

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG VI KHUẨN NỘI SINH PHÂN LẬP TỪ CÁC VÙNG SINH THÁI KHÁC NHAU

Nguyễn Hải Vân, Nguyễn Thị Minh*

Khoa Môi trường, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email : NguyenMinh@vnua.edu.vn*

Ngày gửi bài: 03.05.2017

Ngày chấp nhận: 14.06.2017

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tuyển chọn và sử dụng các chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng kích thích sinh trưởng thực vật từ nhiều vùng sinh thái khác nhau để sản xuất chế phẩm dinh dưỡng vi sinh đa chức năng bón cho cây trồng. Các chủng vi khuẩn nội sinh được tuyển chọn thông qua khả năng sinh IAA, phân giải lân, đối kháng với vi sinh vật gây bệnh và sinh các enzyme thủy phân cao. Kết quả tuyển chọn được 6 chủng vi khuẩn ký hiệu 3TDG1, 3TDG4, 3TDG5, 3LC2, 3LDQ2 và 3CL2 có hoạt tính sinh học tốt nhất từ 32 chủng vi khuẩn nội sinh để bổ sung vào dịch dinh dưỡng sau xử lý phế thải chăn nuôi làm chế phẩm dinh dưỡng vi sinh đa chức năng. Các chủng này lần lượt có mức độ tương đồng 99% với *Klebsiella pneumoniae* strain PSB1, *Klebsiella oxytoca* strain ALK033, *Aeromonas caviae* strain J5; *Pseudomonas putida* strain E1-4, *Pantoea rodasii* strain Y36 và chủng *Bacillus subtilis* strain QB5413. Thử nghiệm sử dụng chế phẩm dinh dưỡng vi sinh đa chức năng đã làm tăng năng suất rau mùng tơi 89,51% so với công thức chỉ dùng phân NPK.

Từ khóa: IAA, kháng bệnh, phân giải lân, vi khuẩn nội sinh, các vùng sinh thái

Research on Using Endophytic Bacteria Isolated from Different Ecosystems

ABSTRACT

The aim of this study was to select and use the endophytic microorganism strains from different ecosystems for the production of multifunctional biofertilizer formulation for crop plants. The endophytic microorganisms were selected for their IAA and hydrolytic enzyme production, phosphorus solubilization, and antagonism to pathogenic microorganisms. Six endophytic bacterial strains, 3TDG1, 3TDG4, 3TDG5, 3LC2, 3LDQ2 and 3CL2, with high bioactivity were selected from 32 endophytic bacteria strains. These strains were used for adding into the nutrient liquid obtained from treatment of livestock waste for the production of multifunctional biofertilizer formulation. These strains were 99% homologous with *Klebsiella pneumoniae* strain PSB1, *Klebsiella oxytoca* strain ALK033, *Aeromonas caviae* strain J5; *Pseudomonas putida* strain E1-4, *Pantoea rodasii* strain Y36 and *Bacillus subtilis* strain QB5413, respectively. The yield of *Basella alba* L. in tetsting experiment fertilized with multifunctional formulation increased by 89.51% as compared with the use of NPK fertilizer.

Keywords: Endophytic bacteria, IAA, phosphorous solubilization, different ecosystems.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tác động của tiến trình đô thị hóa cùng với dân số hơn 90 triệu người hiện nay đã đặt ra áp lực lớn với ngành nông nghiệp Việt Nam trong việc tăng năng suất và sản lượng cây trồng. Thực tế hiện nay là việc sản xuất, canh tác của nông dân Việt Nam còn lạm dụng nhiều các loại

phân bón và thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) hoá học. Hệ quả là dẫn đến chi phí cao, gây ô nhiễm môi trường và để lại dư lượng hóa chất độc hại trong nông sản, ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng.

Các chế phẩm sinh học như phân vi sinh đã được chứng minh có thể thay thế hoặc làm giảm sử dụng phân hóa học và thuốc BVTV trong sản

xuất nông nghiệp. Phân vi sinh góp phần quan trọng trong việc nâng cao chất lượng nông sản, thân thiện với môi trường và giảm chi phí sản xuất, tạo nền tảng cho nông nghiệp phát triển bền vững (Phạm Văn Toàn và cs., 1998). Một trong những nhóm vi sinh vật có ích cho cây trồng đang được quan tâm hiện nay là nhóm vi khuẩn nội sinh. Các vi khuẩn nội sinh thuộc các chi *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter* và *Pseudomonas* thường được tìm thấy ở các cây trồng nông nghiệp (Reinhold-Hurek and Hurek, 2011). Trên thế giới, các chế phẩm phát triển từ vi khuẩn nội sinh đã được đưa vào ứng dụng như chế phẩm PIX PLUS của Anh, dịch phân bón dinh dưỡng Sumagrow của Mỹ. Ở Việt Nam, những nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh trên một số cây trồng đã được tiến hành nhưng vẫn chưa được đánh giá đầy đủ và chưa đưa vào ứng dụng được trong thực tiễn sản xuất (Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Ái Chi, 2009; Lương Thị Hồng Hiệp và Cao Ngọc Diệp, 2011).

Từ thực tế trên, việc nghiên cứu tuyển chọn và sử dụng vi khuẩn nội sinh có hoạt tính sinh học cao để sản xuất chế phẩm dinh dưỡng vi sinh đa chức năng bón cho cây trồng là rất cần thiết.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

32 chủng vi khuẩn nội sinh đã được phân lập từ các cây trồng trên 4 vùng sinh thái khác nhau thuộc đề tài trọng điểm của Học viện Nông nghiệp Việt Nam, mã số T2015 - 04 - 05TD, phân bón NPK (ure, super lân, KCl) và chế phẩm dinh dưỡng từ xử lý phế thải chăn nuôi lợn dạng lỏng bằng hệ thống thiết bị UASB.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Môi trường nuôi cấy

Các môi trường được sử dụng trong nghiên cứu gồm môi trường muối khoáng cơ bản như môi trường LB, NA, LGI, YMA. Môi trường sau khi pha được đem khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 20 phút.

2.2.2. Xác định hoạt tính cellulase, amylase và protease

Hoạt tính các enzyme cellulase, amylase và protease được xác định dựa trên khả năng tạo vòng phân giải được nhuộm màu bằng dung dịch lugol trên đĩa thạch chứa các cơ chất tương ứng là CMC, tinh bột và casein với nồng độ 0,2% (William, 1983).

2.2.3. Xác định khả năng phân giải lân

Hoạt tính phân giải lân được xác định dựa trên sự hình thành vòng sáng trong xung quanh khuẩn lạc của các chủng cấy chấm điểm trên môi trường Pikovaskya (Puente *et al.*, 2004).

2.2.4. Xác định hàm lượng IAA

Vi khuẩn được nuôi trong môi trường NA bổ sung 100 mg/l tryptophan và định lượng IAA bằng thuốc thử Salkowski (Gordon and Weber, 1951). Hỗn hợp phản ứng gồm 1 ml dịch sau ly tâm cho vào 2 ml thuốc thử Salkowski. Phản ứng được lắc đều, ủ tối trong 20 phút và đo trên máy đo quang phổ ở bước sóng 530 nm. Giá trị OD của mẫu được đối chiếu với đồ thị chuẩn để tính hàm lượng IAA trong dịch nuôi cấy theo đơn vị µm IAA/ml.

2.2.5. Xác định hoạt tính đối kháng của các chủng vi sinh vật

Sử dụng phương pháp khuếch tán đĩa thạch của Dhanasekaran *et al.* (2012) để kiểm định các vi sinh vật gồm *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* và hai chủng vi sinh vật gây bệnh thực vật là *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh và *Fusarium oxysporum* gây bệnh héo vàng.

2.2.6. Phân loại chủng vi sinh vật

DNA tổng số từ vi khuẩn được tách chiết theo mô tả của Sambrook và Russell (2001). Trình tự gene mã hóa 16S rRNA của các dòng vi khuẩn được xác định bằng máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer và Sequence Analysis và so sánh với ngân hàng dữ liệu của NCBI (National Center for Biotechnology Information).

2.2.7. Xác định điều kiện nhân giống thích hợp các chủng VSV nội sinh tuyển chọn

- Ảnh hưởng của pH: Nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng và hàm lượng IAA sinh ra của vi khuẩn nội sinh được nghiên cứu trên môi trường nuôi cấy LB được điều chỉnh ở các pH 5, 6, 7, 8 bằng dung dịch đệm photphas, lắc 150 vòng/phút ở 30°C, sau 48.

- Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng và hàm lượng IAA của các chủng vi khuẩn được nghiên cứu trên môi trường LB, lắc 150 vòng/phút ở pH 7, sau 48 giờ ở các nhiệt độ 25, 30, 35 và 40°C.

- Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sinh trưởng và hàm lượng IAA của các chủng vi khuẩn được nghiên cứu trên môi trường LB ở 30°C, pH 7 trong 48 giờ ở các tốc độ lắc 100 vòng/phút, 150 vòng/phút và 200 vòng/phút.

- Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng và sinh IAA của các chủng được nghiên cứu trên môi trường LB lắc 150 vòng/phút ở 30°C, pH 7 và xác định sau các khoảng thời gian 24, 48 và 72 giờ.

2.2.8. Sản xuất chế phẩm dinh dưỡng vi sinh

Các chủng vi khuẩn nội sinh đã tuyển chọn được nhân giống riêng rẽ. Sau đó các chủng này được phối trộn hỗn hợp với dịch dinh dưỡng từ phế thải chăn nuôi lợn sau khi xử lý trong thiết bị UASB với tỉ lệ 1:5. Chế phẩm dinh dưỡng vi sinh được kiểm tra chất lượng theo thông tư 41/2014/TT-BNNPTNT theo các phương pháp thông dụng hiện hành của Viện Thổ nhưỡng Nông hóa.

2.2.9. Thử nghiệm đánh giá hiệu quả của chế phẩm dinh dưỡng vi sinh đa chức năng trên cây mùng tơi

Thí nghiệm được bố trí theo phương pháp của Vincent gồm 3 công thức với 5 lần nhắc lại. Mỗi chậu có kích thước 25 x 30 x 15 cm, chứa 2 kg đất/ chậu. Hạt giống mùng tơi sau khi ngâm, ủ được gieo vào chậu với khoảng cách 10 x 10 cm (6 hạt/chậu). Các chậu được chăm sóc và tưới nước như nhau với tỉ lệ phân bón như

sau: Công thức 1: Cây trồng trên chậu được bón phân khoáng theo nền thâm canh với lượng 3 g NPK/chậu. Công thức 2: Sử dụng 10 ml chế phẩm dinh dưỡng (không bổ sung vi sinh vật nội sinh) pha với nước cất thành 1000 ml, bón 40 ml/chậu/lần/tuần. Công thức 3: Sử dụng 10 ml chế phẩm dinh dưỡng vi sinh pha với nước cất thành 1000 ml, bón 40 ml/chậu/lần/tuần. Sau 30 ngày theo dõi chiều cao cây, số lá, diện tích lá (cm²), năng suất (g/chậu). Số liệu được xử lý theo chương trình Excel và IRRISTAT. Thêm vào đó, phép thử TukeyHSD và Holm với khoảng tin cậy 95% cũng được sử dụng để phân tích sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê của số liệu thu được từ các cặp thí nghiệm đôi một với nhau. Tính chất của đất trước và sau thí nghiệm cũng được đánh giá theo tiêu chuẩn Việt Nam.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm sinh học của các chủng VSV nội sinh phân lập được từ các vùng sinh thái khác nhau

3.1.1. Khả năng sinh cellulase, amylase và protease

Kết quả cho thấy 26 chủng được kiểm tra sinh cellulase, 20 chủng sinh amylase và 24 chủng sinh protease với các vòng phân giải khác nhau, đường kính từ 2 - 30 mm. Trong số các chủng phát hiện thấy có sinh enzyme thủy phân, 19 chủng sinh cả 3 loại enzyme được kiểm tra gồm 3 chủng từ cây trồng trên đất phù sa, 3 chủng từ cây trồng trên đất mặn, 6 chủng từ cây trồng trên đất bạc màu và 7 chủng từ cây trồng trên đất phèn. Các chủng 3CL2, 3RCR, 3TDG1, 3TN, 3TCX3 có vòng phân giải 3 cơ chất (CMC, tinh bột, casein) rất lớn và rõ, đường kính dao động từ 14 - 30 mm.

Kết quả này cũng tương đồng với công bố của Amaresan *et al.* (2014) và Mukasheva *et al.* (2016). Thậm chí, vòng phân giải cơ chất của các chủng trong nghiên cứu này còn cao hơn nhiều so với nghiên cứu của El-Deeb *et al.* (2012) cho biết đường kính vòng phân giải của các chủng vi khuẩn nội sinh chỉ đạt từ 2 - 6 mm.

Bảng 1. Khả năng sinh enzyme của các chủng vi khuẩn nội sinh

STT	Chủng	Đường kính vòng phân giải (mm)			STT	Chủng	Đường kính vòng phân giải (mm)		
		CMC	Tinh bột	Casein			CMC	Tinh bột	Casein
1	6RLR1	6	-	-	17	5TK	16	8	18
2	8RLT	-	-	-	18	YDT2	-	-	-
3	2RLT	-	3	3	19	3TN	13	-	12
4	3RLT1	4	-	4	20	3TL1	22	16	22
5	8CR	-	-	-	21	3TCN	24	18	30
6	3CL2	22	20	26	22	6LCX2	20	4	14
7	3RXL	20	16	22	23	6RCB1	14	4	22
8	3RCR	22	18	28	24	3TCB1	16	10	20
9	3TDG1	24	14	24	25	3RXC3	16	4	24
10	3TDG4	2	-	-	26	3RC2	20	3	18
11	3TDG5	10	-	8	27	3TKT2	22	6	26
12	3LSH1	16	2	20	28	3TC2	20	12	24
13	6TSH3	18	15	24	29	3LC2	8	2	10
14	6LXL3	4	-	-	30	3TXC3	28	18	28

Ghi chú: (-): Không thể hiện hoạt tính enzyme, CMC (Carboxymethyl Cellulose)

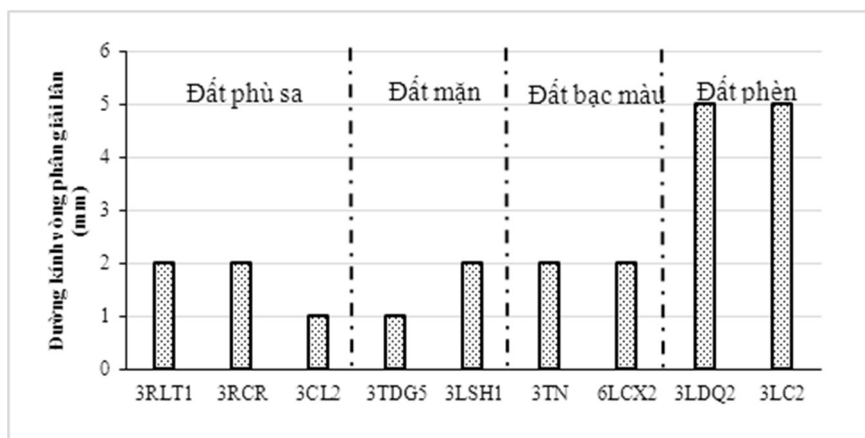
3.1.2. Khả năng phân giải lân

Trong nghiên cứu này, 9 chủng có tạo vòng phân giải lân trên đĩa môi trường với đường kính phân giải từ 1 - 5 mm. Hai chủng 3LDQ2 và 3LC2 từ cây đậu que và cỏ gừng ở đất phèn có vòng phân giải trong, lớn và rất rõ. Các chủng còn lại từ cây trồng trên vùng đất phù sa, đất mặn và đất bạc màu có khả năng phân giải lân thấp hơn, đường kính vòng phân giải chỉ đạt 1 - 2 mm. Khả năng phân giải lân của các chủng

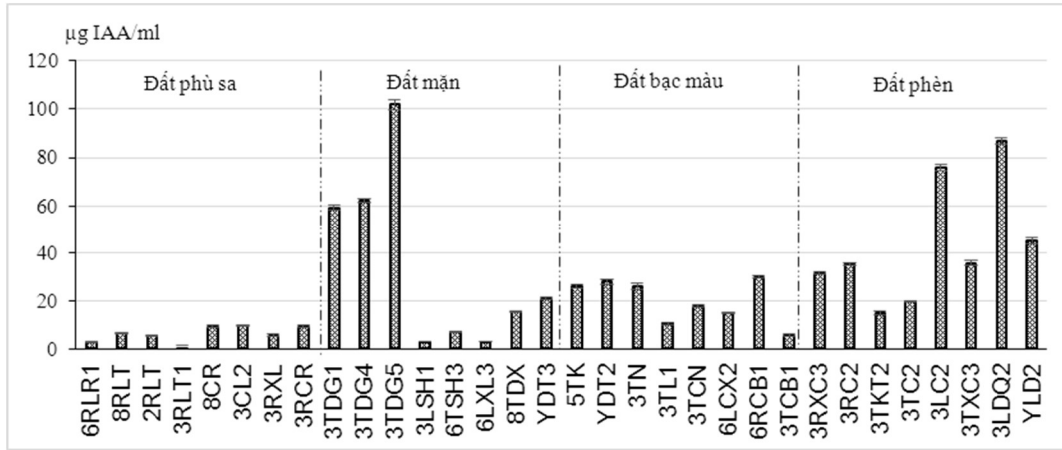
trong nghiên cứu này khá tương đồng với nghiên cứu của Ozaktan *et al.* (2013) cho biết có 29% các chủng nội sinh từ cây dưa chuột sinh vòng phân giải lân với đường kính 1 - 9 mm.

3.1.3. Khả năng sinh tổng hợp IAA

Ba mươi hai chủng khảo sát trong nghiên cứu này đều có khả năng sinh IAA khi có bổ sung Tryptophan với nồng độ 0,1%, lượng IAA của các chủng dao động trong khoảng 2,8 - 101,9



Hình 1. Khả năng phân giải lân của vi khuẩn nội sinh



Hình 2. Hàm lượng IAA của các chủng vi khuẩn nội sinh

µg/ml. 5 chủng sinh IAA cao nhất gồm 3 chủng từ cây dền gai ở đất mặn (3TDG1, 3TDG4, 3TDG5), 2 chủng 3LDQ2 từ cây đậu que và 3LC2 từ cây cỏ gừng trên đất phèn với hàm lượng IAA trên 50 µg/ml. Riêng chủng 3TDG5 sinh IAA cao nhất với 101,9 µg/ml.

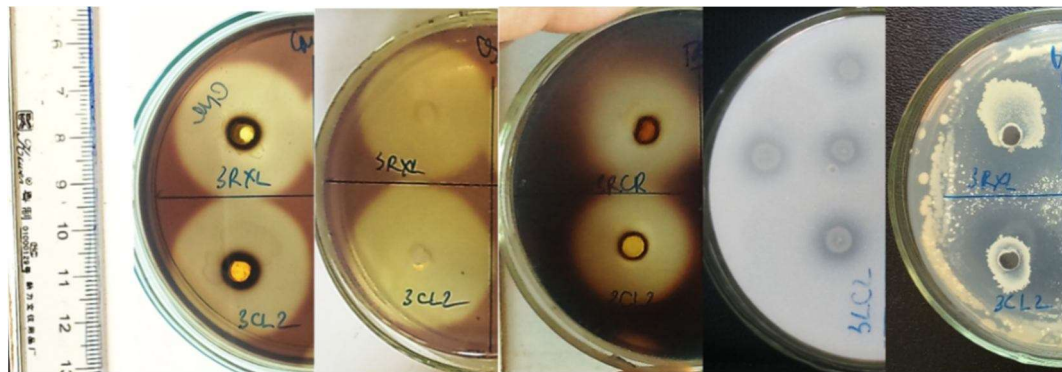
Hàm lượng IAA tương đương cũng được ghi lại trong nghiên cứu của Ozaktan *et al.* (2013) đạt 20 - 125 µg/ml. Lượng IAA đạt 12,7 - 67,5 µg/ml được phát hiện thấy ở các chủng nội sinh trong nghiên cứu của Amaresan *et al.* (2014).

3.1.4. Khả năng đối kháng với vi sinh vật gây bệnh

Kết quả nghiên cứu đối kháng với vi sinh vật gây bệnh thực vật cho thấy, chỉ có 2 chủng 3RXL và 3CL2 đối kháng với vi khuẩn gây bệnh héo xanh *Ralstonia solanacearum*, đường kính vòng kháng khuẩn là 5 mm. Không có chủng vi

khuẩn nội sinh nào trong nghiên cứu này đối kháng với nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh héo vàng. Theo Theunis (2005) và Amaresan *et al.* (2012), sự đa dạng của các vi khuẩn nội sinh đối kháng lại *R. solanacearum* thuộc nhiều chi khác nhau như: *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas* và *Corynebacterium*.

Đối với các vi sinh vật kiểm định, chủng 3CL2, 3RXL, 3TC2 và 3LC2 đối kháng với vi khuẩn *B. anthracis* với đường kính vòng kháng lần lượt là 12, 10, 6 và 4 mm. Hai chủng 3CL2 và 3LC2 còn kháng cả *E. coli* và *Salmonella*, đường kính vòng ức chế là 2 - 6 mm. Nhiều cơ chế đã được đưa ra để lý giải sự ức chế các tác nhân gây bệnh. Theo Amaresan (2012), các cơ chế này dựa trên tác động bảo vệ ở vùng rễ chống lại các vi khuẩn gây bệnh thực vật thông qua sinh tổng hợp các chất chuyển hóa như biosurfactants - chất hoạt động bề mặt sinh học



Hình 3. Hình ảnh kiểm tra đặc tính một số chủng đại diện

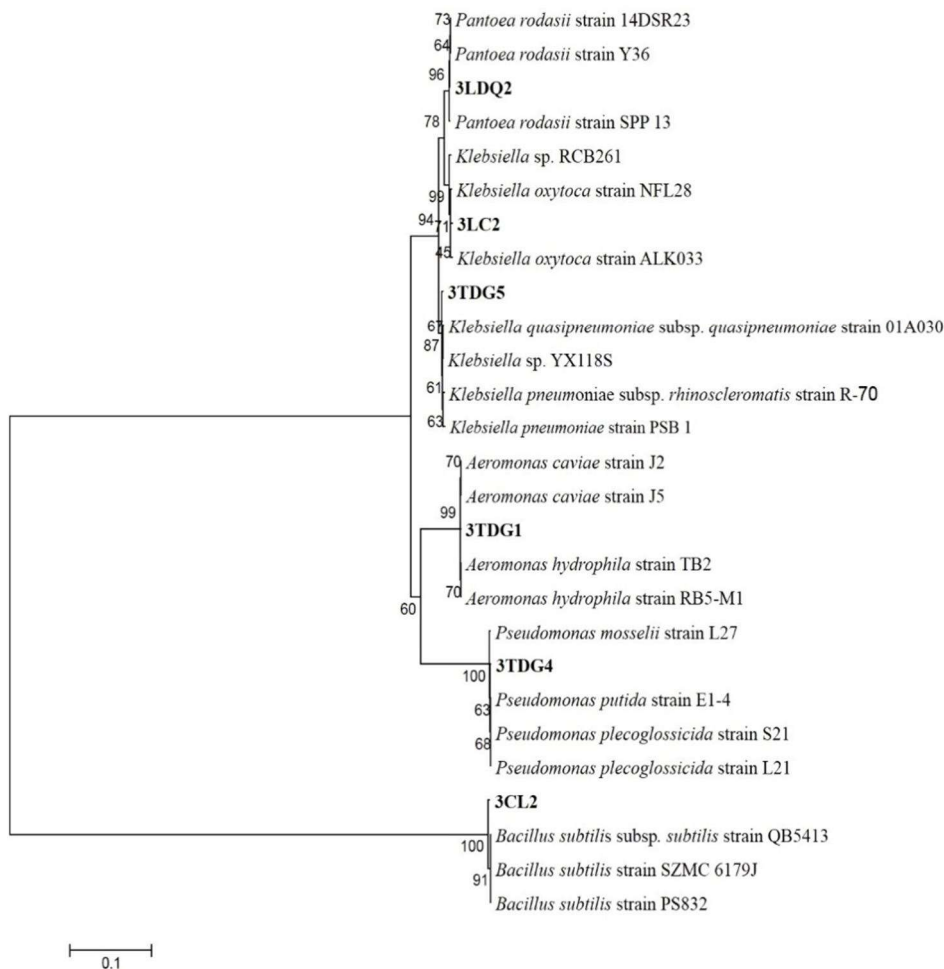
(hydrogen cyanide), các enzyme phân cắt như β -1,3 glucanase và protease, hormone thực vật và các chất kích thích sinh trưởng thực vật như auxins, IAA và siderophores. Trong nghiên cứu này, 4 chủng tạo vòng ức chế với các vi sinh vật gây bệnh là 3CL2, 3RXL, 3TC2 và 3LC2 sinh cả 3 loại enzyme (cellulase, protease và amylase), đồng thời có khả năng sinh IAA (9,8 - 77,8 $\mu\text{g/ml}$). Sinh tổng hợp các chất trao đổi chất thứ cấp có thể có tác động đến hoạt tính đối kháng bởi chức năng như là một tín hiệu trung gian giữa vi khuẩn nội sinh và cây chủ (Graner *et al.*, 2003).

3.2. Phân loại vi khuẩn nội sinh tuyển chọn

Dựa trên kết quả đánh giá đặc tính của các chủng vi sinh vật nội sinh, 6 chủng có hoạt tính sinh học cao nhất với khả năng sinh IAA, phân giải lân và sinh các enzyme thủy phân cao và có

khả năng kháng bệnh được chọn để sản xuất chế phẩm dinh dưỡng vi sinh đa chức năng bao gồm: 3TDG5, 3LC2, 3TDG1, 3TDG4, 3LDQ2 và QB5413. Kết quả kiểm tra theo phương pháp cấy vạch cho thấy các chủng này không đối kháng nhau nên có thể phối trộn trên cùng một môi trường.

So sánh trình tự 16S rRNA của các chủng với trình tự tham chiếu trên cơ sở dữ liệu Genbank cho thấy 6 chủng tuyển chọn thuộc 5 chi khác nhau là *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* và *Pantoea*. Trong đó, hai chủng 3TDG5 và 3LC2 đều thuộc chi *Klebsiella*: 3TDG5 có mức độ tương đồng 99% với *Klebsiella pneumoniae* strain PSB1 trong khi 3LC2 có mức độ tương đồng 99% với *Klebsiella oxytoca* strain ALK033. 3TDG1 tương đồng 99% với *Aeromonas caviae* strain J5.



Hình 4. Cây phát sinh chủng loại của các chủng VSV tuyển chọn

3TDG4 có mức độ tương đồng 99% với *Pseudomonas putida* strain E1-4. 3LDQ2 có mức độ tương đồng 99% với *Pantoea rodasii* strain Y36. Chủng 3CL2 tương đồng 99% với chủng *Bacillus subtilis* strain QB5413. Cây phát sinh chủng loại thể hiện mối quan hệ di truyền giữa các chủng được thể hiện ở hình 4.

3.3. Xác định điều kiện nhân giống tối ưu cho các chủng VSV nội sinh được tuyển chọn

3.3.1. Ảnh hưởng của pH môi trường

Kết quả ảnh hưởng của pH môi trường đến các chủng vi khuẩn được thể hiện ở bảng 2. Số lượng tế bào của các chủng tương đối thấp ở pH5 chỉ đạt 2×10^6 - 5×10^7 CFU/ml. Ở pH trong khoảng giá trị 6 - 7, số lượng tế bào các chủng tăng dần và đạt cao nhất ở pH = 7 (đạt $2,9 \times 10^8$ - $8,4 \times 10^9$ CFU/ml). Ở pH8, số lượng tế bào các chủng đều giảm, chỉ còn $1,4 \times 10^8$ - $1,6 \times 10^9$ CFU/ml.

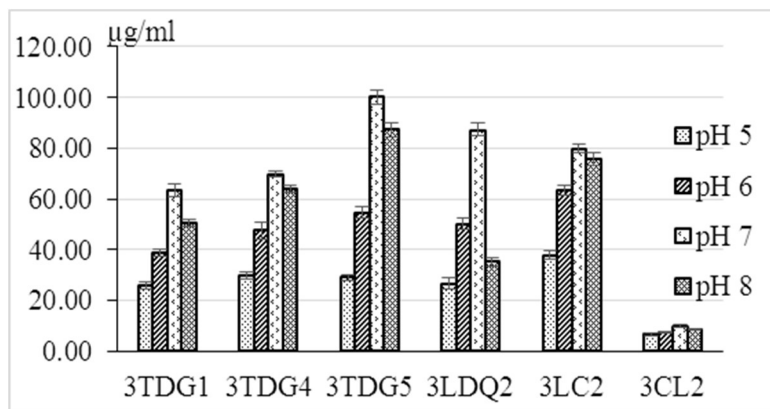
Ảnh hưởng của pH đến sinh tổng hợp IAA

của các chủng được thể hiện ở hình 4. Mặc dù số lượng tế bào hữu hiệu của các chủng trong khoảng pH = 7 - 8 không thay đổi nhiều nhưng lượng IAA lại thay đổi đáng kể. Hàm lượng IAA của các chủng tăng dần cùng với pH trong khoảng pH = 5 - 7 và giảm ở pH = 8. IAA cao nhất của các chủng đều được xác định thấy ở pH = 7, dao động trong khoảng từ $9,8 \pm 0,7$ đến $100,2 \pm 2,88$ $\mu\text{g/ml}$. Điều kiện môi trường có tính axit và kiềm dư thừa như cản trở việc sinh tổng hợp IAA cũng như sự phát triển của vi khuẩn.

Sinh tổng hợp IAA bởi vi sinh vật ở pH trung tính và kiềm nhẹ đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu. Tương tự với kết quả trong nghiên cứu này, các chủng vi khuẩn nội sinh *Pantoea agglomerans* train PVM (Apine *et al.*, 2011), *Bacillus* spp. (Sudha *et al.*, 2012) cũng sinh IAA cao ở pH trung tính. Nghiên cứu của Sachdev *et al.* (2009) cho thấy một số chủng nội sinh lại phát triển tốt và sinh IAA cao ở pH kiềm như *Klebsiella* strain K8 sinh IAA cao nhất

Bảng 2. Ảnh hưởng của pH đến số lượng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	Số lượng vi khuẩn ($\times 10^8$ CFU/ml)			
	pH = 5	pH = 6	pH = 7	pH = 8
3TDG1	0,5	2,30	84,0	1,6
3TDG4	0,46	8,20	28,0	6,8
3TDG5	0,48	3,20	63,0	16,0
3CL2	0,18	0,21	7,8	1,7
3LDQ2	0,02	0,11	2,9	1,4
3LC2	0,24	4,20	8,0	1,5



Hình 5. Ảnh hưởng của pH môi trường đến hàm lượng IAA

169 µg/ml ở pH 8. Trong khi đó, pH axit lại thích hợp cho các chủng sinh IAA như *Enterobacter cloacae* PnB9 ở pH = 4 (Jasim *et al.*, 2014) và *Acetobacter diazotrophicus* L1 ở pH = 6 (Nita *et al.*, 2011) sinh IAA lần lượt là 71,66 ± 6,11 µg/ml và 25 µg/ml.

3.3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Các chủng vi khuẩn nội sinh đã chọn lựa được nuôi cấy ở các nhiệt độ khác nhau 25°C, 30°C, 35°C và 40°C để xác định nhiệt độ thích hợp cho sinh tổng hợp IAA. Kết quả ở bảng 2 cho thấy các chủng trong nghiên cứu có ngưỡng phát triển rộng, số lượng tế bào đạt trên 10⁶ CFU/ml trong khoảng nhiệt 25 - 40°C. Chủng 3TDG4 phát triển với số lượng tế bào lớn nhất ở nhiệt độ 25°C, 2x10⁹ CFU/ml trong khi các chủng còn lại có số lượng tế bào cao nhất ở 30°C, đạt 3,6x10⁸- 8,4x10⁹ CFU/ml. Ở nhiệt độ 40°C, các chủng phát triển kém hơn.

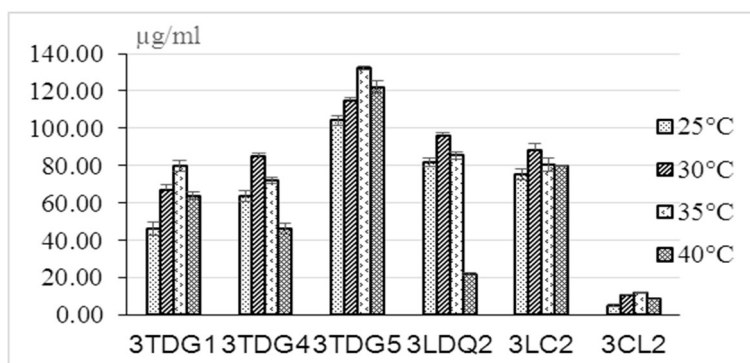
Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh tổng hợp IAA của các chủng được thể hiện ở hình 5. Kết quả cho thấy nhiệt độ thích hợp cho các chủng

sinh IAA cao lại khác với nhiệt độ thích hợp cho các chủng phát triển. Các chủng 3TDG1, 3TDG5, 3CL2 sinh IAA cao nhất ở 35°C, đạt 12,03 ± 0,93 - 132,3 ± 2,18 µg/ml. Các chủng 3TDG4, 3LDQ2, 3LC2 sinh IAA cao nhất ở 30°C, đạt 84,79 ± 1,57 - 96,04 ± 1,90 µg/ml.

Xu hướng sinh tổng hợp IAA ở nhiệt độ phòng có thể do nguồn gốc tự nhiên của các chủng nội sinh trong thực vật. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy nhiệt độ này thích hợp cho nhiều chủng như *Enterobacter cloacae* PnB9 sinh 40,33 ± 3,21 µg/ml ở 28°C (Jasim *et al.*, 2014), *Pantoea agglomerans* sinh 15,3 g/l ở 30°C (Apine *et al.*, 2011). Một số chủng thích hợp với nhiệt độ cao hơn như *Klebsella pneumoniae* PnB8 ở 37°C, đạt 59,66 ± 7,77 µg/ml (Jasim *et al.*, 2014). Khả năng sinh IAA cao ở các nhiệt độ nuôi cấy khác nhau có thể được cân nhắc như là tiềm năng ứng dụng các chủng vi khuẩn nội sinh trong nghiên cứu kích thích sinh trưởng thực vật ở nhiều điều kiện khí hậu và mùa vụ nông nghiệp khác nhau.

Bảng 3 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến số lượng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	Số lượng vi khuẩn (x 10 ⁸ CFU/ml)			
	25°C	30°C	35°C	40°C
3TDG1	5,7	84,0	79,0	0,21
3TDG4	20,0	5,0	14,0	0,05
3TDG5	15,0	56,0	32,0	4,80
3LDQ2	21,0	24,0	2,7	0,10
3LC2	1,4	3,6	1,5	2,60
3CL2	0,1	4,2	0,7	2,10



Hình 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng IAA

3.3.3. Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Ảnh hưởng tốc độ lắc đến số lượng tế bào của các chủng vi khuẩn được thể hiện ở bảng 4. Sự phát triển của các chủng tăng cùng với tốc độ lắc. Số lượng tế bào dao động trong khoảng $4,2 \times 10^7$ - $8,6 \times 10^8$ CFU/ml ở tốc độ 100 vòng/phút và cao nhất ở 200 vòng/phút, lên đến $5,2 \times 10^8$ - $6,8 \times 10^9$ CFU/ml. Ở tốc độ 250 vòng/phút, số lượng tế bào các chủng có xu hướng giảm, $8,2 \times 10^7$ - $6,8 \times 10^8$ CFU/ml.

Hàm lượng IAA của các chủng nghiên cứu ở các khoảng tốc độ lắc khác nhau được thể hiện ở hình 7. Xu hướng sinh tổng hợp IAA của các chủng tăng cùng với tốc độ lắc, hầu hết đều sinh IAA cao nhất ở tốc độ 200 vòng/phút, dao động trong khoảng $11,63 \pm 0,35$ đến $132 \pm 2,71$ $\mu\text{g/ml}$. Riêng chủng 3TDG1 sinh IAA cao nhất đạt $78,62 \pm 1,25$ $\mu\text{g/ml}$ ở tốc độ 150 vòng/phút. Khi tốc độ lắc lên đến 250 vòng/phút, IAA đo được ở các chủng đều giảm chỉ còn $9,73 \pm 0,42$ - $109,27 \pm 2,15$ $\mu\text{g/ml}$.

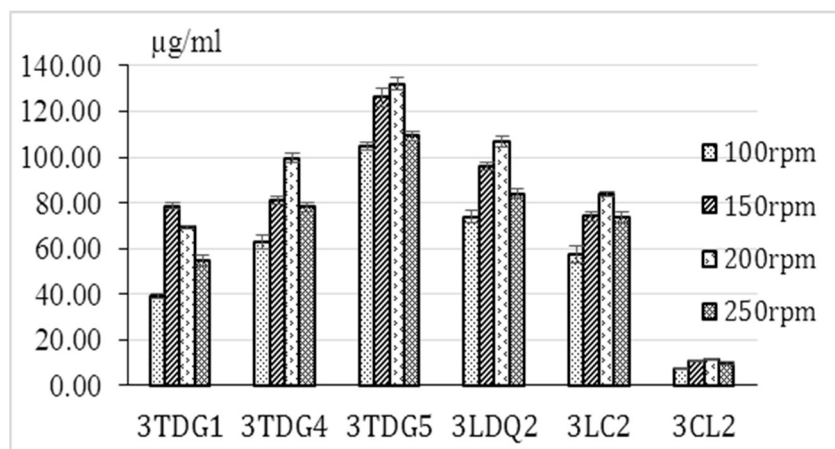
Theo Bharucha *et al.* (2013), điều kiện lắc ảnh hưởng đến tốc độ truyền oxy, giúp tăng lượng oxy hữu hiệu trong môi trường nuôi cấy, từ đó tác động đến hoạt động sinh tổng hợp IAA của vi khuẩn. Các chủng vi khuẩn nội sinh *Pseudomonas putida* UB1 (Bharucha *et al.*, 2013), *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp. đều sinh IAA cao dưới điều kiện nuôi cấy lắc (Jasim *et al.*, 2014).

3.3.4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Nghiên cứu thời gian đạt số lượng tế bào hữu hiệu của các chủng vi khuẩn là cần thiết để thuận lợi cho việc nhân sinh khối vi khuẩn sản xuất chế phẩm. Số lượng tế bào của các chủng sau 24 giờ nuôi cấy đạt $3,2 \times 10^7$ - $1,2 \times 10^8$ CFU/ml. Các chủng đều phát triển với số lượng tế bào cao nhất ở thời điểm 48 giờ, đạt $1,1 \times 10^8$ - $3,4 \times 10^9$ CFU/ml và sau đó giảm nhẹ ở 72 giờ, $8,6 \times 10^7$ - $2,5 \times 10^9$, CFU/ml (Bảng 5).

Bảng 4. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến số lượng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	Số lượng vi khuẩn ở các tốc độ lắc ($\times 10^8$ CFU/ml)			
	100 vòng/phút	150 vòng/phút	200 vòng/phút	250 vòng/phút
3TDG1	0,84	7,90	35,0	2,40
3TDG4	5,30	14,00	26,0	4,80
3TDG5	5,60	32,00	68,0	6,20
3LDQ2	2,40	2,70	19,0	5,10
3LC2	8,60	15,00	40,0	6,80
3CL2	0,42	0,75	5,2	0,82



Hình 7. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến hàm lượng IAA

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến số lượng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	Số lượng vi khuẩn (10^8 CFU/ml)		
	24 giờ	48 giờ	72 giờ
3TDG1	0,38	3,5	2,4
3TDG4	0,54	12,0	2,7
3TDG5	1,20	34,0	25,0
3LDQ2	0,38	21,0	9,7
3LC2	1,10	4,6	1,1
3CL2	0,32	1,1	0,8

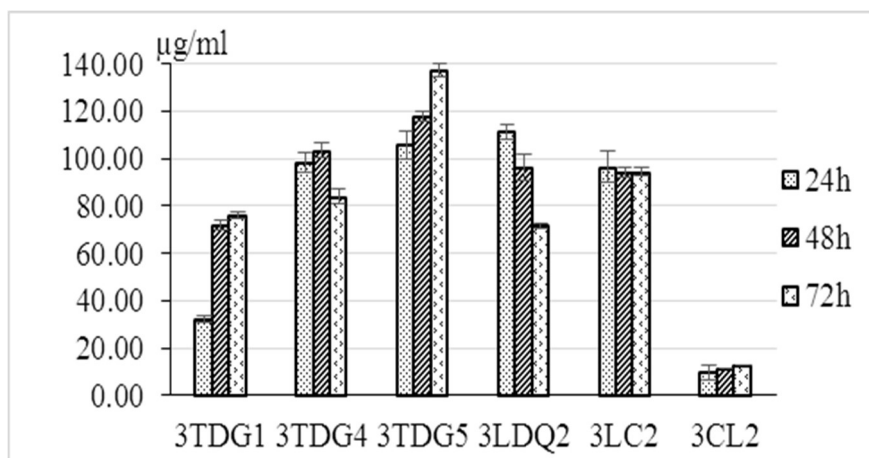
Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh tổng hợp IAA được thể hiện ở hình 6. Các chủng 3TDG1, 3TDG5, 3CL2 sinh IAA cao nhất sau 72 giờ, lần lượt là $76,02 \pm 1,34 \mu\text{g/ml}$; $137,36 \pm 3,05 \mu\text{g/ml}$; $12,58 \pm 0,13 \mu\text{g/ml}$. Trong khi lượng IAA sinh bởi 2 chủng 3LDQ2 và 3LC2 cao nhất ở thời điểm 24 giờ, lần lượt là $111,54 \pm 3,17$; $96,42 \pm 6,61 \mu\text{g/ml}$. Thời điểm sau 48 giờ lại thích hợp hơn cho chủng 3TDG4 sinh IAA, đạt $103,43 \pm 2,95 \mu\text{g/ml}$.

Nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh tổng hợp IAA cho thấy nồng độ IAA trong dịch nuôi tăng cùng với thời gian nuôi cấy bởi chúng là sản phẩm trao đổi chất thứ cấp (Ryan *et al.*, 2008). Sự phụ thuộc vào thời gian của quá trình tổng hợp IAA có thể có ý nghĩa lớn vì IAA tác động đến sinh trưởng thực vật. Trong 6 chủng nghiên cứu, 3TDG5 sinh IAA có hàm lượng cao nhất sau 72 giờ, đạt $137,36 \pm 3,05 \mu\text{g/ml}$ so với các chủng còn lại. Các chủng

nội sinh trong nghiên cứu của Jasim *et al.* (2014) lại sinh IAA tốt nhất sau 15 ngày nuôi cấy, cao nhất là chủng *Kl. pneumoniae* với hàm lượng IAA đạt $103,66 \pm 18,23 \mu\text{g/ml}$. IAA của chủng *Acetobacter diazotrophicus* L1 cao nhất sau 6 ngày nuôi cấy là $26,28 \mu\text{g/ml}$ (Nita *et al.*, 2011).

3.4. Sản xuất chế phẩm dinh dưỡng vi sinh từ vi khuẩn nội sinh

Kết quả đánh giá chất lượng chế phẩm dinh dưỡng vi sinh so với thông tư 41/2014/TT-BNNPTNT được thể hiện ở bảng 6. Kết quả cho thấy, các chỉ tiêu đánh giá chất lượng của chế phẩm dinh dưỡng đạt tiêu chuẩn so với thông tư 41/2014/TT-BNNPTNT. Vì vậy, loại chế phẩm dinh dưỡng vi sinh này hoàn toàn có thể đưa vào thử nghiệm và ứng dụng. Mặt khác, hàm lượng dinh dưỡng trong chế phẩm đạt được khá cao do được sản xuất từ phế thải chăn nuôi nên có thể dùng làm phân bón cho cây trồng.



Hình 8. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hàm lượng IAA

Bảng 6. Chất lượng của chế phẩm dinh dưỡng vi sinh

Chỉ tiêu	Kết quả	41/2014/TT-BNNPTNT
pH	7,2	6 - 8
OM%	7,62	-
N%	1,48	-
P ₂ O ₅ %	0,031	-
K ₂ O%	3,28	-
Vi sinh vật hữu ích CFU/ml	2,13x10 ⁸	≥ 1,0x10 ⁶

Ghi chú: - không có

3.5. Đánh giá hiệu quả của chế phẩm dinh dưỡng vi sinh từ vi khuẩn nội sinh trên cây mùng tơi

3.5.1. Hiệu quả của chế phẩm dinh dưỡng vi sinh với cây trồng

Kết quả thực nghiệm đã chỉ ra sự khác nhau mang ý nghĩa thống kê giữa số liệu thu được ở cả ba công thức với khoảng tin cậy 95%. Năng suất ở công thức dùng chế phẩm dinh dưỡng và chế phẩm dinh dưỡng vi sinh cao hơn 73,81% và 89,51% so năng suất ở công thức chỉ dùng phân NPK (Bảng 7). Các chỉ tiêu sinh trưởng phát triển của cây trồng cũng cho thấy kết quả tương tự: chỉ số chiều cao cây, số lá/cây, diện tích lá ở 2 công thức dùng chế phẩm đều cao hơn công thức dùng NPK với mức sai số có ý nghĩa.

Kết quả cho thấy cả ba công thức thí nghiệm được tiến hành cho kết quả đôi một khác nhau với khoảng tin cậy 95% (giá trị p < 0,05). Điều này là đúng với tất cả các chỉ số được dùng để so sánh. Kết quả này khẳng định khả năng kích thích sinh trưởng của vi sinh vật nội

sinh ở CT3 khi so với CT2, chỉ dùng chế phẩm dinh dưỡng, không bổ sung vi sinh vật. Việc sử dụng vi khuẩn nội sinh cùng chế phẩm dinh dưỡng đã giúp cây trồng tăng 12% chiều cao, 16,7% số lá, 10,7% diện tích lá và 11% năng suất so với CT2 chỉ dùng chế phẩm dinh dưỡng.

Trong nghiên cứu của Đào Văn Thông (2012), thử nghiệm phân bón vi sinh đa chức năng từ chủng *Azotobacter chroococum* AT73 và *Bacillus polyfermenticus* B04 cho thấy phân vi sinh có tác dụng tăng năng suất trung bình cây khoai tây từ 14 - 16% so với công thức đối chứng chỉ bón NPK kết hợp phân chuồng. Các thông số về sinh trưởng của cây như chiều cao, số thân/cây, diện tích lá ở công thức bón phân vi sinh cũng cao hơn so với công thức đối chứng. Theo Lai Chí Quốc và cộng sự (2012), chế phẩm vi sinh từ 3 chủng *Rhizobium tropici* CA10, *Bacillus subtilis* CA18 và *Rhizobium multihospitium* CA29 giúp làm tăng năng suất cây mùng tơi lên 1,29 lần so với không bón phân. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy khả năng thay thế 25% phân hóa học của chế phẩm từ 3 chủng trên. Trong nghiên cứu của

Bảng 7. Một số chỉ tiêu sinh trưởng của cây trồng sau thí nghiệm

Công thức	Chỉ tiêu			
	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá/cây)	Diện tích lá (cm ² /cây)	Năng suất (g/cây)
CT1	16,11	7,4	21,29	39,37
CT2	20,65	7,93	36,67	68,43
CT3	25,01	9,60	39,37	74,61
LSD _{5%}	0,54	0,73	1,95	1,21
CV%	1,8	6,0	4,1	1,4

Amaresan *et al.* (2012), thử nghiệm các chủng vi khuẩn nội sinh BECS3, BECS6, BECS7 thuộc các chi *Bacillus*, *Serratia* và *Corynebacterium* có tác dụng làm tăng chiều dài rễ và sinh khối cây ớt, cây cà chua. Như vậy, hiệu quả của chế phẩm dinh dưỡng vi sinh đa chức năng từ vi sinh vật nội sinh trên cây trồng trong nghiên cứu này cao hơn so với nhiều nghiên cứu khác và có tiềm năng ứng dụng trong thực tế sản xuất.

3.5.2. Hiệu quả của chế phẩm dinh dưỡng vi sinh với đất

Kết quả phân tích đất trồng mỏng tưới ở các công thức (Bảng 8) cho thấy pH đất sau thu hoạch tăng ít, độ chênh lệch pH giữa các nghiệm thức không nhiều hay nói cách khác pH đất khá ổn định ở mức trung tính. Trong khi đó, hàm lượng lân dễ tiêu, kali hòa tan và vi sinh vật tổng số trong đất ở công thức có sử dụng chế phẩm dinh dưỡng và chế phẩm dinh dưỡng vi sinh đa chức năng đều tăng so với mẫu đất trước thí nghiệm. Điều này có thể giải thích do sự hoạt động của các vi khuẩn nội sinh, đặc biệt là khả năng phân giải lân của các chủng 3LDQ2, 3LC2, 3CL2 cùng sự bổ sung của chế phẩm từ phế thải chăn nuôi. Kết quả này cho thấy khả năng các dòng vi khuẩn nội sinh có tác dụng tích cực đối với thành phần dinh dưỡng trong đất.

4. KẾT LUẬN

Sáu chủng vi khuẩn nội sinh là 3TDG1, 3TDG4, 3TDG5, 3LDQ2, 3LC2 và 3CL2 có các hoạt tính sinh học tốt như khả năng phân giải lân, kích thích sinh trưởng thực vật và đối kháng bệnh cao đã được tuyển chọn từ các vùng sinh thái khác nhau và được bổ sung vào dịch dinh dưỡng từ xử lý phế thải chăn nuôi làm chế phẩm dinh dưỡng vi sinh đa chức năng và có tiềm năng phát huy hiệu quả trên nhiều vùng sinh thái.

Các chủng được tuyển chọn lần lượt có mức độ tương đồng 99% với *Klebsiella pneumoniae* strain PSB1, *Klebsiella oxytoca* strain ALK033, *Aeromonas caviae* strain J5; *Pseudomonas putida* strain E1-4, *Pantoea rodasii* strain Y36 và chủng *Bacillus subtilis* strain QB5413.

Thử nghiệm sử dụng chế phẩm dinh dưỡng vi sinh đa chức năng đã làm tăng năng suất rau mùng tơi 89,51% so với công thức chỉ dùng phân NPK đưa đến tiềm năng sử dụng vi khuẩn nội sinh để sản xuất chế phẩm dinh dưỡng vi sinh đa chức năng bón cho cây trồng.

LỜI CẢM ƠN

Công trình nghiên cứu được sự hỗ trợ về kinh phí từ đề tài trọng điểm của Học viện Nông nghiệp Việt Nam mã số T2015 - 04 - 05TĐ.

Bảng 8. Chất lượng đất trước và sau thí nghiệm

Chỉ tiêu	Chất lượng đất trước thí nghiệm	Chất lượng đất sau thí nghiệm		
		CT1	CT2	CT3
pH	7,12	7,02	7,21	7,32
Độ ẩm %	27,61	28,47	29,02	29,16
OM %	2,97	2,64	2,55	2,47
N %	0,21	0,23	0,22	0,25
P tổng số	0,19	0,23	0,22	0,21
P _{dt} (mg/100 g đất)	2,22	1,84	2,76	2,85
K tổng số	1,35	1,28	1,34	1,32
K _{dt} (mg/100 g)	6,94	6,23	7,05	7,45
Vi sinh vật tổng số	3,6x10 ⁵	8,8x10 ⁵	1,2x10 ⁶	2,4x10 ⁷

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Amaresan N., Jayakumar V., and Thajuddin N. (2014). Isolation and characterization of endophytic bacteria associated with chilli (*Capsicum annuum*) grown in coastal agricultural ecosystem. *Indian Journal of Biotechnology*, 13: 247-255.
- Amaresan N., Jayakumar V., Kumar K., and Thajuddin N. (2012). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chilli (*Capsicum annuum*) seedling growth. *Annals of Microbiology*, 62(2): 805-810.
- Amaresan N., Jayakumar V., Kumar K., and Thajuddin N. (2012). Endophytic bacteria from tomato and chilli, their diversity and antagonistic potential against *Ralstonia solanacearum*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45(3): 344-355.
- Apine O. A. and Jadhav J.P. (2011). Optimization of medium for indole-3-acetic acid production using *Pantoea agglomerans* strain PVM. *Journal of Applied Microbiology*, 110(5): 1235-1244.
- Bharucha U., Patel K., and Trivedi (2013). "Optimization of Indole acetic acid production by *Pseudomonas putida* UB1 and its effect as plant growth-promoting rhizobacteria on Mustard (*Brassica nigra*)", *Agricultural Research*, 2(3): 215-221.
- Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Ái Chi (2009). Phân lập và đặc tính của vi khuẩn nội sinh trong cây Khóm trồng trên đất phèn huyện Bến Lức, tỉnh Long An, Việt Nam. Tuyển tập công trình nghiên cứu của hội nghị Công nghệ sinh học năm 2009 tổ chức tại thành phố Hồ Chí Minh, 23-24, tháng 10 năm 2009.
- Đào Văn Thông (2012). Nghiên cứu công nghệ sản xuất phân bón vi sinh vật chức năng sử dụng cho khoai tây. Luận án Tiến sĩ, Đại học Bách khoa Hà Nội.
- Dhanasekaran D., Thajuddin N., and Panneerselvam A. (2012). Applications of Actinobacterial Fungicides in Agriculture and Medicine. *Fungicides for Plant and Animal Diseases*, InTech.
- El-Deeb B., Bazaid S., Gherbawy Y., and Elhariry H. (2012). Characterization of endophytic bacteria associated with rose plant (*Rosadamasceana trigintipeta*) during flowering stage and their plant growth promoting traits. *Journal of Plant Interactions*, 7(3): 248-253.
- Gordon S. A. and Weber R. P. (1951). Colorimetric Estimation of Indoleacetic Acid. *Plant Physiol.*, 26(1): 192-195.
- Lương Thị Hồng Hiệp và Cao Ngọc Diệp (2011). Phân lập và nhận diện vi khuẩn nội sinh trong cúc xuyên chi (*Wedelia Trilobata* (L.) Hitchc) bằng kỹ thuật PCR. *Tạp chí khoa học*, 18a: 168-176.
- Jasim B., Jimtha John C., Shimil V., Jyothis M., and Radhakrishnan E. K. (2014). Studies on the factors modulating indole-3-acetic acid production in endophytic bacterial isolates from *Piper nigrum* and molecular analysis of ipdc gene. *Journal of Applied Microbiology*, 117(3): 786-99.
- Jasim B., Joseph A. A., John C. J., Mathew J., and Radhakrishnan E. K. (2014). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria from the rhizome of *Zingiber officinale*. *3 Biotech.*, 4(2): 197-204.
- Lai Chí Quốc, Nguyễn Thị Đơn, và Cao Ngọc Diệp (2012). Tuyển chọn và nhận diện vi khuẩn cố định đạm (có khả năng hòa tan lân và kali) phân lập từ vật liệu phong hóa của vùng núi đá hoa cương tại núi Cẩm, tỉnh An Giang. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 24a: 60-60.
- Mukasheva T., Berzhanova R., Ignatova L., Omirbekova A., Brazhnikova Y., Sydykbekova R., and Shigaeva M. (2016). Bacterial endophytes of Trans-Ili Alatau region's plants as promising components of a microbial preparation for agricultural use. *Acta Biochimica Polonica.*, 63(2): 321-8.
- Ozaktan H., Gül A., Çakur B., Yolageldü L., Akköprü A., Fakhræü D., and Akbaba M. (2013). Isolation optimization of bacterial endophytes from cucumber plants and evaluation of their effects on growth promotion and biocontrol. *Endophytes for plant protection: the state of the art. Proceedings of the 5th International Symposium on Plant Protection and Plant Health in Europe*, Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft e.V. Verlag, Humboldt University Berlin, Berlin-Dahlem, Germany, pp. 262-268.
- Puente M.E., Bashan Y., Li C.Y., and Lebsky V.I. (2004). Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks", *Plant Biol.*, 6: 629-642.
- Reinhold-Hurek B. and Hurek T. (2011). Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology.*, 14(4): 435-443.
- Sambrook J. and Russell D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sudha M., Gowri R. S., Prabhavathi P., Astapriya P., Devi S. Y., and Sarany A. (2012). Production and optimization of indole acetic acid by indigenous

- micro flora using agro waste as substrate. Pakistan Journal of Biological Sciences, 15(1): 39-43.
- Theunis M. (2005). IAA biosynthesis in rhizobia and its potential role in symbiosis, Universiteit Antwerpen.
- Phạm Văn Toàn (1998). Nghiên cứu áp dụng các giải pháp công nghệ mới nhằm mở rộng việc sản xuất và ứng dụng phân bón vi sinh vật cố định nitơ, phân giải lân trong nông, lâm nghiệp. Báo cáo tổng kết đề tài khoa học cấp nhà nước KHCN.02.06, Hà Nội 12/1998.
- Tsavkelova E. A., Cherdyntseva T. A., Botina S. G., and Netrusov A. I. (2007). Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. Microbiological Research, 162(1): 69-76.
- William S. (1983). Staining reaction for detection of hemicellulose degrading. FEMS Microbiology Letters, 20: 253-258.