

PHÂN LẬP VÀ ĐẶC TÍNH CỦA NHỮNG ĐÒNG VI KHUẨN NỘI SINH TRONG MỘT SỐ CÂY CỎ CHĂN NUÔI

Nguyễn Thị Thu Hà, Hà Thanh Toàn, Cao Ngọc Diệp

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Đại học Cần Thơ

TÓM TẮT

Bốn loài cỏ sử dụng trong chăn nuôi mọc hoang dại (cỏ voi, cỏ sả, cỏ lông tây và cỏ mồm) được thu thập từ ba tỉnh (Vĩnh Long, Đồng Tháp và Cần Thơ) ở đồng bằng sông Cửu Long để phân lập, nhận diện, khảo sát một đặc tính của các dòng vi khuẩn nội sinh, xác định gen *nifH* ở những dòng vi khuẩn nội sinh cố định đạm và giải trình tự một số dòng vi khuẩn nội sinh tốt. Kết quả là phân lập được 71 dòng vi khuẩn trong các loài cỏ trên. Trong đó, có 42 dòng được xác định là vi khuẩn nội sinh bằng kỹ thuật PCR 16S rDNA với cặp môi đặc trưng. Sử dụng các phép thử sinh hóa đã xác định được 13/42 dòng vi khuẩn nội sinh có đủ ba đặc tính tốt (cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA cao). Tuy nhiên, 7/13 dòng vi khuẩn nội sinh (A5, A6, A13, A14, A16, A18 và A25) có đủ 3 đặc tính tốt được phân lập trên môi trường Nfb là thuộc loài *Azospirillum lipoferum*, 2 dòng G4 và G6 được phân lập trên môi trường LGI có tỷ lệ tương đồng của gen *nifH* với loài *Klebsiella pneumoniae* khoảng 93,8% và 94,3%, tỷ lệ tương đồng gen *nifH* của dòng H4 được phân lập trên môi trường RMR với loài *Micrococcus* sp. Y70 là 97,5%. Ba dòng vi khuẩn H4, G4 và A18 có đặc tính tốt nhất, có thể đưa vào sản xuất phân sinh học.

Từ khóa: *Azospirillum lipoferum*, cố định đạm sinh học, hòa tan lân, IAA, vi khuẩn nội sinh

ĐẶT VẤN ĐỀ

Họ Hòa thảo (Poaceae) là một họ quan trọng của hệ thực vật thế giới với khoảng 700 chi, 10.000 loài phân bố rất rộng rãi trên toàn bộ bề mặt trái đất. Đó là họ của những cây lương thực chính của loài người và những cây thức ăn chủ yếu của gia súc, nhất là của các gia súc lớn (Nguyễn Đăng Khôi, Dương Hữu Thời, 1981). Rất nhiều loài địa phương và nhập nội, mọc tự nhiên hoặc đã được trồng, có giá trị làm thức ăn cho vật nuôi. Cỏ trồng bao gồm các loại như cỏ voi (*Pennisetum purpureum*), cỏ sả (*Panicum maximum*) cỏ stylo (*Stylosanthes hamata*), cỏ xu dâng (*Sorghum sudanense*), cỏ Mọc Châu (*Paspalum urvillei*), cỏ lông Para (*Brachiaria mutica*), cỏ Ruzi (*Brachiaria ruzizienis*),... Mặc dù các loại cỏ trồng trong chăn nuôi ít được quan tâm chăm sóc như nhiều loại cây trồng khác nhưng chúng lại cho năng suất và giá trị dinh dưỡng cao, kháng được sâu bệnh và thích nghi với nhiều loại đất khác nhau, đó là nhờ sự có mặt của các vi khuẩn nội sinh (endophytic bacteria) bên trong cây. 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), có thể giúp loại bỏ các chất gây ô nhiễm (Rosenblueth, 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 mặn cảm với mầm bệnh và sự thay đổi của thời tiết gây tổn hại cho cây (Xu *et al.*, 1998). Tuy nhiên, nguồn vi khuẩn nội sinh có ích trong các cây cỏ chăn nuôi ở Việt Nam chưa được nghiên cứu tường tận. Sự phát hiện các vi sinh vật nội sinh có ích này ở những cơ quan nghiên cứu trên thế giới đã mở ra cho chúng ta một viễn cảnh tốt đẹp của sự vận dụng những vi sinh vật nội sinh vào việc tăng cường các sản phẩm nông nghiệp nhằm hạn chế việc sử dụng thuốc trừ sâu, phân bón hóa học cung cấp cho cây trồng, góp phần xây dựng một nền nông nghiệp bền vững, xanh và sạch. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập, 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.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các loại cỏ voi, cỏ sả, cỏ lông tây, cỏ mồm được thu mẫu từ huyện Măng Thít, (Vĩnh Long); thành

phổ Cao Lãnh (Đồng Tháp) và Trung tâm giống Nông nghiệp huyện Cờ Đỏ (Cần Thơ). Vi khuẩn đối chứng dương: *Azospirillum lipoferum* do trường Đại học Chiêng Mai, Thái Lan cung cấp.

Phân lập vi khuẩn

Để loại trừ các vi sinh vật có khả năng còn bám ở bề mặt mẫu (thân, rễ, lá) 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_2O_2) 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 μ l 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 24 h 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 ống nghiệm chứa 10 ml nước cất vô trùng và nghiền mịn mẫu bằng đĩa thủy tinh đã khử trùng trên đèn cồn. Lấy 200 μ l dịch mẫu nghiền cho vào các ống nghiệm chứa 3 ml môi trường LGI (Lavacante, Dobereiner, 1988), Nfb (Krieg, Döbereiner, 1984) và RMR bán đặc (Elbeltagy *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 RMR 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 RMR lần lượt cấy chuyển sang các đĩa môi trường LGI, Nfb và RMR 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 trong ừng để trữ ở 4°C và được xem như là một dòng.

Khi cấy chuyển vi khuẩn trên đĩa môi trường phân lập đặc ta 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 bia 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.

Tách chiết DNA vi khuẩn

Vi khuẩn được nuôi trong ống nghiệm chứa môi trường LB lỏng và ủ qua đêm ở 30°C. Dung dịch huyền phù vi khuẩn được chuyển sang ống nghiệm 2 ml và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút để phá vỡ vỏ tế bào và tủa vi khuẩn. Dung dịch môi trường nuôi vi khuẩn trong ống nghiệm được loại bỏ và thêm 250 μ l dung dịch TE, pH 8 và đánh tan sinh khối. Sau đó, cho thêm 50 μ l dung dịch 10% SDS để loại bỏ protein của vi khuẩn. Bổ sung 5 μ l protein K (10 mg/ml) và ủ ở 65°C trong 20 phút (cứ 5 phút đảo ngược ống nghiệm 1 lần) để loại RNA ra khỏi DNA; Thêm 400 μ l 10% CTAB/ 0,7 M NaCl và ủ tiếp ở 65°C trong 20 phút. Bổ sung 600 μ l chloroform: isoamyl alcohol vào ống nghiệm và lắc đều. Sau đó ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút. Tiếp đến, chuyển phần dịch trong bên trên sang ống nghiệm mới, thêm 1 ml isopropanol ống nghiệm và lắc đều, ủ ở -20°C ít nhất 30 phút.

Phản ứng PCR

Để nhận diện vi khuẩn sống nội sinh trong cây, sử dụng các đoạn mồi 16S rDNA được thiết kế (Zinniel *et al.*, 2002) với trình tự như sau:

Mồi 1: p515FPL: 5'- GTG CCA GCA GCC GCG GTA A -3';

Mồi 2: p13B: 5'- AGG CCC GGG AAC GTA TTC AC -3';

Mồi 3: PCR-1: 5'- AGT TTG ATC CTG GCT CAG GA -3'.

Phản ứng PCR: 94°C/4 phút; 35 chu kỳ: (94°C/45 giây, 55°C/45 giây, 72°C/1 phút); 72°C/7 phút.

Để xác định gen *nifH*

Vi khuẩn được nuôi trong môi trường Burk's không có N đặc (Park *et al.*, 2005) và thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi chuyên biệt quy định gen *nifH* của vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* có trình tự như sau:

Mồi xuôi: 5'- GTA AAT CCA CCA CCT CCC -3';

Mồi ngược: 5'- TGT AGA TTT CCT GGG CCT -3'.

Phản ứng PCR: 95°C/5 phút; 35 chu kỳ: (95°C/45

giây, 62°C/45 giây, 72°C/1 phút); 72°C/10 phút.

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.

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.

Giải trình tự DNA

Sử dụng đoạn mồi xuôi (forward) chuyên biệt thiết kế dựa trên trình tự gen *nifH* cho băng DNA trên agarose 1,2% gel khoảng 450 bp đã trình bày ở phần trên để khuếch đại đoạn DNA của các dòng vi khuẩn H4, G4 và G6.

Phản ứng PCR: 95°C/1 phút; 35 chu kỳ: (95°C/1 phút, 49°C/1 phút, 72°C/1 phút); 72°C/10 phút.

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 tự động ABI 3130. Sử dụng chương trình BLAST N và Bioedit 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).

KẾT QUẢ

Phân lập vi khuẩn nội sinh

Vi khuẩn nội sinh ở các loài cỏ chăn nuôi rất đa dạng, chúng có thể phân tán lên cả thân và lá. Từ các mẫu thân, rễ và lá của một số cây cỏ chăn nuôi (cỏ voi, cỏ sả, cỏ sữa, cỏ lông tây và cỏ mồm) thu ở các tỉnh Vĩnh Long, Cần Thơ và Đồng Tháp, 71 dòng vi khuẩn khác nhau đã được phân lập: 29 dòng trên môi trường nuôi Nfb (A1 đến A29), 24 dòng trên môi trường RMR (H1 đến H24) và 18 dòng trên môi trường LGI (G1 đến G18).

Số dòng vi khuẩn được phân lập từ rễ là 30 dòng (8: LGI, 11: Nfb và 11: RMR; chiếm tỷ lệ 42,3%); từ thân là 28 dòng (8: LGI, 12: Nfb và 8: RMR; 39,4%) và từ lá là 13 dòng (2: LGI, 6: Nfb và 5: RMR; 18,3%). Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Rosenblueth, Martínez-Romero (2006).

Mười tám dòng vi khuẩn được phân lập trên LGI chủ yếu nội sinh trong rễ và thân, chỉ có 2 dòng ở lá. Trong 29 dòng vi khuẩn được phân lập trên Nfb, có 6 dòng vi khuẩn nội sinh trong lá. Trong 24 dòng vi khuẩn xuất hiện trên RMR có 5 dòng vi khuẩn nội sinh trong lá.

Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào

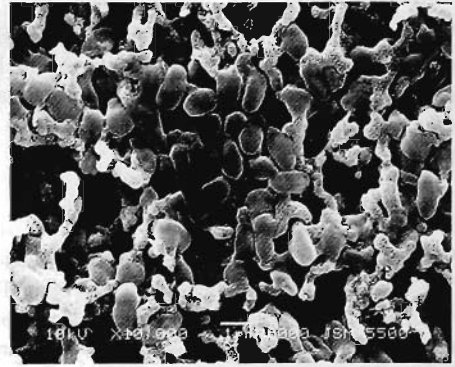
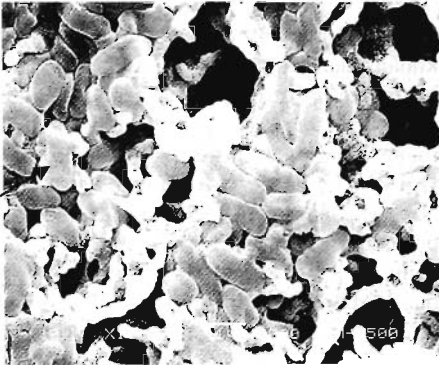
Sau 3 ngày ủ trong các ống nghiệm, các dòng vi khuẩn phân lập được đều có chung đặc tính là sinh trưởng và phát triển ở điều kiện vi hiếu khí trong các môi trường bán đặc, chúng phát triển thành lớp màng mỏng cách mặt môi trường nuôi khoảng 0,5 - 1 cm. Đối với các dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường Nfb, khi tăng trưởng chúng làm biến đổi màu của bromothymol blue nên môi trường chuyển từ màu xanh lá cây (trung tính, pH 6,8) sang màu xanh dương đậm của môi trường kiềm. Số dòng vi khuẩn có khuẩn lạc màu trắng sữa là 36, có khuẩn lạc trắng hơi vàng là 16 và trắng đục là 11; số còn lại có màu trắng trong, trắng có ánh xạ cù, trắng hơi đỏ và trắng nâu. Hầu hết các vi khuẩn phát triển trên môi trường LGI đều có khuẩn lạc màu trắng hơi vàng. Một số khuẩn lạc khi được cấy trữ lâu ngày có hiện tượng đổi màu, chuyển từ màu trắng sữa sang màu vàng hay vàng nâu do ăn màu của bromothymol blue có trong môi trường Nfb. Sáu mươi lăm dòng có dạng khuẩn lạc tròn (91,6%) và 5 dòng có dạng khuẩn lạc không đều (7%), đặc biệt có 1 khuẩn lạc có dạng lan (1,4%). Số dòng có khuẩn lạc với độ nổi mô (convex) là 60 dòng (84,5%); với độ nổi lồi (raised elevations) là 9 dòng (12,7%); số còn lại có khuẩn lạc có độ nổi phẳng (flat elevations) (2,8%). Sáu mươi tư dòng có khuẩn lạc bia nguyên (90%) và 7 dòng là có bia răng cưa (10%). Các dòng vi khuẩn có khuẩn lạc với màu trắng trong và ánh xạ cù thì đồng thời có bia răng cưa và có dạng không đều. Đường kính khuẩn lạc của 71 dòng vi khuẩn đã phân lập dao động từ 0,3 - 4,2 mm sau khi cấy trên đĩa môi trường đặc và ủ trong tủ ở 30°C trong 24 h.

Sáu mươi tám dòng vi khuẩn chuyển động (96%) do có chiên mao ở đỉnh (Hình 1) và 3 dòng không chuyển động (4%). Sáu mươi tám dòng vi khuẩn có dạng hình que ngắn (96%) và 3 dòng vi khuẩn có dạng que dài (4%) (Hình 1).

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

Khi phân tích PCR với 3 đoạn mồi 16S rDNA (p515FPL, p-13B và PCR-1) để nhận diện các dòng vi khuẩn đã phân lập là vi khuẩn nội sinh, 42 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 và đồng tác giả (2002), 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 1. Dòng vi khuẩn A18 (môi trường Nfb) và dòng vi khuẩn H4 (môi trường RMR) với độ phóng đại 10.000 lần.

Một số đặc tính của một số dòng vi khuẩn nội sinh (32/42)

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

Ba mươi hai dòng vi khuẩn nội sinh, nuôi trong các môi trường lỏng LGI (11 dòng), Nfb (13 dòng) và RMR (8 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 số 8 dòng vi khuẩn được nuôi trong môi trường RMR, dòng H4 có khả năng tổng hợp IAA cao nhất (39,64 ppm) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng còn lại. Các dòng H3, H5 và H8 tổng hợp được lượng IAA 20 - 21,63 ppm; không có sự khác biệt về mặt thống kê. Khả năng tổng hợp IAA của dòng H7 là thấp nhất (14,24 ppm).

Với 11 dòng vi khuẩn được nuôi ở môi trường LGI các dòng G1, G8, G9 sản xuất lượng IAA thấp nhất (khoảng 8,50 - 8,85 ppm); sự khác biệt của 3 dòng này không có ý nghĩa thống kê. Dòng G4 cho lượng IAA cao nhất (37,75 ppm); khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng còn lại và dòng G3 cũng tổng hợp được lượng IAA khá cao với 21,82 ppm.

Trong các dòng vi khuẩn được chọn nuôi trong môi trường Nfb, dòng A25 có khả năng tổng hợp IAA cao nhất (33,84 ppm); khác biệt có ý nghĩa thống kê. Hai dòng A18 và A20 sản xuất được lượng

Trong số 42 dòng vi khuẩn nội sinh đã nhận diện, có 11 dòng được phân lập trên môi trường LGI (G1-G11), 8 dòng được phân lập trên môi trường RMR (H1-H8) và 23 dòng còn lại được phân lập trên môi trường Nfb (A1, A3-A8, A10-A14, A16-A20, A22-A25, A27-A28).

IAA tương đối cao là 27,20 ppm và 31,67 ppm; không khác biệt thống kê ở ngày 2 và ngày 4 nhưng khác biệt vào ngày 6 và ngày 8 sau khi nuôi. Lượng IAA được tạo ra ít nhất là dòng A3, chỉ có 5,84 ppm (Bảng 1).

Đa số các dòng vi khuẩn cho lượng IAA tăng dần theo thời gian và cao nhất vào ngày thứ 8 sau khi nuôi (G11, H3, H7, H8, A3, A5, A6, A7, A13, A14, A20 và A25). Tuy nhiên, ở một số dòng tăng trưởng nhanh lại cho lượng IAA cao nhất vào ngày thứ 2 và ngày thứ 4 sau khi nuôi (G3, G4, H4, H5 và A18); sau đó lượng IAA tổng hợp được giảm dần.

Khả năng hòa tan lân khó tan

Tất cả 32 dòng vi khuẩn được khảo sát đều có khả năng hòa tan lân khó tan.

Dòng H1 có khả năng hòa lân cao nhất (361,36 mg/l); khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng còn lại và dòng H8 có khả năng hòa tan lân kém nhất (59,84 mg P₂O₅/l).

Với môi trường LGI, hầu hết các dòng vi khuẩn này đều có khả năng hòa tan lân tốt trừ dòng G3 kém nhất (26,63 mg/l P₂O₅). Hai dòng G1 và G2 có khả năng hòa tan lân tốt (278,40 - 283,33 mg P₂O₅/l); khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng còn lại.

Từ môi trường Nfb, dòng Á3 là có khả năng hòa tan lân cao nhất vào ngày thứ 5 sau khi nuôi, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng còn lại. Dòng A18 khả năng hòa tan lân cũng khá cao (241,86 mg P₂O₅/l).

Tất cả 32 dòng vi khuẩn nội sinh được khảo sát đều có khả năng hòa tan lân và tổng hợp kích thích tố IAA. Tuy nhiên, 2 đặc tính này ở một số dòng vi khuẩn không đều nhau. Các dòng G1, G2 và A3 có khả năng hòa tan lân tốt nhưng khả năng tổng hợp IAA thấp; ngược lại các dòng H2, H8 và G3 có khả năng tổng hợp IAA cao nhưng khả năng hòa tan lân kém.

Các dòng vi khuẩn có cả 2 đặc tính tổng hợp kích thích tố sinh trưởng IAA và hòa tan lân khó tan tương đối khá tốt là những dòng H1, H3, H4 và H7 (RMR); G4, G6, G7, G10 và G11 (LGI); A5, A6, A7, A12, A13, A14, A16, A17, A18, A20 và A25 (Nfb) (Bảng 1). Trong đó, các dòng tốt nhất được phân lập trên 3 môi trường này là H4, G4 và A18.

Khả năng cố định đạm

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

Các dòng vi khuẩn H1, H3, H4 và H7 (RMR); G4, G6, G7, G10 và G11 (LGI); và A5, A6, A7, A12, A13, A14, A16, A17, A18, A20 và A25 (Nfb) được

cấy trên môi trường Burk không đạm đặc ở 30°C.

Mười ba dòng vi khuẩn phát triển được ngay sau khi ủ 1 ngày, còn lại 7 dòng chưa phát triển (H1, H3, G7, G10, G11, A17 và A20). Đến ngày thứ 2, có thêm 3 dòng vi khuẩn phát triển được trên môi trường nhưng rất yếu (H3, G11 và A16). Như vậy có tất cả 17 dòng vi khuẩn phát triển được trên môi trường không đạm và còn lại 3 dòng là không phát triển. Các dòng H4, G4, A5, A14, A18 và A25 phát triển mạnh nhất nhưng các dòng H3, H4, A18, A16, A6, G4 và H7 phóng thích được nhiều ammonium trong môi trường so với các dòng vi khuẩn còn lại.

Nhận diện vi khuẩn cố định đạm gen nifH

Các dòng vi khuẩn H3, H4, H7 (RMR) và G4, G6, G11 (LGI) với cặp mồi *nifH* (Hình 2) đều cho băng DNA *nifH* có kích thước khoảng 450 bp nên chúng có thể là các dòng vi khuẩn cố định đạm nội sinh.

Bây dòng vi khuẩn có băng DNA ở vị trí 400 bp giống như dòng vi khuẩn đối chứng dương *Azospirillum lipoferum* (Thái Lan) là các dòng A5, A6, A13, A14, A16, A18 và A25 (Hình 3), phù hợp với vị trí gen cố định đạm *nifH* được nhân lên bởi cặp mồi *Az. lipoferum*. Như vậy, các dòng vi khuẩn này có thể thuộc loài *Az. lipoferum* và có khả năng cố định đạm. Hai dòng còn lại A7 và A12 không cho băng DNA tương ứng với cặp mồi chuyên biệt.

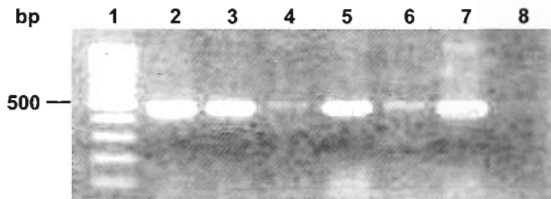
Bảng 1. Khả năng hòa tan lân và sinh tổng hợp IAA của các dòng vi khuẩn nội sinh.

Dòng Vi khuẩn	Lân hòa tan (mg P ₂ O ₅ /l)	IAA (mg/l)	Dòng Vi khuẩn	Lân hòa tan (mg P ₂ O ₅ /l)	IAA (mg/l)	Dòng Vi khuẩn	Lân hòa tan (mg P ₂ O ₅ /l)	IAA (mg/l)
A3	373,33	5,84	G1	283,33	8,51	H1	361,36	17,78
A5	134,72	10,24	G2	278,40	8,85	H2	105,14	18,65
A6	162,25	8,96	G3	26,63	21,82	H3	277,95	20,11
A7	122,78	14,42	G4	211,10	37,85	H4	277,75	39,64
A10	149,62	11,25	G5	107,92	9,68	H5	149,89	21,63
A12	133,77	11,25	G6	189,70	12,74	H6	195,47	16,82
A13	171,83	13,97	G7	247,84	11,79	H7	272,35	14,24
A14	138,91	11,00	G8	100,79	8,81	H8	59,84	20,35
A16	145,11	14,97	G9	167,11	8,84			
A17	153,02	13,75	G10	162,54	13,09			
A18	241,86	27,20	G11	237,48	11,62			
A20	143,95	31,67						
A25	121,77	33,84						
C.V	30,6%	27,9%		18,8%	41,4%		18,1%	23,1%
LSD.01	97,3	8,44		66,1	11,1		75,9	9,7

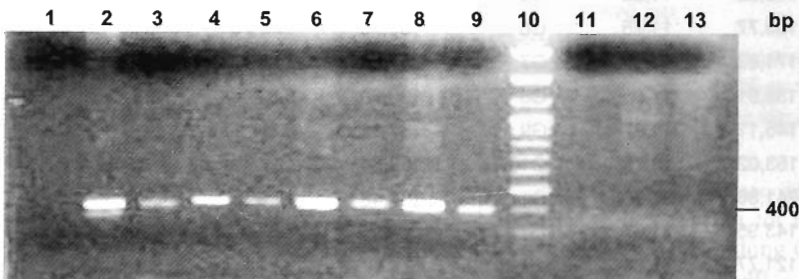
Bảng 2. Khả năng phát triển của vi khuẩn trên môi trường Burk's (không N).

STT	Dòng vi khuẩn	Khả năng phát triển trên môi trường đặc		Hàm lượng NH ₄ ⁺ được tạo ra ở môi trường lỏng (ppm)
		1 ngày sau khi cấy	2 ngày sau khi cấy	
1	H1	-	-	-
2	H3	-	1+	0,946
3	H4	+	3+	0,953
4	H7	+	2+	0,702
5	G4	+	3+	0,706
6	G6	+	2+	0,593
7	G7	-	-	-
8	G10	-	-	-
9	G11	-	1+	0,664
10	A5	+	3+	0,549
11	A6	+	2+	0,702
12	A7	+	1+	-
13	A12	+	1+	-
14	A13	+	2+	0,646
15	A14	+	3+	0,665
16	A16	+	2+	0,756
17	A17	-	-	-
18	A18	+	3+	0,820
19	A20	-	-	-
20	A25	+	2+	0,688

Ghi chú: - : không phát triển, + : phát triển, 1+ : phát triển vừa, 2+ : phát triển khá, 3+ : phát triển tốt.



Hình 2. Phổ điện di DNA gen *nifH* của các dòng vi khuẩn cố định đạm. 1. Thang DNA chuẩn 100 bp; 2. dòng G4; 3. dòng G6; 4. dòng G11; 5. dòng H3; 6. dòng H4; 7. dòng H7 và 8. đối chứng âm.



Hình 3. Phổ điện di DNA của các dòng vi khuẩn cố định đạm *Az. lipoferum*. 1, 13. đối chứng âm; 2 - 8. các dòng A25, A18, A16, A14, A13, A6, A5; 9: *Az. lipoferum*; 10. thang DNA chuẩn 100 bp; 11 - 12. 2 dòng A7 và A12.

	10	20	30	40	50	60
Klebsiella pneumoniae	ACCCAGAATC	TCGTC-GCGG	-CCCTCGCCG	AGATGGGTAA	GAAAGTGATG	ATCGTCGGCT
G4	CTAA.A.C	G.G.C	G.T			
G6	AAGTA.C	G.C			A.	
H4	C.TT.CCT	C.C	A.G	AG.C	A.	
	70	80	90	100	110	120
Klebsiella pneumoniae	GCGATCCGAA	AGCGGACTCC	ACCCGTCTGA	TCCTCCACGC	TAAAGCCAG	AACACCATCA
G4		G		T	G	
G6		G				T
H4	C			G.T	G.G	T
	130	140	150	160	170	180
Klebsiella pneumoniae	TGGAGATGGC	GGCGGAAGTG	GGCTCGGTCC	AGGATCTGGA	GCTCGAAGAC	GTTCTGCAAA
G4						G
G6						A
H4		C.C	T.T.G	A.C.C	A.G	G
	190	200	210	220	230	240
Klebsiella pneumoniae	TCGGCTATGG	CGATGTCGGT	TGCGCCGAAT	CCGGCGGCC	GGAGCCAGGC	GTCGGCTCCG
G4		A				T
G6		G.C	T.G			T
H4	T.C	GC	G.C		A	A.T
	250	260	270	280	290	300
Klebsiella pneumoniae	CCGGACGCGG	GGTGATCACC	GCCATCAACT	TCCTCGAGGA	AGAAGGCGCC	TATGAAGAAG
G4				A		
G6						
H4	A.T	T.T	T	G.A		TCAGC
	310	320	330	340	350	360
Klebsiella pneumoniae	ATTTGGATT	CGTCTTCTAT	GACGTCCTCG	GCGACGTGGT	CTCGGGCGGC	TTCGCCATGC
G4	C					T
G6	C					
H4	CC.C.C	T		T		G
	370	380	390	400	410	420
Klebsiella pneumoniae	CGATCCGCGA	AAACAAAGCC	CAGGAGATCT	ACATCGTCTG	CTCCGGCGAG	ATGATGGCGA
G4						C
G6	C				G	C
H4	T		G.A	T	G.A	C
	430					
Klebsiella pneumoniae	TGTAT-GCCG	CCAACAATA				
G4	CGC	A				
G6	C-C	A				
H4	CGA.AC	A				

Hình 4. So sánh gen *nifH* của các dòng G4 và G6 và H4 với dòng chuẩn *Klebsiella pneumoniae*

	10	20	30	40	50	60
Micrococcus sp. Y70	CACCCGCTGT	ATCCTGCACG	CGAAAGCGCA	GAACACCATT	ATGGAGATGG	CCGCCGAAGT
H4		T				
	70	80	90	100	110	120
Micrococcus sp. Y70	GGGTTCTGTG	GAAGACCTCG	AACTGGAAGA	CGTGCTGCAA	ATCGGTTACG	GCGGCCTGCG
H4				A		
	130	140	150	160	170	180
Micrococcus sp. Y70	CTGTGCGGAA	TCCGGCGGCC	CGGAACCAGG	CGTGGGCTGT	GCAGGACGTG	GTGTTATCAC
H4						
	190	200	210	220	230	240
Micrococcus sp. Y70	CGCCATCAAC	TTCCTTGAAG	AAGAAGCGCG	CTATGTCAGC	GACCTCGACT	TTGTCTTCTA
H4	T	G				
	250	260	270	280	290	300
Micrococcus sp. Y70	TGACGTCTCT	GGCGACGTGG	TTTGCGGCGG	GTTGCGCCATG	CCAATTCCGG	AAAATAAAGC
H4		T	C		G	C
	310	320				
Micrococcus sp. Y70	GCAAGAGATC	TATATCGTCT	GC			
H4						

Hình 5. So sánh gen *nifH* của dòng H4 với dòng chuẩn *Micrococcus sp. Y70*.

Định lượng ammonium do vi khuẩn tạo ra

Mười ba dòng vi khuẩn cho phản ứng dương tính trên môi trường không đạm và phản ứng PCR với cặp mồi *nifH* đều có khả năng hình thành NH_4^+ (Bảng 2).

Tóm lại, trong số 32 dòng vi khuẩn nội sinh (8 dòng: RMR, 11: LGI và 13: Nfb) có 3 dòng H3, H4, H7 (RMR); 3 dòng G4, G6, G11 (LGI) và 7 dòng A5, A6, A13, A14, A16, A18 và A25 có đủ 3 đặc tính tốt: cố định đạm, hòa tan lân khó tan và tổng hợp kích thích tố sinh trưởng IAA.

Trong đó dòng G4, H4 và A18 là có đặc tính tốt nhất so với các dòng được phân lập trên môi trường LGI, RMR và Nfb, tương ứng.

Nhận diện các dòng vi khuẩn H4, G4 và G6 có các đặc tính tốt bằng phương pháp giải trình tự DNA gene *nifH*

Đoạn DNA *nifH* của dòng G4 (434 bp) và đoạn DNA của dòng G6 (436 bp) tương đồng 93,8% và 94,3% với trình tự DNA *nifH* của loài *Klebsiella pneumoniae* (dòng G4 có 22 vị trí và dòng G6 có 23 vị trí không trùng với dòng vi khuẩn chuẩn) (Hình 4).

Đoạn DNA *nifH* của dòng H4 (434 bp) có tỷ lệ tương đồng 97,5% với trình tự DNA *nifH* của loài *Micrococcus* sp. Y70 (vị trí 19, 154, 187, 196, 253, 262, 283, 295 không trùng với các vị trí của dòng vi khuẩn chuẩn) (Hình 5).

THẢO LUẬN

Vi khuẩn nội sinh là vi khuẩn trải qua phần lớn vòng đời trong cây trồng (Quispel, 1992) và sau khi xâm nhập vào trong cơ thể cây trồng, chúng thường tập trung vào khoảng trống của gian bào hay theo hệ mạch gỗ để đến các nơi khác trong cây (Zinnel *et al.*, 2002), không hại cho cây trồng nếu không muốn nói là thúc đẩy sự phát triển của cây trồng (Sturz *et al.*, 2000). Nhiều dòng vi khuẩn cố định đạm như *Azospirillum* thường sinh sống ở đất vùng rễ nhưng cũng có mặt ở trong nhu mô rễ cây có Kalar (Rheinold *et al.*, 1986), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (cây mía) (Lavacante, Dobereiner, 1988), *Herbaspirillum* trong cây lúa (Elbeltagy *et al.*, 2001), *Burkholderia* trong cây mía, khóm (Weber *et al.*, 1999). Cao Ngọc Diệp và đồng tác giả (2007) đã phát hiện 13 dòng vi khuẩn nội sinh *Azospirillum lipoferum* trong rễ, thân của 3 giống lúa mùa ở đồng bằng sông Cửu Long (Nàng Thơm Chợ Đào, Tài Nguyên và Một Bụi Vĩnh Thuận) đã mở ra

hướng nghiên cứu vi khuẩn nội sinh trong các loại cây trồng khác trong đó cây cỏ chăn nuôi mà kết quả thí nghiệm này cho thấy 7 dòng vi khuẩn (A25, A18, A16, A14, A13, A6, A5) nội sinh là *Az. lipoferum*. Một điều thú vị, là 3 dòng vi khuẩn G4 và G6 có tỷ lệ tương đồng đến 93,8% và 94,3% với dòng vi khuẩn cố định đạm *Klebsiella pneumoniae* và dòng H4 có tỷ lệ tương đồng đến 97,5% với vi khuẩn cố định đạm *Micrococcus* sp. Y70, điều này cho thấy sự đa dạng chủng loại vi khuẩn cố định đạm nội sinh trong các cây cỏ chăn nuôi. Các dòng vi khuẩn *Klebsiella* được nghiên cứu nhiều ở Ấn Độ và Trung Quốc (<http://en.wikipedia.org/wiki/Klebsiella>, 2008) còn *Micrococcus* được sử dụng như là nguồn phân đạm sinh học ở Mỹ (Zinnel *et al.*, 2002).

Bên cạnh đặc tính cố định đạm, các dòng vi khuẩn nội sinh còn có hai đặc tính quan trọng khác là hòa tan lân khó tan và sinh tổng hợp IAA mà các nhà khoa học đã phát hiện từ lâu (Van de Broek *et al.*, 1999; Seshadri *et al.*, 2000; Richardson, 2003) nhất là các loài của giống *Azospirillum*, những loài của giống *Gluconacetobacter*, *Klebsiella* và *Micrococcus* cũng được nhiều tác giả ghi nhận (Madhaiyan *et al.*, 2004; Zinnel *et al.*, 2002). Ở đồng bằng sông Cửu Long, Lăng Ngọc Đậu và đồng tác giả (2007) đã phát hiện những đặc tính tốt này trên 13 dòng vi khuẩn *Az. lipoferum* ngoài khả năng cố định đạm của chúng và chúng được sử dụng như là phân sinh học dạng lỏng hay dạng viên thúc đẩy sự phát triển và tăng năng suất của cây lúa với hiệu quả tích cực, tiết kiệm được một phần lớn phân hóa học (Phạm Thị Ánh Loan, 2007; Võ Văn Phước Quê, 2007). Phân lập và xác định những dòng vi khuẩn nội sinh có ích này mở ra triển vọng sản xuất phân sinh học không những sử dụng cho cây cỏ chăn nuôi mà cho những cây trồng khác cùng họ Graminae như lúa, mía, bắp.

KẾT LUẬN

Từ 71 dòng vi khuẩn được phân lập từ các mẫu rễ, thân và lá của các loại cỏ chăn nuôi (cỏ voi, cỏ sả, cỏ mồm, cỏ sữa và cỏ lông tây), có 42 dòng là vi khuẩn nội sinh đã được nhận diện bằng kỹ thuật PCR, cho sản phẩm DNA 16S rDNA có kích thước khoảng 900 bp.

Tất cả 32 trong số 42 dòng vi khuẩn nội sinh này đều có khả năng tổng hợp kích thích tố IAA và hòa tan được lân khó tan và có các dòng vi khuẩn có cả 3 đặc tính tổng hợp kích thích tố sinh trưởng IAA và hòa tan lân khó tan cao, đồng thời cũng có khả năng cố định đạm sinh học.

Trong 13 dòng vi khuẩn này là thuộc nhóm vi khuẩn nội sinh kích thích sự sinh trưởng thực vật có 7 dòng vi khuẩn nội sinh kích thích sự sinh trưởng thực vật được phân lập trên môi trường Nfb là thuộc loài *Azospirillum lipoferum*, 2 dòng G4 và G6 được phân lập trên môi trường LGI có trình tự DNA *nifH* tương đồng tương ứng là 93,8% và 94,3% so với trình tự DNA của loài *Klebsiella pneumoniae*, dòng H4 được phân lập trên môi trường RMR có tỷ lệ tương đồng của gen *nifH* với loài *Micrococcus* sp. Y70 là 97,5%.

Lời cảm ơn: Các tác giả chân thành cảm ơn anh Nguyễn Tấn Khang, bộ môn Sinh học Phân tử, cô Nguyễn Thị Xuân Mỹ, bộ môn Công nghệ sinh học Vi sinh vật, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Đại học Cần Thơ đã giúp chuẩn bị các phản ứng PCR và giải trình tự các đoạn DNA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Barbieri P, Zanelli T, Galli E, Zanetti G (1986) Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. *FEMS Microbiol* 36: 87-90.
- Cao Ngọc Diệp, Phạm Thị Khánh Vân, Lăng Ngọc Dậu (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. *Tuyển tập báo cáo Khoa học Hội nghị Toàn quốc 2007 Nghiên cứu cơ bản trong Khoa học Sự Sống, Quy Nhơn 10/8/2007*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật: 456-459.
- Elbeltagy A, Nishioka K, Tadashisato H, Suzuki H, Ye B, Hamada T, Isawa T, Mitsui H, Minamisawa K (2001) Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from wild rice species. *Appl Environ Microbiol* 38: 5285-5293.
- Fahey JW, Dimock MB, Tomasino SF, Taylor JM, Carlson PS (1991) Genetically engineered endophytes as biocontrol agents: a case study from industry. *Microbial Ecology of Leaves*, Springer - Verlag, London, United Kingdom: 401-411.
- Krieg NR, Döbereiner J (1984) Genus *Azospirillum* In: *Bergey's manual of systematic bacteriology* 1, Murray et al. (eds): 94-103.
- Lăng Ngọc Dậu, Nguyễn Thị Xuân Mỹ, Cao Ngọc Diệp (2007) Khả năng cố định đạm, hòa tan lân và sinh tổng hợp IAA của vi khuẩn *Azospirillum lipoferum*. *Tuyển tập báo cáo Khoa học Hội nghị Toàn quốc 2007 Nghiên cứu cơ bản trong Khoa học Sự Sống, Quy Nhơn 10/8/2007*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật: 445-448.
- Madhaiyan M, Saravanan VS, Jovi DBSS, Lee H, Thenmozhi R, Hari K, Sa T (2004) Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghast, India. *Microbiol Res* 159: 233-243.
- Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 170: 265-270.
- Nguyễn Đăng Khôi, Dương Hữu Thời (1981) *Nghiên cứu về cây thức ăn gia súc Việt Nam, Tập II*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật: 201-223.
- Park M, Kim C, Yang J, Lee H, Shin W, Kim S, Sa T (2005) Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiol Res* 160: 127-133.
- Quispel A (1992) A search of signals in endophytic microorganisms. In: *Molecular signals in plant - microbe communications*: 471-491.
- Reinhold B, Hurek T, Niemann EG, Fendrik I (1986) Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of Kallar grass. *Appl Environ Microbiol* 52: 520-526.
- Richardson AE (2003) Making microorganisms mobilize soil phosphorus. In first virtual international meeting on microbial phosphate solubilization: 1-5. <http://webcd.usal.es/web/psm/abstracts/Richardson2.htm>
- Rosenblueth M, Martínez-Romero E (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Am Phytopathol Soc* 19: 827-837.
- Seshadri S, Muthukumarasamy R, Lakshminarasimhan C, Ignacirunthu S (2000) Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. *Cur Sci* 79: 565-567.
- Sturz AV, Christie BR, Nowak J (2000) Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit Rew Plant Sci* 19: 1-30.
- Van der Broek A, Lambrecht M, Eggermont K, Vanderleyden J (1999) Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol* 181: 1338-1342.
- Cavalcante VA, Dobereiner J (1988) A new acid tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108: 23-31.
- Xu H, Griffith M, Patten CL, Glick BR (1998) Isolation and characterization of an antifreeze protein with ice nucleation activity from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Can J Microbiol* 44: 64-73.
- Weber OB, Baldani VLD, Teixeira KRS, Kirchof G, Baldani JI, Dobereiner J (1999) Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant Soil* 210: 103-113.
- Zinniel DK, Lambrecht P, Harris NB, Feng Z, Kuczmariski

D, Higley P, Ishimaru CA, Arunakumari A, Barletta RG, Vidaver AK (2002) Isolation and characterization of Endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl Environ Microbiol* 68: 2198-2208.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA IN SEVERAL FORAGE GRASS CULTIVARS

Nguyen Thi Thu Ha, Ha Thanh Toan, Cao Ngoc Diep*

Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University

SUMMARY

Four wild forage grass cultivars (*Pennisetum purpureum*, *Panicum maximum*, *Brachiaria mutica*, *Ischaemum rugosum*) were collected in three provinces (Vinh Long, Dong Thap, Can Tho) of the Mekong Delta, Vietnam to isolate, identify, evaluate some good characteristics of these endophytes, determine *nifH* gene in nitrogen-fixing endophytes and sequence some good endophytes. The results showed that seventy-one bacterial isolates were isolated in several forage grass cultivars. However, 42 isolates were identified as endophytic bacteria using 16S rDNA analysis with specific primers. Thirteen endophytes with a good composite characteristics (high IAA biosynthesis, phosphate solubilization and fixing nitrogen) were detected based on biochemical tests. Among them, 7 endophytes in Nfb medium were identified as *Azospirillum lipoferum*. Furthermore, G4 and G6 endophytes isolated in LGI medium, they showed 93.8 and 94.3% identities with *Klebsiella pneumoniae* about *nifH* gene and the identity of *nifH* gene from H4 endophytic bacteria with in *Micrococcus* sp. Y70 was 97.5%. Three endophytes (A18, G4 and H4) had the best composite characteristic, they have been suggested for bio-fertilizer production.

Keywords: *Azospirillum lipoferum*, biological nitrogen fixation, endophytic bacteria, IAA, phosphate solubilization

* Author for correspondence: Tel: 84-913833792; Fax: 84-710-3835892; E-mail: cndiep@ctu.edu.vn