dật, 2003). Theo tính toán, trung bình 1 ha trồng trọt khóm lấy đi từ đất 86 kg N (trong đó thân lá 74 kg, quả 9 kg), 28 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (thân lá 23 kg, quả 5 kg) và 437 kg K<sub>2</sub>O (thân lá 402 kg, quả 35 kg), cùng với các nguyên tố trung và vi lượng và đạt năng suất cao, nông dân phải bón nhiều phân hóa học trong đó phân đạm hóa học lên đến 200 kg N/ha/vụ (Weber *et al.*, 1999). Theo Zinniel *et al* (2002), vi khuẩn nội sinh được tìm thấy trong rất nhiều loại cây trồng ở Hoa Kỳ, vi khuẩn nội sinh là các vi khuẩn từ vùng rễ xâm nhập vào rễ, thân và lá để sống bên trong các mô thực vật mà không gây hại hay cạnh tranh dinh dưỡng với cây chủ; trái lại chúng xúc tiến sự sinh trưởng của cây chủ; Vi khuẩn nội sinh giúp tăng cường sự sinh trưởng của cây bằng cách tổng hợp kích thích tố auxin (IAA) (Barbieri *et al.*, 1986), tăng hàm lượng các chất khoáng, tăng khả năng kháng nhiều nguồn bệnh khác nhau của cây (Fashey *et al.*, 1991; Bandara *et al.*, 2006), giúp cố định đạm sinh học, giảm tính mầm cảm với mầm bệnh và sự thay đổi của thời tiết gây tổn hại cho cây, chúng có thể giúp loại bỏ các chất gây ô nhiễm (Rosenblueth và Martínez-Romero, 2006), làm tăng hàm lượng các chất khoáng, tăng khả năng kháng bệnh của cây (Fahey *et al.*, 1991), giúp cố định đạm sinh học, giảm tính mầm cảm với mầm bệnh và sự thay đổi của thời tiết gây tổn hại cho cây (Xu *et al.*, 1998). Những thí nghiệm trước đây đã phát hiện vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* trong cây lúa mùa đặc sản ở ĐBSCL (Cao Ngọc Điệp *et al.*, 2007), trong cây cỏ chăn nuôi (Nguyễn Thị Thu Hà *et al.*, 2009). Để tiến tới một nền nông nghiệp bền vững với một sản phẩm đạt tiêu chuẩn Global-GAP, cây khóm trồng trên đất phèn như vùng đất Vĩnh Thuận, Kiên Giang cần được nghiên cứu những vi khuẩn nội sinh, xác định và đánh giá một số đặc tính tốt như cố định đạm sinh học, hòa tan lân khó tan, sinh tổng hợp kích thích tố tăng trưởng thực vật như IAA của các dòng vi khuẩn nội sinh này để ứng dụng những vi khuẩn nội sinh tốt cho cây trồng nói chung và cây khóm nói riêng như là dạng phân sinh học trong tương lai.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1 Vật liệu

Cây khóm (*Ananas comosus* [L.] Merr) được thu mẫu từ các vùng chuyên canh thuộc hai xã Vĩnh Bình Bắc và Vĩnh Bình Nam huyện Vĩnh Thuận – tỉnh Kiên Giang.

### 2.2 Phân lập vi khuẩn

Để loại trừ các vi sinh vật có khả năng còn bám ở bề mặt, mẫu (thân, rễ, lá, hoa/trái) sau khi thu thập được xử lý như sau: tách bỏ lớp vỏ ngoài (bẹ lá) của phần thân, rửa sạch mẫu dưới vòi nước mạnh; tiếp tục rửa lại bằng nước cất vô trùng rồi

cắt mẫu thành những đoạn nhỏ 1 - 2 cm, làm khô mẫu bằng giấy hút ẩm; sau đó khử trùng mẫu bằng cồn 96% trong 3 phút, 1% hypochloride trong 3 phút, 3% hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) trong 3 phút và rửa lại với nước cất vô trùng 4 lần để tẩy rửa các loại hóa chất còn thừa. Để kiểm tra khả năng các vi sinh vật còn sót lại trên bề mặt mẫu sau khi khử trùng, 200 µl nước cất vô trùng đã rửa mẫu ở lần cuối được chủng lên các đĩa môi trường tryptone – yeast extract – glucose – agar và ủ ở 30°C, nếu sau 24h ủ các đĩa môi trường này không có các khuẩn lạc xuất hiện thì các mẫu đã khử trùng đạt yêu cầu. Các mẫu đã khử trùng đạt yêu cầu được cho vào các cối bằng sứ đã khử trùng và dùng chày sứ vô trùng giã mịn mẫu, thêm 10 ml nước cất tiệt trùng, sau đó tất cả mẫu được cho vào một ống falcon-50mL vô trùng. Lấy 200 µl dịch mẫu nghiền cho vào các ống nghiệm chứa 3 ml môi trường LGI (Cavalcante và Dobereiner, 1988), Nfb (Krieg và Döbereiner, 1984) và BAZ bán đặc (Santos *et al.*, 2001) rồi đem ủ ở 30°C trong 2 - 3 ngày; mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

Sau 2 - 3 ngày nuôi, quan sát thấy các ống nghiệm chứa các môi trường bán đặc LGI, Nfb và BAZ đã chủng dịch trích của mẫu xuất hiện một lớp màng mỏng cách mặt môi trường nuôi khoảng 0,5 cm chỉ thị có sự hiện diện của vi khuẩn nội sinh. Lấy một ít vi khuẩn từ các màng mỏng của các môi trường bán đặc LGI, Nfb và BAZ lần lượt cấy chuyển sang các đĩa môi trường LGI, Nfb và BAZ đặc để tách dòng các khuẩn lạc. Sau vài lần cấy chuyển trên các môi trường đặc, chọn các khuẩn lạc rời và đều nằm trên đường cấy quan sát dưới kính hiển vi. Khi thấy vi khuẩn đã rỗng (thuần nhất) thì cấy chuyển sang ống nghiệm chứa môi trường đặc tương ứng để trữ ở 4°C và được xem như là một dòng (chủng [isolate]).

Khi cấy chuyển vi khuẩn trên đĩa môi trường phân lập đặc đồng thời đo kích thước và quan sát hình thái các dạng khuẩn lạc bao gồm các chỉ tiêu: màu sắc, hình dạng, độ nổi và dạng bìa khuẩn lạc bằng mắt thường. Tuy nhiên, đối với những khuẩn lạc có kích thước quá nhỏ thì sử dụng kính lúp để quan sát.

### 2.3 Tách chiết DNA vi khuẩn

Qui trình được thực hiện theo Nguyễn Thị Thu Hà *et al.* (2009).

### 2.4 Kỹ thuật PCR

Để nhận diện vi khuẩn sống nội sinh trong cây, sử dụng các đoạn môi 16S rDNA được thiết kế (Zinniel *et al.*, 2002) với trình tự như đã trình bày theo Nguyễn Thị Thu Hà *et al.* (2009).

#### 2.4.1 Định lượng ammonium (khả năng cố định đạm)

Vi khuẩn được nuôi trong môi trường Burk's không có N đặc (Park *et al.*, 2005) và định lượng ammonium hình thành trong mẫu bằng phương pháp Phenol Nitroprusside sodium hypochloride để xác định hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> được tạo ra bằng phản ứng so màu ở bước sóng 640 nm.

#### 2.4.2 Định lượng IAA

Vi khuẩn được nuôi trong môi trường bổ sung 100 mg/l tryptophan và định lượng bằng thuốc thử Salkowski R2 và phương pháp so màu ở bước sóng 530 nm.

#### 2.4.3 Định lượng lân hòa tan

Vi khuẩn được nuôi trong môi trường NBRIP (Nautiyal, 1999) và định lượng lân hòa tan bằng thuốc thử acid ascorbic - ammoniummolybdate - potassium antinomol tartrate và phương pháp so màu Oniani ở bước sóng 880 nm.

### 2.5 Giải trình tự DNA

Sử dụng đoạn mồi 1 p515FPL trong phản ứng PCR để nhận diện vi khuẩn nội sinh đã mô tả ở phần trên. Sản phẩm PCR được loại bỏ các hóa chất PCR còn lại trong ống nghiệm bằng EDTA và cồn để thu được sản phẩm DNA sạch. Sản phẩm DNA này được sử dụng giải trình tự bằng hệ thống máy giải trình tự động ABI 3130. Sử dụng chương trình BLAST N và BioEdit để so sánh trình tự các đoạn DNA của 3 dòng vi khuẩn với trình tự DNA của bộ gen ở các loài vi khuẩn có trong ngân hàng gen (NCBI).

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Phân lập vi khuẩn nội sinh

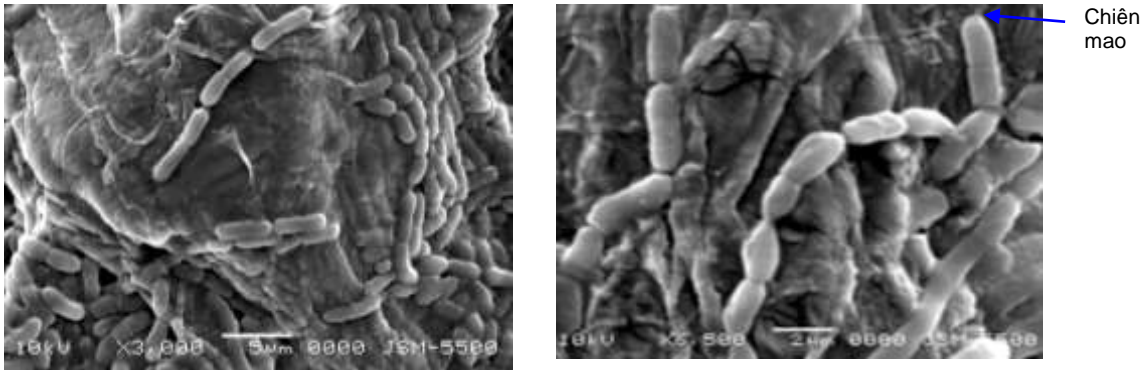
Vi khuẩn nội sinh ở cây khóm rất đa dạng, chúng có thể phân tán lên cả thân, lá, cuống và trái. Qua các giai đoạn phân lập và tách rông vi khuẩn từ các mẫu rễ, thân, lá, cuống và trái của cây khóm trồng ở những vùng đặc trưng của huyện Vĩnh Thuận – tỉnh Kiên Giang trên các môi trường LGI, NFb và BAz bán đặc và đặc đã thu được 103 dòng vi khuẩn khác nhau. Trong đó có 29 dòng được phân lập trên môi trường LGI, 44 dòng được phân lập trên môi trường NFb, 30 dòng được phân lập trên môi trường BAz.

Các dòng vi khuẩn phân lập được đều có chung một đặc tính là sinh trưởng và phát triển ở điều kiện vi hiếu khí trong các môi trường bán đặc, chúng phát triển thành lớp màng mỏng cách mặt môi trường nuôi khoảng 2 – 5 mm. Kết quả này phù hợp với báo cáo của Weber *et al.* (1999), theo nghiên cứu của Perin *et al.* (2006) thì lớp màng mỏng hình thành cách mặt môi trường là 4 mm, kết quả của Santos *et al.* (2001) là khoảng 1 – 4 mm và theo báo cáo của Nguyễn Thị Thu Hà *et al.* (2009) thì lớp màng cách mặt môi trường từ 0,5 – 1 cm. Lớp màng mỏng hình thành trong môi trường bán đặc này có màu hơi trắng hoặc hơi vàng (Perin *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2001).

Trong số 103 dòng vi khuẩn đã phân lập, số dòng vi khuẩn được phân lập từ rễ là nhiều nhất (29 dòng; trong đó có 08 dòng trên môi trường LGI, 13 dòng trên môi trường NFb và 08 dòng trên môi trường BAz) chiếm tỉ lệ 28,16%; số dòng vi khuẩn được phân lập từ thân là 26 dòng (LGI: 08, NFb: 11, BAz: 07) chiếm tỉ lệ 25,24%; số dòng vi khuẩn được phân lập từ lá là 15 dòng (LGI: 05, NFb: 07, BAz: 03) chiếm tỉ lệ 14,56%; số dòng vi khuẩn được phân lập từ cuống là 17 dòng (LGI: 05, NFb: 06, BAz: 06) chiếm tỉ lệ 16,5% và số dòng vi khuẩn được phân lập từ trái là 16 dòng (LGI: 03, NFb: 07, BAz: 06) chiếm tỉ lệ 15,53%. Qua đó cho thấy vi khuẩn nội sinh tập trung chủ yếu ở rễ và thân; ít phân tán đến những phần khác của cây. Kết quả này phù hợp với những nghiên cứu của Rosenblueth và Martinez-Romero (2006), Weber *et al.* (1999), Nguyễn Thị Thu Hà *et al.* (2009).

### 3.2 Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn nội sinh

Các dòng vi khuẩn phân lập được đều có chung một đặc tính là sinh trưởng và phát triển ở điều kiện vi hiếu khí trong các môi trường bán đặc, chúng phát triển thành lớp màng mỏng cách mặt môi trường nuôi khoảng 2 – 5 mm. Kết quả này phù hợp với báo cáo của Weber *et al.* (1999), theo nghiên cứu của Perin *et al.* (2006) thì lớp màng mỏng hình thành cách mặt môi trường là 4 mm, kết quả của Santos *et al.* (2001) là khoảng 1 – 4 mm và theo báo cáo của Nguyễn Thị Thu Hà *et al.* (2009) thì lớp màng cách mặt môi trường từ 0,5 – 1 cm. Lớp màng mỏng hình thành trong môi trường bán đặc này có màu hơi trắng hoặc hơi vàng (Perin *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2001). Tất cả các dòng vi khuẩn phân lập được đều có thể chuyển động được do có chiên mao. Vi khuẩn có dạng que ngắn chiếm phần lớn trong tổng số 103 dòng vi khuẩn phân lập được, có 92/103 dòng vi khuẩn dạng que ngắn chiếm tỉ lệ 89,32%. Vi khuẩn có dạng que dài chiếm số lượng rất ít, 11/103 dòng vi khuẩn dạng que dài chiếm tỉ lệ 10,68%.



Hình 1: Dòng vi khuẩn BK1 (môi trường Baz) ở độ phóng đại 3.000 lần và dòng vi khuẩn NK2 (môi trường NFb) ở độ phóng đại 6500 lần

### 3.3 Nhận diện các dòng vi khuẩn nội sinh bằng 16S rDNA

Khi phân tích PCR với 3 đoạn môi 16S rDNA (p515FPL, p-13B và PCR-1) để nhận diện các dòng vi khuẩn đã phân lập là vi khuẩn nội sinh, 85 dòng cho băng DNA ở vị trí khoảng 900 bp so với thang chuẩn (Hình 2), phù hợp với kết quả nghiên cứu trước đây của Zinniel *et al.* (2002), Nguyễn thị Thu Hà *et al.* (2009), Cao Ngọc Diệp, Nguyễn Ái Chi (2009), là các dòng vi khuẩn nội sinh, những dòng còn lại không có băng hoặc có băng không ở vị trí 900 bp thì không phải là vi khuẩn nội sinh.



Hình 2: Phổ điện di DNA của các dòng vi khuẩn nội sinh M: thang chuẩn 100 bp, 1-15: là các dòng NK19, NK32, BK1, BK7, NK43, BK11, BK24, BK26, NK16, BK28, BK12, BK16, BK13, BK18, BK27.16: đối chứng âm

Trong số dòng vi khuẩn nội sinh đã nhận diện thì số dòng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ các môi trường như sau: có 28 dòng được phân lập trên môi trường LGI (LK1-LK10, LK12-LK27, LK29-LK30), 37 dòng được phân lập trên môi trường NFb (NK1, NK2, NK4, NK6, NK8-NK11, NK13-NK14, NK16-NK17, NK19, NK21-NK33, NK35-NK36, NK38-NK46) và 20 dòng còn lại được phân lập trên môi trường Baz (BK1-BK2, BK4-BK14, BK16-BK17, BK19, BK24-BK25, BK27-BK28). Như vậy số lượng vi khuẩn nội sinh được tìm thấy khi phân lập trên môi trường NFb nhiều hơn so với số lượng vi khuẩn nội sinh được phân lập trên môi trường LGI và BAZ, kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Weber *et al.* (1999).

### 3.4 Một số đặc tính của một số dòng vi khuẩn nội sinh

#### 3.4.1 Khả năng cố định đạm

Khả năng phát triển của vi khuẩn trên môi trường không đạm

Tất cả 38 dòng vi khuẩn được khảo sát đều có khả năng tạo  $\text{NH}_4^+$  cấy trên môi trường Burk đặc (agar) không đạm ở 30°C với kết quả thống kê của các dòng vi khuẩn được phân lập từ 3 môi trường LGI, NFb và BAZ cụ thể như sau: 15/28 dòng vi khuẩn LK trên môi trường LGI, 12/37 dòng vi khuẩn NK trên môi trường NFb và 11/20 dòng vi khuẩn BK trên môi trường Baz trong đó dòng LK3 tạo ra nhiều ammonium nhất trong 15 dòng vi khuẩn LK với 4,77 mg/l. Ba dòng LK1, LK4 và LK14 cũng tạo ra nhiều ammonium với số lượng là 3,67; 3,44 và 3,20 mg/l trái lại các dòng vi khuẩn NK và BK tổng hợp ít ammonium (<1 mg/l).

#### 3.4.2 Khả năng hòa tan lân khó tan

Tất cả 38 dòng vi khuẩn được khảo sát đều có khả năng hòa tan lân khó tan trong môi trường NBRIP với dòng vi khuẩn NK2 hòa tan được nhiều lân hòa tan nhất (80,26 mg  $\text{P}_2\text{O}_5$ /l) trong khi đó các dòng vi khuẩn LK và BK hòa tan lân ít (<50 mg  $\text{P}_2\text{O}_5$ /l).

#### 3.4.3 Khả năng tổng hợp indol-3-acetic acid (IAA)

Ba mươi tám dòng vi khuẩn nội sinh, nuôi trong các môi trường lỏng LGI (15 dòng), NFb (12 dòng) và BAZ (11 dòng) (tương ứng với các môi trường phân lập của chúng) có bổ sung 100 mg tryptophan/l đều có khả năng tổng hợp IAA. Trong đó các dòng vi khuẩn NK17 được nuôi trong môi trường NFb có khả năng tổng hợp IAA cao nhất (5,49 mg/l) trong khi đó các dòng vi khuẩn LK và BK tổng hợp IAA thấp hơn. Trong Bảng 1 cho thấy trong từng loại môi trường phân lập có một vài dòng vi khuẩn nổi bật với 3 đặc tính tốt trong đó dòng LK4 (môi trường LGI), dòng NK2 (môi trường Nfb) và dòng BK1 (môi trường Baz) được chọn để giải trình tự đoạn DNA (900 bp) với môi 1.

### 3.5 Nhận diện các dòng vi khuẩn LK4, NK2 và BK1 có các đặc tính tốt bằng phương pháp giải trình tự DNA 16S rDNA

Đoạn 16S rDNA của dòng LK4 (549 bp) tương đồng 99,2% với trình tự 16S-rDNA của loài *Burkholderia tropica*; tỉ lệ đồng hình đoạn gen 16S-rDNA của dòng NK2 (623 bp) với loài *Enterobacter hormaechei* là 99,6% và dòng BK1 (735 bp) có tỉ lệ đồng hình của đoạn gen 16S-rDNA với loài *Burkholderia tropica* là

99,4% (Hình 3). Tuy nhiên, khi so sánh trình tự của 3 dòng này cho thấy dòng LK4 và dòng BK1 có 3 vị trí không tương đồng với dòng vi khuẩn *B. tropica* NR\_028965 chuẩn, còn dòng NK2 hầu như các vị trí tương đồng với dòng vi khuẩn *E. hormaechei* GQ9006 chuẩn.

#### 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

- Phân lập được 103 dòng vi khuẩn từ các mẫu rễ, thân, lá, cuống và trái của cây khóm, trong đó 85 dòng là vi khuẩn nội sinh (28 dòng được phân lập trên môi trường LGI, 37 dòng được phân lập trên môi trường NFb và những dòng còn lại được phân lập trên môi trường BAz) đã được nhận diện bằng kỹ thuật PCR, cho sản phẩm DNA có kích thước ở vị trí 900 bp so với thang chuẩn 100 bp.

**Bảng 1: Khả năng tổng hợp NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, hòa tan lân khó tan và tổng hợp IAA của những dòng vi khuẩn nội sinh**

Dòng vi khuẩn	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	Lân được hòa tan (mg/l)	IAA (mg/l)	Dòng vi khuẩn	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	Lân được hòa tan (mg/l)	IAA (mg/l)	Dòng vi khuẩn	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	Lân được hòa tan (mg/l)	IAA (mg/l)
LK1	3,67m	24,31n	1,86h	NK1	0,68g	39,28l	2,29i	<b>BK1</b>	<b>0,40j</b>	<b>25,45h</b>	<b>1,36d</b>
LK2	1,35i	41,94j	2,08g	<b>NK2</b>	<b>0,77f</b>	<b>80,26h</b>	<b>4,30e</b>	BK2	0,67e	27,22d	3,17e
LK3	4,77g	20,03g	1,62e	NK6	0,59a	30,70b	4,05b	BK4	0,66d	27,39d	1,33d
<b>LK4</b>	<b>3,44f</b>	<b>50,54f</b>	<b>2,43d</b>	NK8	0,59a	19,40a	3,17a	BK5	0,16c	33,76c	1,04c
LK5	2,73e	49,95e	2,01ai	NK13	0,41i	43,72k	2,60h	BK6	0,48b	18,51b	1,79b
LK6	1,18d	25,32d	1,56c	NK14	1,81h	24,88j	3,43g	BK7	0,10a	24,43a	0,75a
LK7	1,96c	18,34c	1,96ai	NK17	0,69g	10,61i	5,49f	BK10	1,09i	16,32i	1,09f
LK8	0,66b	36,83b	1,39b	NK21	0,53b	27,74g	3,89d	BK11	0,83h	25,08h	3,01i
LK9	0,47a	26,64a	1,94a	NK22	0,43e	5,65f	3,18ac	BK12	0,50g	19,97g	2,49h
LK12	0,99k	24,96d	2,16j	NK24	1,01d	12,81e	3,24c	BK13	0,65d	17,91f	2,77g
LK14	3,20l	46,79m	2,01i	NK27	0,57c	21,02d	3,23ac	BK16	0,25f	39,45e	1,11f
LK16	0,97k	22,43l	1,83h	NK28	0,53b	41,85c	3,14a				
LK17	1,27j	36,12k	1,67e								
LK23	1,46h	30,83i	1,51c								
LK27	0,46a	37,56h	2,28f								

Những số theo sau cùng một chữ không khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức độ 5%

- Trong tổng số 85 dòng vi khuẩn được khảo sát, có 38 dòng đều hội tụ đủ 3 đặc tính tốt (cố định đạm sinh học, hòa tan lân khó tan và tổng hợp kích thích tố IAA). Các dòng có các đặc tính tốt nhất được phân lập trên 3 môi trường này là LK4, NK2 và BK1. Như vậy 38 dòng vi khuẩn này thuộc nhóm vi khuẩn nội sinh kích thích sự sinh trưởng thực vật.

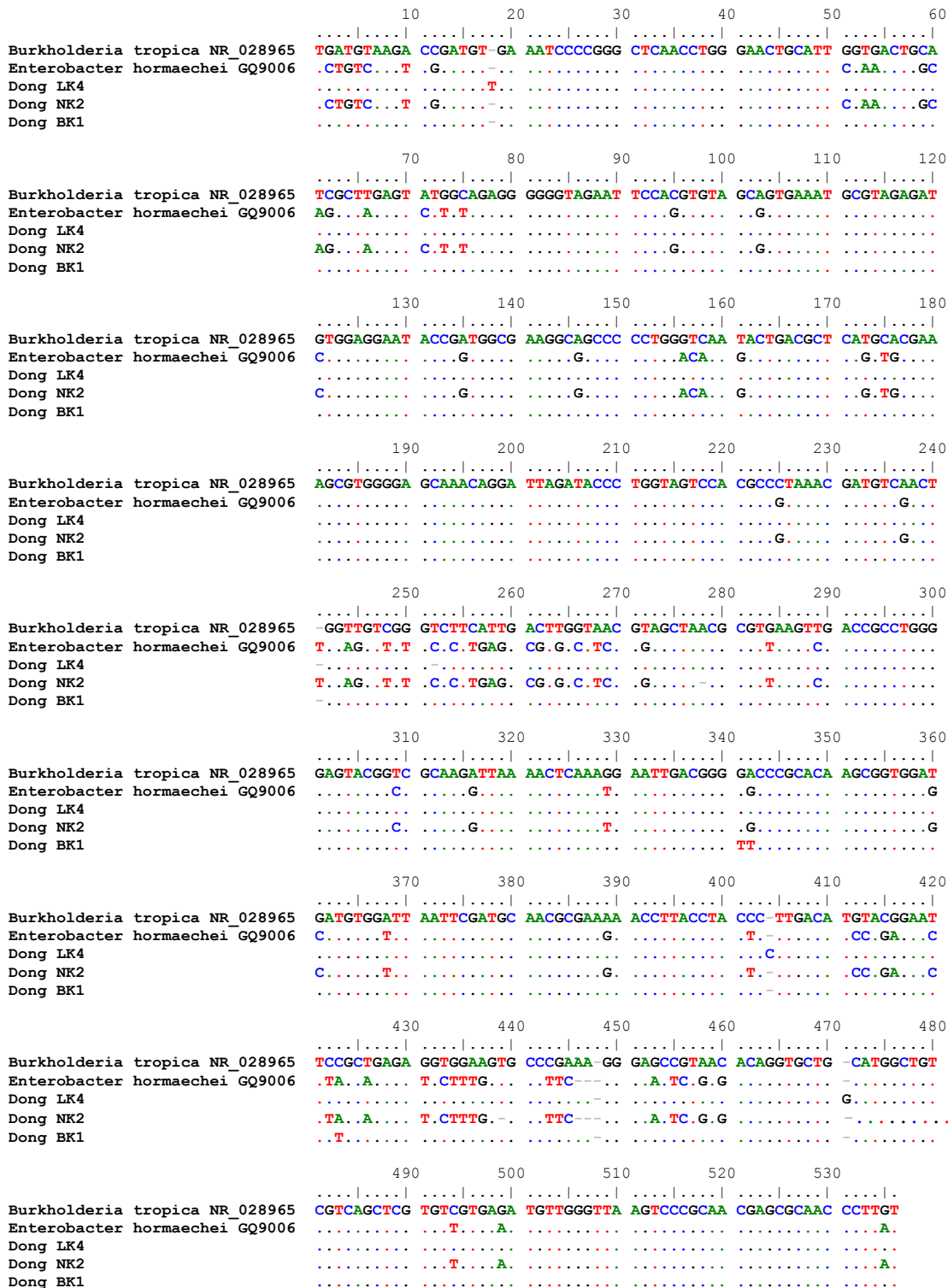
- Xác định được 3 dòng vi khuẩn nội sinh, kích thích sự sinh trưởng ở thực vật được phân lập trên cả 3 môi trường có trình tự đoạn gen 16S-rDNA lần lượt tương đồng như sau: dòng LK4 được phân lập trên môi trường LGI có trình tự gen 16S-rDNA tương đồng 99,2% với loài *Burkholderia tropica* NR\_028965; dòng NK2 được phân lập trên môi trường NFb có tỉ lệ đồng hình với đoạn gen 16S-rDNA của loài *Enterobacter hormaechei* GQ 9006 là 99,6% và dòng BK1 được phân lập trên môi trường BAZ có tỉ lệ đồng hình với trình tự gen 16S-rDNA của loài *Burkholderia tropica* NR\_028965 là 99,4%.

- Đề nghị tiến hành đánh giá ngoài đồng những dòng vi khuẩn nội sinh đã định danh nhiều lần ở những vùng đất khác nhau trước khi ứng dụng vào việc sản xuất phân sinh học để bón ngược lại cho khóm ở những vùng đất nghèo chất dinh dưỡng.

- Nghiên cứu và sử dụng nguồn vi khuẩn nội sinh tốt làm phân sinh học để ứng dụng bón cho những đối tượng khác có giá trị về mặt kinh tế như: lúa, cây ăn trái,...

- Khảo sát những đặc điểm tốt (cố định đạm sinh học, hòa tan lân khó tan và tổng hợp IAA) của những dòng còn lại và giải trình tự đoạn 16S-rDNA của một số dòng vi khuẩn này để định danh và tìm hiểu sự phong phú, đa dạng của chúng, nhằm mục đích hướng tới nghiên cứu sự đa dạng sinh học (biodiversity) của nhóm vi khuẩn nội sinh ở vùng ĐBSCL.





**Hình 3: So sánh đoạn DNA 16S rDNA của dòng LK4, NK2 và BK1 với dòng chuẩn *Burkholderia tropica* NR\_028965 và *Enterobacter hormaechei* GQ9006**

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đường Hồng Dật. 2003. *Cây Dứa & Kỹ Thuật Trồng*, Nhà xuất bản Lao Động – Xã Hội, Hà Nội, tr.3-29.
- Bandara, W. M. M. S., Gamini Seneviratne and S A Kulasoorya. 2006. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. *J. Biosci* 31, pp.645-650.
- Barbieri Paola, Tiziano Zanelli, Enrica Galli and Giuliana Zanetti. 1986. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. *FEMS Microbiology Letters* 36, pp.87-90.
- Cao Ngọc Điệp, Phạm Thị Khánh Vân và Lăng Ngọc Đậu. 2007. Phát hiện vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* nội sinh trong cây lúa mùa đặc sản (*Oryza sativa* L.) trồng ở vùng Đồng Bằng Sông Cửu Long. *Những vấn đề cơ bản trong khoa học sự sống*, tr.456-459.
- Cavalcante, Vladimir A. and J. Döbereiner. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil* 108, pp.23-31.
- Elmerich, C. 2007. Historical perspective: From Bacterization to endophytes. In *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, ed. C. Elmerich and W. E. Newton, The Netherland: Springer, pp. 1-20.
- Fashey, J. W., M. B. Dimock, S. F. Tomasino et al. 1991. Genetically engeneered endophytes as biocontrol agents: a case study from industry. *Microbial Ecology of Leaves*, pp.401-411.
- Krieg N. R., Döbereiner J. 1984. Genus *Azospirillum*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology 1*, ed. Murray et al., pp.94 – 103.
- Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170, 265-270.
- Nguyễn Thị Thu Hà, Hà Thanh Toàn và Cao Ngọc Điệp. 2009. Phân lập và đặc tính của những dòng vi khuẩn nội sinh trong một số cây cỏ chăn nuôi. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 7(2), 241-250.
- Perin, L., L. Martinez-Aguilar, R. Castro-Gonzalez, P. Estrada-de los Santos, T. Cabellos-Avelar, H. V. Guedes, V. M. Reis and J. Caballero-Mellado. 2006. Diazotrophic *Burkholderia* Species Associated with Field-Grown Maize and Sugarcane. *Applied and environmental microbiology* 72, 5, pp.3103-3110.
- Rosenblueth Mónica and Esperanza Martínez-Romero. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, pp.827-837.
- Santos, Paulina Estrada-De Los, Doci'o Bustillos-Cristales and Jesús Caballero-Mellado. 2001. *Burkholderia*, a genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution. *Applied and Environmental Microbiology* 67, pp.2790–2798.
- Trần Thế Tục và Vũ Mạnh Hải. 2000. *Kỹ Thuật Trồng Dứa*, Nhà xuất bản Nông Nghiệp, Hà Nội, tr.3-47.
- Weber, O.B, Baldani V.L.D, Teixeira K.R.S, Kirchof G., Baldani J.I. and Dobereiner J. 1999. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant and Soil* 210, 03-113.
- Xu H., Griffith M., Patten C.L. and Glick B.R.1998. Isolation and characterization of an antifreeze protein with ice nucleation activity from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2, *J. Appl. Microbiol.* 44, pp.64-73.
- Zinniel K.D., Lambrecht P., Haris N.B., Feng Z., Kuczarski D., Higley P., Ishimaru C., Arunakumari A., Barletta G.R. and Vidaver A.K. (2002), Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants, *Appl. Environ. Microbiol.* 59, pp.2198-2208.