

## TIỀM NĂNG ỨNG DỤNG TẠO CHẾ PHẨM LÀM PHÂN BÓN HỮU CƠ SINH HỌC TỪ CÁC CHỦNG VI KHUẨN *BACILLUS VELEZENSIS* PHÂN LẬP TỪ CÁC VÙNG SINH THÁI KHÁC NHAU TẠI VIỆT NAM

Trịnh Thành Trung<sup>1, ✉</sup>, Đinh Thị Tuyết Vân<sup>1</sup>, Nguyễn Phương Liên<sup>2</sup>, Đào Thị Lương<sup>1</sup>, Dương Văn Hợp<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

<sup>2</sup>Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: [tttrung@vnu.edu.vn](mailto:tttrung@vnu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 20.3.2016

Ngày nhận đăng: 22.01.2017

### TÓM TẮT

*Bacillus velezensis* là một loài thuộc nhóm vi khuẩn *B. subtilis*. Do sở hữu nhiều đặc tính quý có lợi cho cây trồng, loài vi khuẩn này đang nhận được nhiều quan tâm nghiên cứu ứng dụng trong phòng trừ bệnh hại cây và tăng năng suất cây trồng. 15 chủng *B. velezensis* phân lập được ở các vùng Hoàng Liên, Cúc Phương, Bạch Mã, Chư Yang Sin và Côn Đảo đã được phát hiện có hoạt tính kháng các loại nấm hại cây là *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium hydrophilum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* và vi khuẩn gây bệnh bạc lá *Xanthomonas oryzae*. Hơn nữa, các chủng này còn có khả năng phân giải phosphate khó tan, sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật IAA và sản sinh nhiều enzyme thủy phân như lipase, protease, amylase, CMCase, xylanase và chitinase. Phân tích đa dạng di truyền dựa trên kỹ thuật dấu vân tay rep - PCR sử dụng 2 môi ERIC và GTG<sub>5</sub> cho thấy mỗi GTG<sub>5</sub> phân tách tốt hơn mỗi ERIC với số lượng kiểu gen tạo ra tương ứng là 13 và 8. Tổ hợp mô hình bằng DNA của 2 loại mỗi tạo ra 14 loại kiểu gen. Kết quả đa dạng di truyền đó được kiểm chứng bằng kỹ thuật giải trình tự đa gen của 2 chủng CP 1604 và SP 1901 với sự phân tách rõ ràng trên cây phân loại. Với khả năng sinh các loại enzyme thủy phân và sinh các chất có lợi cho cây trồng, các chủng *B. velezensis* này có tiềm năng ứng dụng để tạo chế phẩm làm phân bón hữu cơ sinh học.

**Từ khóa:** *Bacillus velezensis*, *Bacillus subtilis*, phân bón hữu cơ sinh học, đấu tranh sinh học, vi khuẩn kích thích cây trồng phát triển

### MỞ ĐẦU

Sử dụng phân bón vô cơ và các loại thuốc hóa học phòng trừ sâu bệnh trong sản xuất nông nghiệp đang gây ra những tác động tiêu cực đến độ màu mỡ của đất, hủy hoại môi trường sống và làm ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe con người. Phát triển ngành nông nghiệp theo hướng xanh và bền vững là vấn đề tất yếu của mọi quốc gia và phân bón hữu cơ sinh học đang là giải pháp ưu thế được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi trên toàn thế giới (Bhardwaj *et al.*, 2014). Phân bón hữu cơ sinh học không chỉ cung cấp các loại chất dinh dưỡng nhằm duy trì và ổn định độ phì nhiêu cho đất mà còn cung cấp các loại vi sinh vật có lợi cho sự phát triển của cây trồng. Các vi sinh vật thường bổ sung vào phân bón hữu cơ sinh học bao gồm *Rhizobium* (vi khuẩn cố định nitơ sống cộng sinh),

*Azospirillum* (vi khuẩn cố định nitơ sống tự do), *Bacillus* (vi khuẩn phân giải phosphate khó tan và sản sinh các chất phòng trừ bệnh cây), *Pseudomonas* và *Trichoderma* (vi khuẩn và nấm sợi sản sinh các chất phòng trừ bệnh cây) (Fravel, 2005).

Chi *Bacillus* là một nhóm các loài vi khuẩn hiếu khí, Gram dương, hình que, phân bố rộng rãi trong các hệ sinh thái. *Bacillus* có khả năng sinh nội bào tử, một dạng nghỉ của tế bào để giúp vi khuẩn có thể chống chịu và tồn tại trước các điều kiện bất lợi của môi trường như khô hạn và thiếu dinh dưỡng. Theo hệ thống phân loại hiện nay, chi *Bacillus* có khoảng gần 300 loài và các loài phụ dưới loài (Parte, 2014). Trong số đó, *Bacillus velezensis* (hay còn gọi là *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, *B. methylotrophicus* và *B. oryzicola*) là một trong tám loài vi khuẩn thuộc nhóm *B. subtilis* (Rooney *et al.*, 2011; Dunlap *et al.*, 2015). Đây là những loài vi

khả năng an toàn, sở hữu nhiều đặc tính quý có lợi cho cây trồng như khả năng sinh các chất kháng nấm và kháng vi khuẩn gây bệnh cây, sản sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật, sản sinh các enzyme thủy phân và có khả năng tăng cường tính miễn dịch của cây chống lại sự xâm nhiễm của các loại vi sinh vật gây bệnh (Chowdhury *et al.*, 2015; Shao *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015). Do sở hữu các đặc tính quý, nhiều chủng vi khuẩn *B. velezensis* đã được phân lập, đánh giá các đặc tính có lợi và ứng dụng trong đầu tranh sinh học hoặc bổ sung vào các loại phân bón hữu cơ sinh học. Một số chủng như *B. velezensis* FZB42 cũng đã được sản xuất thương mại sử dụng làm chế phẩm phân sinh học và chế phẩm phòng trừ bệnh cây (Chowdhury *et al.*, 2015). Nhiều báo cáo đã công bố hiệu quả sử dụng các chủng *B. velezensis* trong phòng trừ và làm giảm tỷ lệ nhiễm bệnh cũng như mức độ nhiễm bệnh của cây do vi khuẩn và nấm gây bệnh cây gây ra (Chen *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2015). Sản lượng bông thu hoạch cũng tăng lên 30% khi bổ sung chủng *B. velezensis* FZB42 vào phân bón (Yao *et al.*, 2006).

Nhằm tìm kiếm các chủng vi khuẩn có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất chế phẩm làm phân hữu cơ sinh học, trong nghiên cứu này, chúng tôi trọng tâm nghiên cứu các đặc tính có lợi cho cây trồng từ các chủng vi khuẩn *B. velezensis* có trong bộ sưu tầm vi khuẩn *Bacillus* thu thập tại các vùng Cúc Phương, Bạch Mã, Chư Yang Sin và Côn Đảo. Ngoài ra, chủng vi khuẩn *B. velezensis* SP1901 phân lập được từ mẫu đất rừng quốc gia Hoàng Liên cũng được sử dụng.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Chủng vi khuẩn nghiên cứu

Từ bộ vi khuẩn hiếu khí sinh nội bào từ phân lập tại 4 vườn Quốc gia Cúc Phương, Bạch Mã, Chư Yang Sin và Côn Đảo, chúng tôi tiến hành so sánh tính tương đồng cao nhất của đoạn gen 16S rRNA so với các chủng chuẩn của các loài trong cơ sở dữ liệu Eztaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>). Dựa trên số liệu so sánh, chúng tôi lựa chọn các chủng có trình tự gen 16S rRNA tương đồng cao nhất với các loài *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, *B. methylotrophicus* và *B. oryzicola*. Từ ống lưu giữ lạnh sâu ở -70°C, các chủng vi khuẩn lựa chọn được ria hoạt hóa trên môi trường thạch NA (Becton, Dickinson and Company, Pháp) tại 30°C. Sau 24 giờ, tế bào hoạt hóa thu được sẽ dùng cho các

thí nghiệm mô tả dưới đây.

### Xác định khả năng sinh chất kháng nấm và chất kháng khuẩn

Từ các tế bào đã hoạt hóa, các chủng vi khuẩn được cấy trải đều trên mặt thạch TSBA (Becton, Dickinson and Company, Pháp) và được ủ ở 30°C. Hoạt tính kháng nấm và kháng khuẩn được kiểm tra bằng phương pháp khuếch tán thạch. Theo đó, khoanh thạch được đục bằng ống nhựa vô trùng ( $\varnothing = 6$  mm) và được đặt lên môi trường PDA (g/L: khoai tây 200 g, dextrose 20 g và thạch 15 g) đã cấy sẵn các loài nấm kiểm định gây bệnh thực vật là *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium hydrophilum*, *Rhizoctonia solani* và *Phytophthora capsici* hoặc đặt lên môi trường NA đã cấy vi khuẩn kiểm định gây bệnh bạc lá lúa là *Xanthomonas oryzae*. Ngoài ra, phổ hoạt tính kháng nấm cũng được kiểm tra trên các chủng nấm kiểm định là *Aspergillus oryzae*, *A. niger* và *Saccharomyces cerevisiae*. Bộ giống các chủng vi sinh vật kiểm định này đang được lưu giữ tại Bảo tàng Giống chuẩn Vi sinh vật, Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

### Xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào

Từ các tế bào đã hoạt hóa, chủng vi khuẩn được cấy vào bình tam giác 250 ml chứa 100 ml môi trường TSB (Becton, Dickinson and Company, Pháp) dịch thể. Sau 48 giờ nuôi cấy lắc 160 v/p ở 30°C, dịch nuôi được ly tâm ở 8.000 v/p trong 10 phút nhằm loại bỏ tế bào vi khuẩn. Khả năng sinh enzyme ngoại bào được xác định bằng phương pháp khuếch tán thạch. Theo đó, dịch nuôi cấy vi khuẩn được nhỏ vào các giếng ( $\varnothing = 6$  mm) đã đục lỗ trong đĩa thạch chứa 0,1% một trong các loại cơ chất là tinh bột tan, CMC, xylan, chitin, casein và tributyrin. Sau 24 giờ ủ đĩa thạch chứa cơ chất ở 37°C, hoạt tính amylase và CMCase được xác định dựa trên vòng trong phân giải cơ chất tinh bột tan và CMC xung quanh khoanh thạch khi nhuộm với dung dịch lugol; hoạt tính xylanase và chitinase được quan sát khi nhuộm cơ chất xylan và chitin với dung dịch đồ công gô; hoạt tính protease và lipase được quan sát trực tiếp trên cơ chất casein và tributyrin.

### Xác định khả năng phân giải phosphate khó tan

Chủng vi khuẩn đã hoạt hóa được cấy vào bình tam giác 100 ml chứa 25 ml môi trường dịch thể PVK (g/L: glucose 10,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  5, KCl 0,2,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,5, NaCl 0,2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,002 và  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,002). Sau 48 giờ nuôi lắc 160 v/p ở 30°C, dịch nuôi vi khuẩn

được ly tâm ở 8.000 v/p trong 10 phút để loại bỏ tế bào. Hàm lượng phosphate vô cơ giải phóng từ  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  vào môi trường nuôi cấy được xác định bằng phương pháp xanh molybden dựa trên đường chuẩn phosphate xây dựng từ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Holman *et al.*, 1943).

#### Xác định khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng IAA

Chủng vi khuẩn đã hoạt hóa được cấy vào bình tam giác 100 ml chứa 25 ml môi trường dịch thể NA có bổ sung L-tryptophan (Merck, Đức) tới nồng độ cuối là 5 mM. Sau 48 giờ nuôi lắc 160 v/p ở 30°C, dịch nuôi vi khuẩn được ly tâm ở 8,000 v/p trong 10 phút để loại bỏ tế bào. Khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng indole-3-acetic acid (IAA) được xác định dựa trên phản ứng tạo màu với thuốc thử Salkowski (Glickmann và Dessaux, 1995). Hàm lượng IAA sinh ra được xác định dựa trên đường chuẩn xây dựng từ IAA (Merck, Đức).

#### Dấu vân tay rep-PCR và phân tích tính tương đồng kiểu gen

Từ các khuẩn lạc thuần khiết, ADN tổng số được tách chiết theo phương pháp của Gabor *et al.* (2003). Mức độ tinh sạch của ADN được kiểm tra dựa trên chỉ số bước sóng  $A_{260}/A_{280}$  (xấp xỉ 1,8). Sau đó, 50 ng ADN của từng chủng vi khuẩn được đưa vào ống PCR có thể tích phản ứng cuối cùng là 25  $\mu\text{l}$  chứa sẵn DreamTaq™ PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Phản ứng PCR được thực hiện với môi ERIC và GTG<sub>5</sub> theo chu trình nhiệt do Freitas *et al.* (2008) đã mô tả. Sản phẩm PCR được điện di trong 2 giờ tại 65 V trên gel agarose 2% có bổ sung chất nhuộm ADN RedSafe (iNtRON Biotechnology, Hàn Quốc). Hình ảnh điện di được chụp trên hệ thống soi gel (BioRad, Mỹ). Mô hình băng ADN (hay kiểu gen) tạo ra từ mỗi chủng vi khuẩn được phân tích và được mã hóa sang hệ ma trận nhị phân 1/0. Tính tương đồng về kiểu gen được tính toán theo hệ số Dice. Mọi quan hệ về kiểu gen của các chủng được thể hiện theo sơ đồ cây sử dụng thuật toán UPGMA. Tất cả các bước phân tích tính tương đồng kiểu gen được thực hiện trên phần mềm NTSYSpc 2.1.

#### Phân tích trình tự đa gen và xây dựng cây phát sinh chủng loại

Phản ứng PCR khuếch đại và giải trình tự 6 đoạn gen gyrase subunit A (*gyrA*), RNA polymerase subunit B (*rpoB*), phosphoribosylaminoimidazolecarbox-

amideformyltransferase (*purH*), DNA polymerase III subunit alpha (*polC*), 60 kDa heat-shock protein groEL (*groEL*) và 16S rRNA được thực hiện với các cặp môi theo mô tả của Rooney *et al.* (2009). Trình tự của 6 gen được gửi lên ngân hàng gen với các số hiệu lần lượt là KU904810, KU904811, KU904812, KU904813, KU904814 và KU904810. Trình tự đa gen của chủng vi khuẩn nghiên cứu có chiều dài 5.547 bp được kết nối theo thứ tự đoạn 928 bp của gen *gyrA*, đoạn 964 bp của gen *rpoB*, đoạn 875 bp của gen *purH*, đoạn 777 bp của gen *polC*, đoạn 835 bp của gen *groEL* và đoạn 1,168 bp của gen 16S rRNA. Trình tự đa gen của các loài quan hệ gần gũi trong nghiên cứu của Kobo *et al.* (2011) được tải về từ ngân hàng gen NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Cây phát sinh chủng loại được xây dựng theo phương pháp Neighbor joining sử dụng phép toán Tamura - Nei với độ lặp lại 1,000 lần trên phần mềm MEGA phiên bản 5.05.

#### KẾT QUẢ

##### *B. velezensis* phân lập tại các vùng sinh thái khác nhau của Việt Nam

Từ tháng 11 năm 2012 đến tháng 10 năm 2013, nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã tiến hành thu thập 79 mẫu đất tại 4 vườn Quốc gia và các vùng đất canh tác nông nghiệp lân cận là Cúc Phương, Bạch Mã, Chư Yang Sin và Côn Đảo. 1.441 chủng vi khuẩn hiếu khí sinh nội bào tử đã được phân lập bằng phương pháp xử lý nhiệt (Van *et al.*, 2014). Dựa trên các đặc điểm khác biệt về màu sắc, kích thước, cấu trúc bề mặt và mép viền ngoài khuẩn lạc, 252 (17,5%) chủng đã được giải trình tự gen 16S rRNA (xấp xỉ 1.500 bp). So sánh trong cơ sở dữ liệu Eztaxon-e cho thấy, 14 chủng có chỉ số tương đồng gen 16S rRNA cao nhất với chủng *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 là 99,93%. Gen 16S rRNA của 14 chủng này đều tương đồng nhau và chỉ sai khác 1 nucleotide ở vị trí 583 (G thay bằng A) so với chủng *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42. Không có chủng nào có trình tự gen 16S rRNA tương đồng cao nhất với các loài *B. methylotrophicus* và *B. oryzoicola*.

Trong số 14 chủng *B. velezensis*, 3 chủng phân lập được ở Cúc Phương, 3 chủng phân lập được ở Bạch Mã, 5 chủng phân lập được ở Chư Yang Sin và 3 chủng phân lập được ở Côn Đảo. 12 (86%) chủng được phân lập trong đất canh tác nông nghiệp; chỉ có 2 chủng là BM 1912 và CDH 1701 phân lập trong đất rừng. Ngoài ra, *B. velezensis* SP1901 phân lập từ

mẫu đất rừng Hoàng Liên cũng được nghiên cứu. Thông tin chi tiết về 15 chủng được trình bày trong bảng 1.

### Hoạt tính kháng nấm và vi khuẩn

Cùng với chủng *B. velezensis* SP 1901, 14 chủng *B. velezensis* trong nghiên cứu này đều sinh chất kháng nấm gây bệnh cây là *F. oxysporum*, *S. hydrophilum*, *R. solani* và *P. capsici* với kích thước vòng kháng nấm trung bình đối với từng loại nấm

lần lượt là 4,2 mm, 10,6 mm, 7,7 mm và 7,4 mm. Các chủng *B. velezensis* thử nghiệm đều sinh hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh bạc lá lúa *X. oryzae* với kích thước vòng kháng trung bình là 20,8 mm. Ngoài ra, hoạt tính kháng nấm của các chủng *B. velezensis* cũng thể hiện rất rõ ràng khi thử nghiệm với 2 loại nấm sợi và 1 loại nấm men thường gặp là *A. oryzae*, *A. niger* và *S. cerevisiae* (Bảng 2). Điều đó chứng tỏ rằng các chủng *B. velezensis* phân lập trong môi trường tự nhiên của Việt Nam sinh hoạt chất có phổ kháng rộng đối với nấm và vi khuẩn.

**Bảng 1.** Thông tin 15 chủng *B. velezensis* trong nghiên cứu. NN: nông nghiệp; R: rừng.

STT	Tên chủng	Loại đất	Tọa độ		Độ tương đồng (%)	Số hiệu đoạn 16S rDNA tham chiếu
1	CP 1604	NN	20.39730 N	105.58793 E	99,93	CP000560
2	CP 1801	NN	20.40270 N	105.53779 E	99,93	CP000560
3	CP 1205	NN	20.36010 N	105.67194 E	99,93	CP000560
4	BM 0621	NN	16.09630 N	108.08954 E	99,93	CP000560
5	BM 0824	NN	16.27200 N	108.00317 E	99,93	CP000560
6	BM 1912	R	15.99740 N	107.99320 E	99,93	CP000560
7	CYS 0101	NN	12.65070 N	108.09832 E	99,93	CP000560
8	CYS 0208	NN	12.61560 N	108.12942 E	99,93	CP000560
9	CYS 0816	NN	12.49300 N	108.28791 E	99,93	CP000560
10	CYS 0901	NN	12.52710 N	108.35777 E	99,93	CP000560
11	CYS 0911	NN	12.52710 N	108.35777 E	99,93	CP000560
12	CĐH 0101	NN	8.68555 N	106.59250 E	99,93	CP000560
13	CĐH 0102	NN	8.68555 N	106.59250 E	99,93	CP000560
14	CĐH 1701	R	8.68916 N	106.58861 E	99,93	CP000560
15	SP 1901	R	22.28469 N	103.89341 E	99,93	CP000560

**Bảng 2.** Hoạt tính kháng nấm và vi khuẩn.

	Hoạt tính kháng nấm và vi khuẩn (D - d, mm)							
	Kháng nấm và vi khuẩn gây bệnh cây					Kháng nấm khác		
	7	13	12	9	23	7	7	9
CP 1604	7	13	12	9	23	7	7	9
CP 1801	5	11	11	9	20	4	6	2
CP 1205	3	9	8	8	21	3	5	3
BM 0621	5	11	10	6	19	5	5	2
BM 0824	5	13	9	9	21	4	6	3
BM 1912	5	12	7	11	21	5	6	4
CYS 0101	6	12	7	9	18	6	10	2
CYS 0208	5	11	5	9	23	7	6	3
CYS 0816	2	12	4	6	23	7	5	5
CYS 0901	5	10	9	6	22	3	9	5
CYS 0911	4	11	10	8	20	5	6	4
CĐH 0101	2	8	7	6	23	2	4	7
CĐH 0102	4	8	6	5	18	2	4	9
CĐH 1701	4	11	6	6	17	2	4	9
SP 1901	2	7	5	5	23	3	2	2

### Enzyme ngoại bào

Thử nghiệm dịch nuôi cấy ngoại bào cho thấy cả 15 chủng *B. velezensis* đều sinh các enzyme ngoại bào là lipase, protease, amylase, CMCase, xylanase và chitinase. Kích thước vòng phân giải trên từng loại cơ chất là tương đương nhau và được thể hiện chi tiết trong bảng 3.

### Khả năng phân giải phosphate khó tan và sinh chất kích thích sinh trưởng IAA

Mười lăm chủng *B. velezensis* đều có khả năng phân giải phosphate khó tan  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Mức độ giải phóng phosphate vô cơ vào trong môi trường nuôi cấy giao động từ 19,64 - 74,21  $\mu\text{g/ml}$ . Bên cạnh đó, một số chủng cũng có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật IAA khá rõ ràng như chủng CDH 0101 (3,28  $\mu\text{g/ml}$ ) và SP 1901 (1,98  $\mu\text{g/ml}$ ); một số chủng sinh hàm lượng IAA rất thấp như CP 1604 và CYS 0101 (Bảng 4).

**Bảng 3.** Khả năng sinh các loại enzyme ngoại bào.

Tên chủng	Hoạt tính enzyme ngoại bào (D - d, mm)					
	Lipase	Protease	CMCase	Amylase	Chitinase	Xylanase
CP 1604	11	23	20	17	23	20
CP 1801	11	23	20	17	23	17
CP 1205	10	23	17	16	24	17
BM 0621	11	25	18	16	23	20
BM 0824	9	23	19	16	21	17
BM 1912	10	23	15	16	23	20
CYS 0101	9	23	17	17	22	16
CYS 0208	9	23	19	16	21	17
CYS 0816	8	23	19	16	21	20
CYS 0901	9	23	18	16	21	17
CYS 0911	10	23	20	18	23	17
CDH 0101	8	23	20	15	22	20
CDH 0102	7	22	19	15	22	18
CDH 1701	7	21	20	16	22	18
SP 1901	6	19	16	18	22	19

**Bảng 4.** Khả năng phân giải phosphate khó tan và sinh chất kích thích sinh trưởng IAA.

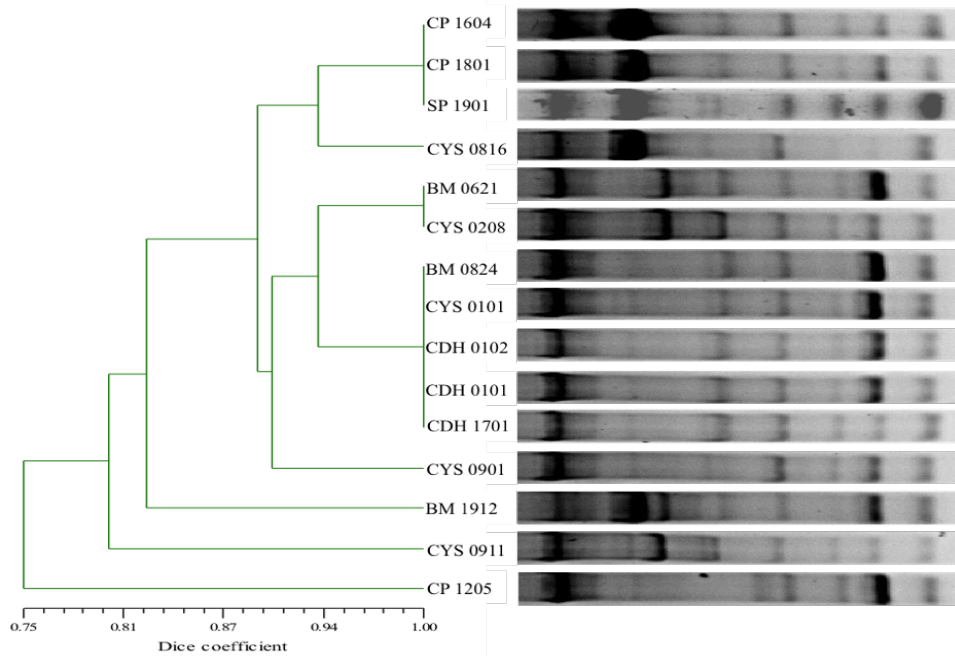
Tên chủng	Lượng phosphate hòa tan ( $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$ )	Lượng IAA sinh ra ( $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$ )
CP 1604	49,67 $\pm$ 0,61	0,69 $\pm$ 0,09
CP 1801	53,12 $\pm$ 1,96	1,41 $\pm$ 0,05
CP 1205	53,25 $\pm$ 2,19	1,40 $\pm$ 0,04
BM 0621	54,45 $\pm$ 5,13	1,18 $\pm$ 0,07
BM 0824	63,24 $\pm$ 0,53	1,07 $\pm$ 0,08
BM 1912	61,21 $\pm$ 2,99	1,44 $\pm$ 0,04
CYS 0101	19,64 $\pm$ 2,43	0,64 $\pm$ 0,12
CYS 0208	65,84 $\pm$ 1,85	1,38 $\pm$ 0,04
CYS 0816	64,79 $\pm$ 1,12	1,30 $\pm$ 0,11
CYS 0901	63,03 $\pm$ 1,34	1,55 $\pm$ 0,08
CYS 0911	74,21 $\pm$ 0,74	1,33 $\pm$ 0,11
CDH 0101	66,82 $\pm$ 1,91	3,28 $\pm$ 0,09
CDH 0102	61,13 $\pm$ 1,37	0,88 $\pm$ 0,06
CDH 1701	67,32 $\pm$ 0,73	0,89 $\pm$ 0,03
SP 1901	60,85 $\pm$ 2,62	1,98 $\pm$ 0,10

**Đa dạng kiểu gen của vi khuẩn**

Nhằm phân tích tính đa dạng về mặt di truyền của các chủng vi khuẩn *B. velezensis* phân lập tại các vùng sinh thái khác nhau của Việt Nam, kỹ thuật dấu vân tay rep - PCR sử dụng 2 loại môi ERIC và GTG<sub>5</sub> đã được thực hiện. Đối với mỗi ERIC, phản ứng PCR đã tạo ra 11 loại băng DNA nằm trong khoảng kích thước từ 500 - 5.000 bp. Số lượng băng DNA tạo ra cho từng chủng dao động từ 6 đến 8. Phương pháp phân tích tính tương đồng đã xác định được 8 loại kiểu gen với 3 nhóm chủng có cùng mô hình băng DNA là chủng CP 1604, CP 1801 và SP 1901; chủng BM 0621 và CYS 0208; và chủng BM 0824, CYS 0101, CDH 0101, CDH 0102 và CDH 1701. Năm chủng còn lại gồm CYS 0816, CYS 0901, BM 1912, CYS 0911 và CP1205 sở hữu riêng một loại kiểu gen khác nhau (Hình 1). Tương tự, đối với mỗi GTG<sub>5</sub>, phản ứng PCR đã tạo ra 15 loại băng DNA nằm trong

khoảng kích thước từ 500 - 5.000 bp. Số lượng băng DNA tạo ra cho từng chủng dao động từ 5 đến 8. Phương pháp phân tích tính tương đồng đã xác định được 13 loại kiểu gen, trong đó, chủng CDH 0101 và CDH 0102 được xếp vào cùng 1 nhóm (Hình 2).

Để kiểm chứng lại khả năng phân tách của 2 loại môi ERIC và GTG<sub>5</sub> trong kỹ thuật dấu vân tay rep - PCR, trình tự đa gen của chủng CP 1604 được phân tích và so sánh với chủng SP 1901. Trình tự ADN 5.547 bp kết nối từ 6 gen *gyrA*, *rpoB*, *purH*, *polC*, *groEL* và 16S rRNA của hai chủng này sai khác nhau 83 nucleotide với số lượng sai khác lần lượt cho từng gen là 25, 8, 20, 17, 12 và 1 nucleotide. Trên cây phát sinh chủng loại, chủng SP 1901 và CP 1604 nằm tách biệt ở 2 nhóm *B. velezensis* khác nhau (Hình 3). Điều đó chứng tỏ, kỹ thuật dấu vân tay rep - PCR sử dụng môi GTG<sub>5</sub> cho kết quả phân tích tốt hơn và chính xác hơn so với môi ERIC.



**Hình 1.** Sơ đồ cây về mối tương đồng kiểu gen xây dựng bằng kỹ thuật dấu vân tay rep - PCR sử dụng môi ERIC của các chủng *B. velezensis* phân lập tại các vùng sinh thái khác nhau của Việt Nam.

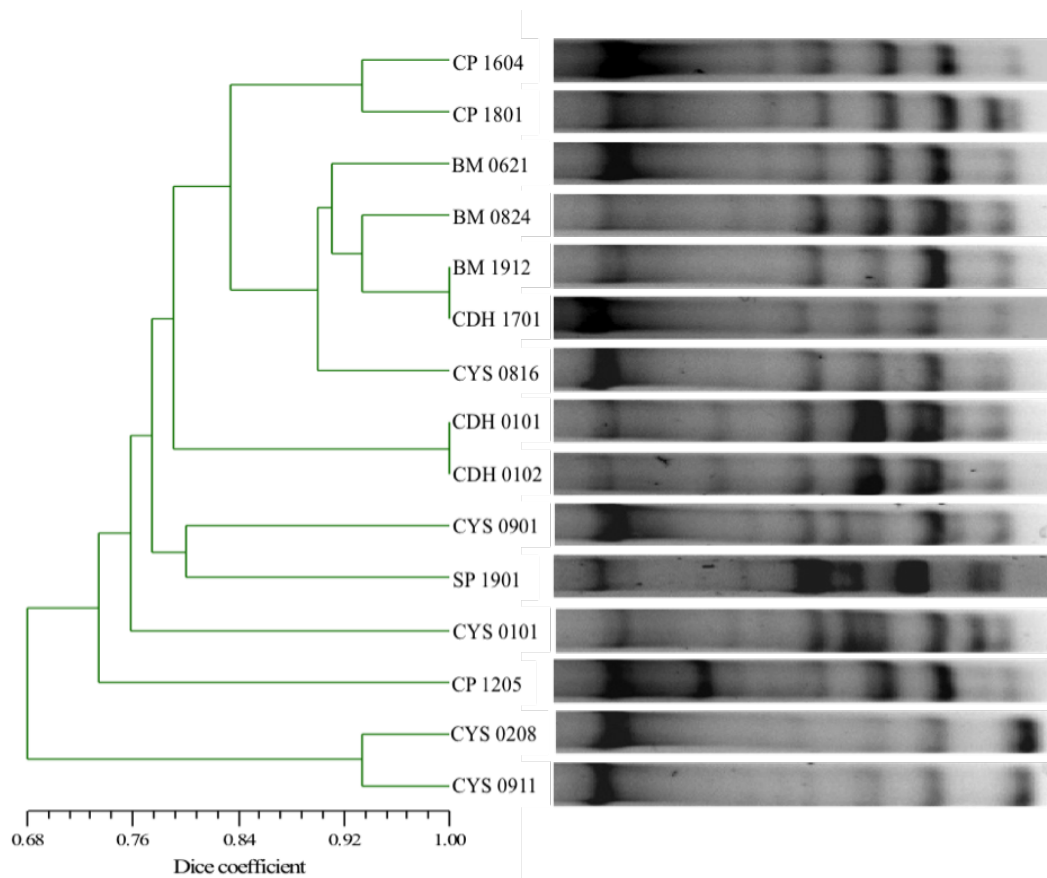
**THẢO LUẬN**

*B. velezensis* là một trong số 8 loài vi khuẩn thuộc nhóm *B. subtilis* (Rooney *et al.*, 2009). Đây là loài được đề xuất đặt tên vào năm 2005 sau phát hiện

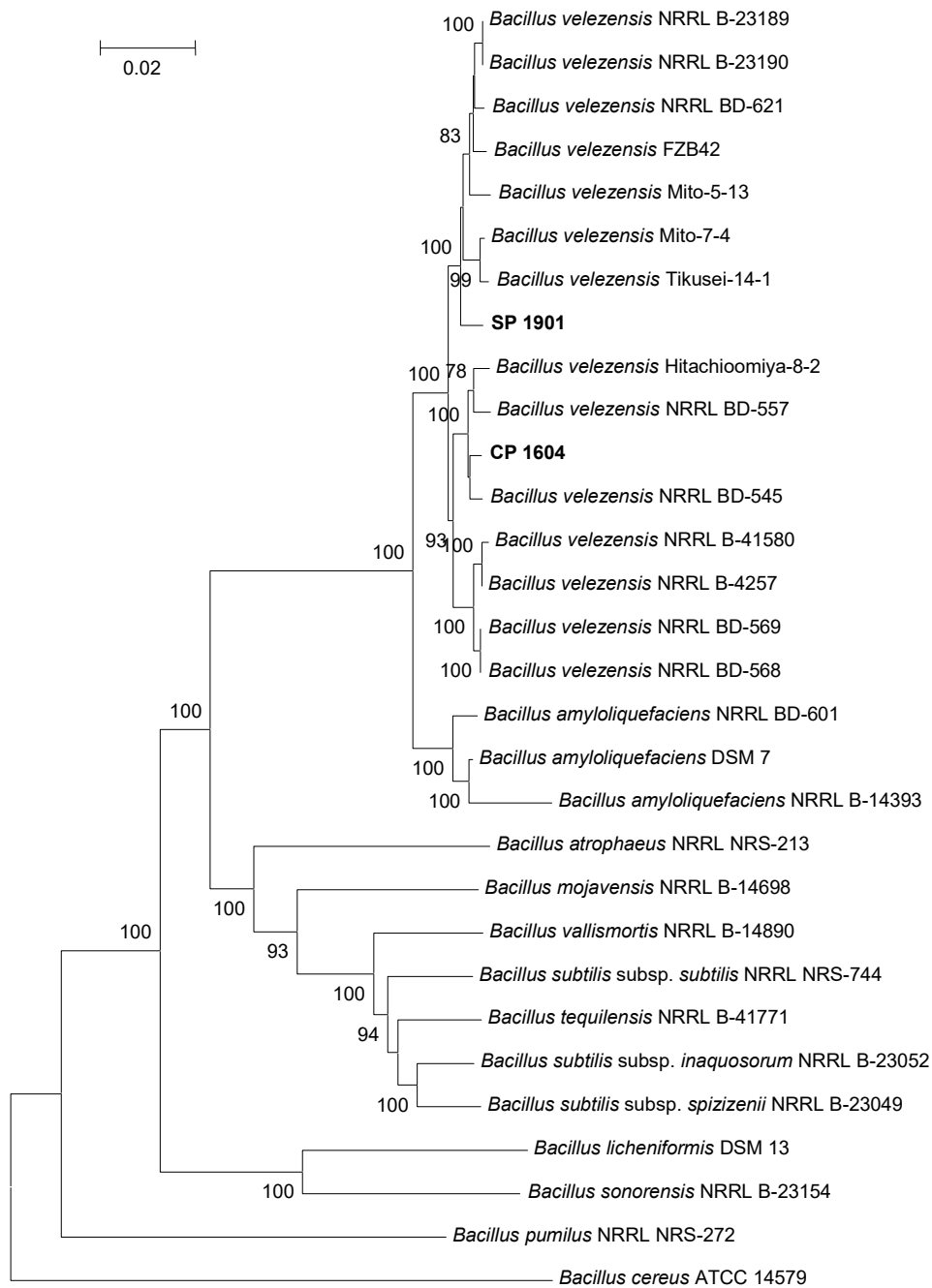
về khả năng sinh các chất hoạt động bề mặt và lipopeptide kháng khuẩn (Ruiz - Garcia *et al.*, 2005). Năm 2010, Madhaiyan *et al.* đã mô tả loài *B. methylotrophicus* phân lập từ đất vùng rẫy lúa ở Hàn Quốc. Bên cạnh khả năng sử dụng methanol,

triethylamine và ethanol như nguồn carbon, loài vi khuẩn này còn có khả năng sinh các chất như IAA và ACC deaminase kích thích cây trồng phát triển (Madhaiyan *et al.*, 2010). Năm 2011, Boriss *et al.* đã phát hiện ra một nhóm chủng vi khuẩn gần gũi với chủng *B. amyloliquefaciens* FZB42 có khả năng sống nội cộng sinh trong rễ *Arabidopsis* trong khi đó nhóm chủng vi khuẩn gần gũi với chủng *B. amyloliquefaciens* DSM 7 không có khả năng này. Dựa trên kết quả lai DNA *B. amyloliquefaciens* được tách ra thành 2 loài phụ là *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* và *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* (Boriss *et al.*, 2011). Gần đây, Chung *et al.* đã mô tả một loài *B. oryzicola* sống nội cộng sinh trong rễ lúa có khả năng kích thích thực vật phát triển, sinh chất kháng nấm và vi khuẩn gây bệnh cây và có khả năng tăng cường hệ miễn dịch

của thực vật (Chung *et al.*, 2015). Do sở hữu nhiều đặc tính có lợi quan trọng cho cây trồng, các loài vi khuẩn kể trên đã nhận được nhiều quan tâm của các nhà nghiên cứu; hơn 30 chủng phân lập từ các vùng sinh thái khác nhau đã được giải trình tự toàn bộ genome để tìm hiểu về mối tương tác giữa vi khuẩn và vật chủ sống nội cộng sinh (Dunlap *et al.*, 2015). Song song với đó, hệ thống phân loại của các loài vi khuẩn kể trên cũng được kiểm chứng lại. So sánh in silico toàn bộ hệ genome cho thấy cả bốn loài vi khuẩn kể trên đều có hệ số tương đồng DNA-DNA lớn hơn 84% (khác với chỉ số lai DNA-DNA thực nghiệm trước đây). Chính vì vậy, *B. methylotrophicus*, *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* và *B. oryzicola* được chỉ định lại về tên loài được đặt ban đầu là *B. velezensis* (Dunlap *et al.*, 2015).



**Hình 2.** Sơ đồ cây về mối tương đồng kiểu gen xây dựng bằng kỹ thuật dấu vân tay rep - PCR sử dụng mồi GTG<sub>5</sub> của các chủng *B. velezensis* phân lập tại các vùng sinh thái khác nhau của Việt Nam.



**Hình 3.** Mối quan hệ giữa chủng SP 1901 và CP 1604 trên cây phát sinh chủng loại và các loài vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus subtilis* xây dựng dựa trên đoạn DNA 5.547 bp kết nối từ 6 gen *gyrA*, *rpoB*, *purH*, *polC*, *groEL* và 16S rRNA.



Trong số các loài vi khuẩn ứng dụng làm chế phẩm phòng trừ các loại bệnh hại cây trồng, *Bacillus* được chú trọng nghiên cứu vì vi khuẩn có khả năng tạo nội bào tử để có thể tồn tại lâu trong chế phẩm ở điều kiện bảo quản thường. Nhiều chủng *B. velezensis* dưới tên gọi là *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* hoặc *B. amyloliquefaciens* đã được công bố về khả năng đối kháng với các loại vi sinh vật gây bệnh cây trồng như chủng L-H15 đối kháng nấm *F. oxysporum* (Han *et al.*, 2015); chủng S76-3 đối kháng nấm *F. graminearum* (Gong *et al.*, 2015); chủng GR53 đối kháng nấm *R. solani* (Kang *et al.*, 2015); chủng CNU114001 đối kháng với 12 loại nấm gây bệnh cây là *Alternaria panax*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *C. orbiculare*, *Corynespora cassicola*, *F. oxysporum*, *Penicillium digitatum*, *P. capsici*, *R. solani*, *Stemphylium lycopersici*, *Pyricularia grisea* và *Sclerotinia sclerotiorum* (Ji *et al.*, 2013). Nhiều chủng *B. velezensis* có khả năng phòng trừ và giảm thiểu bệnh cho cây trồng khi thử nghiệm trong nhà kính như dịch nuôi cấy và dịch tế bào của chủng NJZJSB3 đã bảo vệ lá cây cải dầu chống lại hoàn toàn sự xâm nhiễm của nấm *Sclerotinia sclerotiorum* (Wu *et al.*, 2014); lạc xử lý với chủng BZ6-1 đã giảm được tỷ lệ nhiễm bệnh héo xanh do *R. solanacearum* từ 84,5% xuống 12,1% (Wang *et al.*, 2014). Hơn nữa, khi bổ sung vi khuẩn *B. velezensis* vào phân hữu cơ làm giảm đáng kể tỷ lệ nhiễm bệnh của cây trồng như chủng S20 làm giảm tỷ lệ nhiễm bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên cây cà tím từ 56% xuống còn 22% (Chen *et al.*, 2014); chủng HR62 làm giảm tỷ lệ nhiễm bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* trên cây cà chua xuống 65% (Huang *et al.*, 2014).

Phân tích hệ genome của *B. velezensis* cho thấy hơn 9% hệ genome của vi khuẩn chứa các gen mã hóa các chất kháng nấm và kháng khuẩn (Chowdhury *et al.*, 2015). Đa số các chất này có bản chất là peptide tổng hợp không qua ribosome như bacylisin, lipopeptide (surfactin, fengycin, iturin và bacillomycin) và polyketide (difficidin, bacillaene và macrolactin). Giống như các chủng đã công bố, 15 chủng *B. velezensis* phân lập tại các vùng sinh thái khác nhau ở Việt Nam đều có khả năng sản sinh chất kháng nấm và vi khuẩn gây bệnh cây. Bên cạnh đó, các chủng này đều có khả năng phân giải phosphate khó tan và một số chủng như CĐH 0101 và SP 10901 có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng IAA khá rõ ràng trong môi trường nuôi cấy (Bảng 4). Các đặc tính có lợi cho cây trồng như này cũng đã được công bố trên một số chủng *B. velezensis*

(Madhaiyan *et al.*, 2010; Idris *et al.*, 2004). Ngoài ra, tất cả các chủng *B. velezensis* đều sinh các enzyme thủy phân ngoại bào là lipase, protease, amylase, CMCase, xylanase và chitinase. Đây là những đặc tính quan trọng nhằm thúc đẩy quá trình phân hủy các chất hữu cơ và là cơ sở để lựa chọn các chủng vi khuẩn này ứng dụng trong sản xuất chế phẩm ủ phân compost hoặc bổ sung chủng với phân bón hữu cơ nhằm thúc đẩy sự phát triển của cây trồng.

Tổ hợp kết quả của kỹ thuật rep - PCR sử dụng 2 loại môi ERIC và GTG<sub>5</sub> cho thấy có 14 loại kiểu gen trong số 15 chủng *B. velezensis* nghiên cứu. Chỉ có duy nhất 2 chủng CĐH 0101 và CĐH 0102 phân lập từ 1 mẫu đất có kiểu gen tương đồng nhau. Kết quả rep - PCR được kiểm chuẩn bằng kỹ thuật giải trình tự đa gen khi 2 chủng SP 1901 và CĐH 1604 phân tách rõ ràng trên cây phát sinh chủng loại. Điều đó chứng tỏ có sự đa dạng rất cao về mặt di truyền của các chủng *B. velezensis* phân lập ở các vùng sinh thái khác nhau ở Việt Nam. Nghiên cứu ngoài thực nghiệm để đánh giá khả năng thúc đẩy sự sinh trưởng, phát triển và tạo năng suất cho cây trồng là việc làm cần thiết nhằm tìm kiếm các chủng *B. velezensis* hữu ích sử dụng trong sản xuất chế phẩm phân bón hữu cơ sinh học.

## KẾT LUẬN

15 chủng *B. velezensis* phân lập được từ các vùng sinh thái khác nhau của Việt Nam thể hiện sự đa dạng cao về mặt di truyền. Các chủng này đều có khả năng sinh tổng hợp các chất kháng nấm và vi khuẩn gây hại cây trồng. Ngoài ra, các chủng này còn có tiềm năng sử dụng trong sản xuất phân bón hữu cơ vi sinh thông qua khả năng phân giải phosphate khó tan, sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật IAA và sản sinh hàng loạt các enzyme thủy phân như lipase, protease, amylase, CMCase, xylanase và chitinase. Các chủng nghiên cứu có tiềm năng cao trong ứng dụng sản xuất chế phẩm sinh học dùng trong nông nghiệp.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được tài trợ từ đề tài mã số QG.13.12 của Đại học Quốc gia Hà Nội.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bhardwaj D, Ansari MW, Sahoo RK, Tuteja N (2014) Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microb Cell Fact* 13: 66.

- Borriss R, Chen XH, Rueckert C, Blom J, Becker A, Baumgarth B, Fan B, Pukall R, Schumann P, Sproer C, Junge H, Vater J, Puhler A, Klenk HP (2011) Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7T and FZB42T: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:1786-1801.
- Chen D, Liu X, Li C, Tian W, Shen Q, Shen B (2014) Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* S20 and its application in control of eggplant bacterial wilt. *J Environ Manage* 137:120-127.
- Chowdhury SP, Hartmann A, Gao X, Borriss R (2015) Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - a review. *Front Microbiol* 6:780.
- Chung EJ, Hossain MT, Khan A, Kim KH, Jeon CO, Chung YR (2015) *Bacillus oryzae* sp. nov., an Endophytic Bacterium Isolated from the Roots of Rice with Antimicrobial, Plant Growth Promoting, and Systemic Resistance Inducing Activities in Rice. *Plant Pathol J* 31:152-164.
- Dunlap CA, Kim SJ, Kwon SW, Rooney AP (2015) *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzae*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *Int J Syst Evol Microbiol*.
- Fravel DR (2005) Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu Rev Phytopathol* 43: 337-359.
- Freitas DB, Reis MP, Lima-Bittencourt CI, Costa PS, Assis PS, Chartone-Souza E, Nascimento AM (2008) Genotypic and phenotypic diversity of *Bacillus* spp. isolated from steel plant waste. *BMC Research Notes* 1: 92-103
- Gabor EM, Vreis EJ, Janssen DB (2003) Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiol Ecol* 44: 153-163.
- Glickmann E, Dessaux Y (1995) A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 61: 793-796.
- Gong AD, Li HP, Yuan QS, Song XS, Yao W, He WJ, Zhang JB, Liao YC (2015) Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. *PLoS One* 10:e0116871.
- Han Y, Zhang B, Shen Q, You C, Yu Y, Li P, Shang Q (2015) Purification and Identification of Two Antifungal Cyclic Peptides Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* L-H15. *Appl Biochem Biotechnol* 176: 2202-2212.
- Holman WIM (1943) A new technique for the determination of phosphorus by the molybdenum blue method. *Biochem* 37: 256-259.
- Huang J, Wei Z, Tan S, Mei X, Shen Q, Xu Y (2014) Suppression of bacterial wilt of tomato by bioorganic fertilizer made from the antibacterial compound producing strain *Bacillus amyloliquefaciens* HR62. *J Agric Food Chem* 62:10708-10716.
- Ji SH, Paul NC, Deng JX, Kim YS, Yun BS, Yu SH (2013) Biocontrol Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against Fungal Plant Diseases. *Mycobiology* 41: 234-242.
- Kang SM, Radhakrishnan R, Lee IJ (2015) *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* GR53, a potent biocontrol agent resists Rhizoctonia disease on Chinese cabbage through hormonal and antioxidants regulation. *World J Microbiol Biotechnol* 31: 1517-1527.
- Li SB, Xu SR, Zhang RN, Liu Y, Zhou RC (2015) The antibiosis action and rice induced resistance, mediated by a lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* B014, in controlling rice disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *J Microbiol Biotechnol*.
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Kwon SW, Sa TM (2010) *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 2490-2495.
- Parte AC (2014) LPSN--list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Res* 42: D613-616.
- Rooney AP, Price NP, Ehrhardt C, Swezey JL, Bannan JD (2009) Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 2429-2436.
- Ruiz-Garcia C, Bejar V, Martinez-Checa F, Llamas I, Quesada E (2005) *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 191-195.
- Shao J, Li S, Zhang N, Cui X, Zhou X, Zhang G, Shen Q, Zhang R (2015) Analysis and cloning of the synthetic pathway of the phytohormone indole-3-acetic acid in the plant-beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Microb Cell Fact* 14:130.
- Van DTT, Linh BNH, Hop DV, Phuong DM, Trung TT (2014) Identification of antibiotic-producing *Bacillus sensu lato* isolated from national parks of Hoang Lien and Phu Quoc in Vietnam. *J Viet Env* 6: 77-83.
- Wang X, Liang G (2014) Control efficacy of an endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain BZ6-1 against peanut bacterial Wilt, *Ralstonia solanacearum*. *Biomed Res Int* 2014:465435.

Wu L, Wu H, Chen L, Yu X, Borriss R, Gao X (2015) Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Sci Rep* 5: 12975.

Wu Y, Yuan J, Raza W, Shen Q, Huang Q (2014) Biocontrol traits and antagonistic potential of *Bacillus amyloliquefaciens* strain NJJSB3 against *Sclerotinia sclerotiorum*, a causal agent of canola stem rot. *J Microbiol Biotechnol* 24: 1327-1336.

## POTENTIAL APPLICATION ON PREPARATION FOR BIO-FERTILIZER USING *BACILLUS VELEZENSIS* STRAINS ISOLATED FROM VARIOUS REGIONS IN VIETNAM

Trinh Thanh Trung<sup>1</sup>, Dinh Thi Tuyet Van<sup>1</sup>, Nguyen Phuong Lien<sup>2</sup>, Dao Thi Luong<sup>1</sup>, Duong Van Hop<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Microbiology and Biotechnology, Vietnam National University, Hanoi

<sup>2</sup>National Institute for Control of Vaccine and Biologicals

### SUMMARY

*Bacillus velezensis* is a species belonging to the bacterial group of *B. subtilis* species complex. Due to various beneficial traits to plants, the bacterium has been received considerable attention for application in disease control and crop productivity. In this study, we isolated 15 *B. velezensis* strains from various soils collected in regions of Hoang Lien, Cuc Phuong, Bach Ma, Chu Yang Sin and Con Dao. All of the strains demonstrated antagonistic activity against phytopathogenic fungi of *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium hydrophilum*, *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici* and rice blight bacterium *Xanthomonas oryzae*. Those strains were capable of solubilizing  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  and producing plant growth hormone of indole acetic acid (IAA). Moreover, those strains produced a series of extracellular hydrolytic enzymes such as lipase, protease, amylase, CMCase, xylanase and chitinase. Analysis of genetic diversity based on rep - PCR fingerprinting technique showed that primer ERIC had greater discrimination than primer GTG<sub>5</sub>. Number of DNA banding patterns generated by primer ERIC and GTG<sub>5</sub> were 8 and 13, respectively. Combination of DNA banding patterns of both primers showed 14 different genotypes among 15 *B. velezensis* strains. Using multilocus sequencing technique, genetic diversity was confirmed by a clear discrimination of strain CP 1604 and SP 1901 in two different clusters on phylogenetic tree. Due to the possession of many beneficial traits to plant growth, pesticide protection and production of many hydrolytic enzymes, the *B. velezensis* strains in this study have potential application on preparation of bio-fertilizer. Further investigation is needed in order to select an appropriate strain for this application.

**Keywords:** *Bacillus velezensis*, *Bacillus subtilis*, bio-fertilizer, biocontrol, plant growth promoting bacteria