

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN NỘI SINH TẠO CHẤT KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG INDOLE-3 - ACETIC AXÍT (IAA) VÀ ĐỐI KHÁNG NẤM GÂY BỆNH THỐI CỎ RỄ CÂY THÔNG

Nguyễn Thị Thuý Nga
Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Từ khoá: Thông nhựa, vi khuẩn nội sinh, Indole-3 - Acetic Axít, vi khuẩn đối kháng nấm gây bệnh.

Vi sinh vật nội sinh sống trong mô của tế bào thực vật, không gây hại cho cây chủ mà thường tạo ra các chất có hoạt tính sinh học như: chất điều hòa sinh trưởng, các chất kháng sinh, nhóm axit pholic... các hợp chất này đã phát huy vai trò của nó đối với đời sống của cây chủ, kích thích sinh trưởng thực vật, sinh kháng sinh ức chế sự phát triển của mầm bệnh, tăng sức đề kháng cho cây. Việc phân lập và tuyển chọn vi sinh vật nội sinh cây Thông nhựa có khả năng sinh tổng hợp Indole-3 - Acetic Axít (IAA) và các hợp chất kháng sinh ức chế sự phát triển của mầm bệnh là rất cần thiết, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn lớn. Từ mẫu rễ/cành Thông nhựa đã phân lập được 2 chủng vi khuẩn nội sinh ký hiệu là QI₁, và QI₂₄, chủng QI₁ được giám định là loài *Pseudomonas fluorescens* có khả năng sinh tổng hợp IAA, đạt 11,872mg/l. Khuẩn lạc có màu trắng đục, dày, mịn, mọc đều, có gram (-) tế bào hình hạt gạo dài, kích thước tế bào 1,2 × 3,4µm. Chủng QI₂₄ được xác định là loài *Bacillus subtilis* đối kháng nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh thối cỏ rễ thông, sau 10 ngày có đường kính vòng ức chế nấm gây bệnh là 22mm, có phản ứng màu dương tính với thuốc thử Salkowski, khả năng sinh tổng hợp IAA đạt 5,312mg/l. Khuẩn lạc chủng này màu xanh lam nhạt, khuẩn lạc dày, hơi sần, mọc lan, có gram (-) tế bào hình que ngắn, kích thước tế bào 0,7 × 1,6 (µm). Cả hai chủng QI₁ và chủng QI₂₄ đều có khả năng phát triển mạnh ở các điều kiện thường dễ nuôi cấy để sản xuất phân bón vi sinh vật tăng sinh trưởng cho cây thông và hạn chế bệnh thối cỏ rễ.

Isolating and screening bacterial endophytes producing growth regulator Indole-3 - Acetic Acid (IAA) and antifungal compounds against fusarium oxysporum damping-off disease of *Pinus merkusii*

Keywords: *Pinus merkusii*, endophyte, Indole-3 - acetic acid, resisting pathogens

Endophytic microorganisms in plant tissues, which are not harmful to host plant, could produce bioactive substances such as growth regulators, antibiotics, folic acid groups... These compounds promote beneficial effects for the life of the host plants, stimulate the growth of plant, inhibit the growth of pathogens and enhance the resistance of trees. Isolating and screening endophytes from *Pinus merkusii*, which are capable of synthesizing IAA and antibiotics, is very essential and have both scientific and practical significance. From the 20 branch samples, 36 Strains of bacterial endophytes were isolated, in which 2 strains of endophytes QI₁ and QI₂₄ having high bioactive activities were selected, QI₁ was identified as *Pseudomonas fluorescens*, which had the ability to produce IAA with 11.872 mg/l. Strain QI₂₄ was identified as *Bacillus subtilis* which produced antifungal metabolites against *Fusarium oxysporum* causing damping off of pine, inhibition ring diameter after 10 days was 22mm, production of IAA reached 5.312 mg/l. Both strains QI₁ and QI₂₄ are likely to grow in normal condition to produce biofertilizer to stimulate growth and control damping off for pines.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chất kích thích sinh trưởng thực vật thường được sử dụng trong canh tác để tăng năng suất cây trồng, các loại thuốc hoá học để phòng trừ sâu bệnh hại cây trồng cũng được sử dụng rất phổ biến. Tuy nhiên, việc lạm dụng chất kích thích sinh trưởng thực vật, chất hoá học để phòng trừ sâu bệnh hại mang đến hậu quả xấu như gây ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khoẻ con người, phá vỡ cân bằng hệ sinh thái. Vì vậy, việc tìm ra vi sinh vật nội sinh ngay trong chính cơ thể thực vật sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật, sinh kháng sinh chống lại mầm bệnh đang được nhiều nhà khoa học quan tâm và nghiên cứu. Các vi sinh vật nội sinh thực vật có khả năng sinh Indole-3 - Acetic Axít (IAA) kích thích tăng trưởng thực vật (Barbieri *et al.*, 1986). Các vi sinh vật nội sinh này còn có khả năng đối kháng với các vi sinh vật gây bệnh, hay tăng tính kháng đối với thực vật. Năm 2012, Ruben Puga-Freitas và đồng tác giả cho rằng sự có mặt của các vi sinh vật sinh IAA đã làm tăng sản lượng canh tác một cách rõ rệt. Ở Việt Nam năm 2011, Đỗ Kim Nhung và Vũ Thành Công đã phân lập vi sinh vật nội sinh từ cây mía có khả năng sinh IAA. Năm 2013, Nguyễn Thị Huỳnh Như và đồng tác giả đã nghiên cứu phân lập và tuyển chọn vi sinh vật nội sinh trên cây chuối có khả năng sinh IAA, hai dòng D1 và D5 cho kết quả cao nhất với nồng độ IAA lần lượt là 3,16 µg/ml và 3,07 µg/ml.

Ở nước ta Thông nhựa là nhóm loài được đưa vào trồng rừng chính trong ngành lâm nghiệp vì nó là cây đa mục đích, vừa lấy gỗ và lấy lâm sản ngoài gỗ (nhựa thông) có giá trị kinh tế cao. Tuy nhiên, việc gieo ươm và gây trồng thông ở nước ta hiện nay còn gặp nhiều khó khăn và trở ngại. Việc gieo ươm thông tại vườn ươm còn mắc nhiều bệnh, như bệnh vàng còi, bệnh thối cổ rễ. Tỷ lệ cây con bị chết ở vườn ươm do nấm *Fusarium spp.* gây ra ước tính từ 40% đến 50%. Cây thông sinh trưởng

phát triển kém kéo theo sức đề kháng yếu dễ bị bệnh và sự tấn công của sâu róm thông. Việc tìm ra những vi sinh vật nội sinh cây Thông nhựa có khả năng sinh tổng hợp IAA và tăng tính kích kháng bệnh, tạo phân vi sinh bón cho cây thông với mục đích tạo cây con thông khoẻ mạnh không bị bệnh, rừng thông sinh trưởng tốt là việc làm có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương pháp phân lập vi sinh vật nội sinh

Chọn cây thông khoẻ mạnh, sinh trưởng tốt, không bị bệnh, cắt cành bánh tẻ khoảng 7 - 8cm, đường kính 1 - 2cm để làm mẫu. Rửa sạch mẫu trên vòi nước sạch. Khử trùng những mẫu này bằng cồn 70° ngâm trong 1 phút, lấy ra rửa sạch bằng nước cất, khử trùng tiếp bằng HgCl₂, nồng độ 0,1% ngâm trong 1 phút, lấy ra rửa lại bằng nước cất 3 - 4 lần. Cắt cành mẫu thành những miếng nhỏ có kích thước 0,5 - 1mm², ngâm trong môi trường PBS, sau 24 giờ pha dung dịch từ 10⁻² cho đến 10⁻⁵, nhỏ dung dịch 0,1ml vào hộp lồng chứa môi trường PDA - Potato Dextrose Agar (Difco Laboratories, 1953), chang đều trên mặt thạch, ở mỗi nồng độ cấy 3 hộp lồng, đặt các hộp lồng này trong tủ định ôn ở nhiệt độ 28°C. Theo dõi sự xuất hiện của các khuẩn lạc sau 48 giờ, tách từng khuẩn lạc riêng rẽ. Cây truyền thu vi khuẩn thuần.

2.2. Phương pháp tuyển chọn vi sinh vật nội sinh hàm lượng IAA cao

Xác định định tính: Các chủng vi sinh vật sau khi làm thuần được nuôi cấy lắc, trên môi trường NB (nutrient broth) ở 28°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Sau 4 ngày, lấy dịch vi sinh vật trên nuôi cấy trong môi trường GPB (với tỷ lệ 1ml dịch với 10ml môi trường) ở 28°C, tốc độ lắc 200 vòng/ phút, trong 2 ngày. Ly tâm ở tốc độ 5000 vòng /phút trong 10 phút để loại bỏ khuẩn. Lấy dịch đã ly tâm pha với thuốc thử

Salkowski với hàm lượng 1ml dịch với 4ml thuốc thử (thuốc thử Salkowski được pha 0,5M FeCl₃ 2ml và HClO₄ 35% 98ml). Nếu thấy dịch đổi màu hồng do IAA thô đã được sinh ra.

Định lượng IAA: Định lượng IAA bằng đồ thị chuẩn IAA. Chuẩn bị các ống nghiệm có chứa sẵn 10ml nước cất, hút ở mỗi ống nghiệm lần lượt là 0, 50, 100, 200, 400, 600,... 1400, 1600µl nước cất bỏ đi, đồng thời bổ sung lượng dịch IAA tương ứng (nồng độ IAA là 0,05%), đối chứng là 2ml nước cất bổ sung 8ml thuốc thử. Dựa vào chỉ số OD (mật độ quang) và nồng độ IAA trong dung dịch để dựng đồ thị đường chuẩn IAA tinh khiết. Lấy dịch đã ly tâm pha với thuốc thử hàm lượng (1ml dịch với 4ml thuốc thử Salkowski), so màu trên máy so màu bước sóng 530nm, và tính kết quả theo đồ thị chuẩn IAA tinh khiết. (Thí nghiệm được lặp lại 3 lần riêng biệt).

2.3. Phương pháp tuyển chọn chủng VSV có hoạt tính đối kháng nấm gây bệnh thối cổ rễ

Tuyển chọn được tiến hành theo phương pháp nuôi cấy kếp trên cùng một đĩa Petri. Vi khuẩn nội sinh đã thuần được cấy vào chính giữa hộp lồng có chứa môi trường PDA (mỗi chủng khuẩn được thử nghiệm trên 10 hộp lồng, và được lặp lại 3 lần). Nuôi trong tủ định ôn có nhiệt độ 28°C. Sau 2 ngày nấm gây bệnh thối cổ rễ *Fusarium oxysporum* được cấy vào 3 điểm gần mép hộp lồng đã cấy vi khuẩn, rồi theo dõi sự phát triển của vi khuẩn và nấm bệnh. Sau 7 và 10 ngày đánh giá hiệu lực của vi khuẩn đối với nấm gây bệnh *Fusarium oxysporum* bằng việc đo đường kính vòng ức chế (Jinwn Kim, 2000). Vòng ức chế của vi khuẩn đối với nấm bệnh được tính theo công thức: $V(mm) = D(mm) - d(mm)$. Trong đó: $V(mm)$ là đường kính trung bình vòng ức chế; $D(mm)$ là đường kính trung bình tính theo 2 chiều của vòng ức chế được tính từ tâm hộp lồng đến mép ngoài khuẩn lạc *F. oxysporum*; $d(mm)$ là đường kính trung bình của khuẩn lạc

vi khuẩn tính theo 2 chiều vuông góc. Hiệu lực đối kháng được 4 cấp: hiệu lực yếu ($V(mm) \leq 5mm$); hiệu lực trung bình ($5mm < V(mm) \leq 10mm$); hiệu lực cao ($10mm < V(mm) \leq 20mm$) và hiệu lực rất cao ($V(mm) > 20mm$).

2.4. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm hình thái, sinh hoá của vi khuẩn

Nghiên cứu đặc điểm hình thái: Nhuộm màu vi khuẩn bằng thuốc nhuộm rose bengal và quan sát bằng kính hiển vi quang học BX50 có độ phóng đại 2000 lần, mô tả hình dáng, đo kích thước bào tử và chụp ảnh. Định lượng vi sinh vật bằng phương pháp đếm trực tiếp bằng buồng đếm *Breed* hoặc đếm trực tiếp bằng phương pháp pha loãng tới hạn.

Nghiên cứu đặc điểm sinh hoá: Nhỏ 1 giọt KOH 3% lên lam kính, lấy một vòng que cấy sinh khối tế bào vi khuẩn nuôi trong 24 giờ, đánh tan khối tế bào trong giọt KOH, dùng que cấy nhắc lên, nếu thấy có độ dính là vi khuẩn Gram âm, không có độ kết dính là vi khuẩn Gram dương.

2.5. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm sinh học của các chủng vi sinh vật

- Phương pháp xác định môi trường nhân sinh khối chủng vi sinh vật sinh IAA: VK được nuôi cấy ở 28°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút trên 3 loại môi trường: môi trường gi đường, môi trường GPB (Glucose phosphate broth) và môi trường PBS (Phosphate buffered saline). Sau 120 giờ xác định số lượng tế bào và kiểm tra hoạt tính của các chủng bằng phương pháp pha loãng tới hạn.

- Phương pháp xác định môi trường nhân sinh khối chủng VSV đối kháng nấm gây bệnh thối cổ rễ: Vi khuẩn được nuôi cấy ở 28°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút trên 3 loại môi trường: môi trường PD (Potato dextrosed), môi trường King's B (Pseudomonas Agar Base) và môi trường PBS (Phosphate buffered saline). Sau 120 giờ xác định số lượng tế bào VK bằng phương pháp pha loãng tới hạn.

Phương pháp xác định thời gian nhân sinh khối các chủng VSV: VK được nuôi cấy trên môi trường tốt nhất được tìm thấy ở nghiên cứu trên, ở 28°C, lắc ở 200 vòng/phút. Sau các thời gian 48giờ, 72giờ, 96giờ, 120giờ và 144giờ lấy mẫu ra xác định số lượng tế bào VK bằng phương pháp pha loãng tới hạn.

Xác định nhiệt độ môi trường nhân sinh khối các chủng VSV: Thí nghiệm được thực hiện trên môi trường tốt nhất được tìm thấy ở nghiên cứu trên, lắc 200 vòng/phút; nuôi ở các nhiệt độ 17°C, 20°C, 23°C, 25°C, 28°C, 30°C, 33°C và 35°C. Sau 120 giờ nuôi cấy xác định số lượng tế bào VK bằng phương pháp pha loãng tới hạn.

Xác định độ pH môi trường nhân sinh khối các chủng VSV: Thí nghiệm được thực hiện trên môi trường tốt nhất được tìm thấy ở nghiên cứu trên, 28°C, lắc 200 vòng/phút. Điều chỉnh pH môi trường ở các trị số 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5 ; 8. Sau 120 giờ nuôi cấy xác định số lượng tế bào vi khuẩn bằng phương pháp pha loãng tới hạn.

2.6. Phương pháp định danh một số loài có hiệu lực cao

DNA của vi sinh vật được tách chiết và phân đoạn 16S của rDNA được giải trình tự bằng phương pháp ‘dideoxy chain termination’. Xác định tên VSV dựa trên cơ sở giải trình tự đoạn gen 16S ADN riboxom của các chủng vi khuẩn nghiên cứu, so sánh với các trình tự có sẵn trong ngân hàng gen quốc tế EMBL bằng phương pháp FASTa 33 để định loại đến loài các chủng VSV.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập và tuyển chọn VSV nội sinh có khả năng sinh tổng hợp IAA và đối kháng nấm gây bệnh thối cổ rễ

3.1.1. Kết quả phân lập vi sinh vật nội sinh

Với 10 mẫu cành thu ở Quảng Ninh và 10 mẫu từ những cây Thông nhựa khoẻ mạnh không bị bệnh thu tại Đại Lải - Vĩnh Phúc đã phân lập được 87 chủng VSV. Kết quả trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả phân lập chủng vi khuẩn nội sinh

STT	Ký hiệu Mẫu	Số chủng	Ký hiệu chủng phân lập được		
			Phản vò	Tượng tầng	Phản gỗ
1	C1	3		Cl ₂ , Cl ₃	Cl ₄
2	C2	2	Cl ₃		Cl ₄
3	C3	5	Cl ₄ , Cl ₅	Cl ₃	Cl ₇ , Cl ₆
4	C4	3	Cl ₁ , Cl ₅	Cl ₇	
5	C5	5	Cl ₄	Cl ₃ , Cl ₅ , Cl ₇	Cl ₆
6	C6	4	Cl ₁	Cl ₇	Cl ₂ , Cl ₅
7	C7	3	Cl ₁	Cl ₇ , Cl ₆	
8	C8	5	Cl ₂	Cl ₆ , Cl ₅ , Cl ₆	Cl ₇
9	C9	2	Cl ₁	Cl ₄	
10	C10	4	Cl ₁	Cl ₂ , Cl ₆	Cl ₁₀
11	Q1	5	Cl ₁₁ , Ql ₈	Ql ₁₁	Cl ₁₂ , Ql ₁₃
12	Q2	6	Ql ₁ , Ql ₉	Ql ₁₀ , Ql ₁₄ , Ql ₁₅	Ql ₄
13	Q3	4	Ql ₁₇	Ql ₁₆ , Ql ₁₉	Ql ₁₈
14	Q4	7	Ql ₉ , Ql ₈	Ql ₁₅ , Ql ₂₀ , Ql ₂₁	Ql ₂₂ , Ql ₂₃
15	Q5	5	Ql ₁₁ , Ni ₂₀	Ql ₆ , Ql ₂₀	Ql ₂₄
16	Q6	4	Ql ₁₆	Ql ₂₂ , Ql ₂₅	Ql ₂₆
17	Q7	5	Ql ₂₅	Ql ₁ , Ql ₂₄	Ql ₁₂ , Ql ₂₇
18	Q8	6	Ql ₃ , Ql ₂₆	Ql ₁₃ , Ql ₂ , Ql ₂₈	Ql ₃₀
19	Q9	4	Ql ₁ , Ql ₃₁	Ql ₃₂	Ql ₃₃
20	Q10	5	Ql ₃₀ , Ql ₃₄	Ql ₃₅ , Ql ₈	Ql ₃₆
Tổng số		87	28	38	21

Từ kết quả bảng 1 cho thấy với 20 mẫu cành cây Thông nhựa đã phân lập được 87 chủng VK nội sinh trong đó có 36 chủng vi khuẩn có đặc điểm khác nhau. Các chủng vi khuẩn nội sinh này phân bố ở tất cả các phần của cây gỗ. Phần vỏ thu được 28 chủng, chiếm 32% tổng số chủng thu được. Phần tượng tầng thu được 38 chủng, chiếm 42% tổng số chủng thu được.

Phần gỗ thu được 21 chủng, chiếm 24% tổng số chủng thu được. Như vậy số vi khuẩn nội sinh cây thông được tập chung chủ yếu ở phần tượng tầng của cây.

Đặc điểm của khuẩn lạc của các chủng VSV phân lập được có khác nhau về màu sắc và cách mọc, kết quả mô tả sơ bộ được trình bày tại bảng 2.

Bảng 2. Kết quả phân lập các chủng vi khuẩn khác nhau nội sinh cây Thông nhựa.

TT	Tên chủng	Đặc điểm của khuẩn lạc
1	QI ₁	Màu trắng đục, khuẩn lạc dày, mịn, mọc đều
2	Cl ₂	Màu nâu xám, khuẩn lạc mỏng, mọc tua tua, hơi sần ở viền khuẩn lạc
3	Cl ₃	Màu kem nhạt, khuẩn lạc mỏng, mọc tua, sần ở giữa khuẩn lạc.
4	Cl ₄	Màu nâu vàng, khuẩn lạc bình thường, mọc mịn.
5	Cl ₅	Màu trắng sữa, khuẩn lạc bình thường, mọc tua ở 2 viền
6	Cl ₆	Màu trắng sữa, khuẩn lạc mỏng, mọc mịn
7	Cl ₇	Màu trắng đục, khuẩn lạc rất dày, mọc lan rộng
8	Cl ₉	Màu trắng ngà, khuẩn lạc trung bình, mọc su sun
9	Cl ₁₀	Màu ngà vàng, khuẩn lạc mỏng, hình tròn đồng tâm
10	Cl ₁₁	Màu vàng tươi, khuẩn lạc mỏng mọc mấp mô
11	Cl ₁₂	Màu xanh nhạt, khuẩn lạc trung bình, khuẩn lạc xù xì
12	Cl ₁₃	Màu trắng ngà, khuẩn lạc trung bình, mọc tua tua
13	QI ₈	Màu trắng đục khuẩn lạc dày, mọc sần tua ở viền.
14	QI ₉	Màu trắng hơi đục, khuẩn lạc dày, mọc mịn.
15	QI ₁₀	Màu vàng tươi khuẩn lạc bình thường, mọc hơi sần.
16	QI ₁₁	Màu hơi xám, khuẩn lạc mỏng, mọc tròn
17	QI ₁₂	Màu xanh nhạt, khuẩn lạc bình thường mọc mịn
18	QI ₁₃	Màu vàng sẫm khuẩn lạc bình thường, hơi khô ở giữa mọc các hạt sần.
19	QI ₁₄	Màu trắng đục, khuẩn lạc bình thường, hơi có tua ở viền.
20	QI ₁₅	Màu vàng, dày vừa phải, mọc lan rộng
21	QI ₁₆	Màu xanh lam khuẩn lạc bình thường, mọc mịn.
22	QI ₁₇	Màu vàng nghệ, khuẩn lạc bình thường, mọc mịn.
23	QI ₁₉	Màu nâu nhạt, khuẩn lạc bình thường, mọc mịn.
24	QI ₂₀	Màu nâu đỏ khuẩn lạc bình thường, mọc sần hình răng cưa.
25	QI ₂₁	Màu nâu sẫm khuẩn lạc bình thường, mọc mịn.
26	QI ₂₃	Màu hồng nhạt, khuẩn lạc bình thường, mọc mịn.
27	QI ₂₄	Màu xanh lam nhạt, khuẩn lạc mỏng, hơi sần, mọc lan.
28	QI ₂₅	Màu vàng kem, khuẩn lạc dày, mọc mịn.
29	QI ₂₆	Màu kem khuẩn lạc dày, mọc đều mịn.
30	QI ₂₇	Màu vàng kem nhạt, khuẩn lạc bình thường, mọc chùm.
31	QI ₂₉	Màu nâu đất, khuẩn lạc mỏng, mọc mịn.
32	QI ₃₀	Màu trắng đục, mọc dày và bóng
33	QI ₃₁	Màu hơi xám, khuẩn lạc mỏng, mọc tròn
34	QI ₃₂	Màu vàng, dày vừa phải, mọc lan rộng
35	QI ₃₃	Màu trắng trong, dày, mọc su sun
36	QI ₃₄	Màu đất, có sọc xanh thẫm ở giữa, khuẩn lạc bình thường, có sần ở viền

Như vậy chúng ta thấy rằng khuẩn nội sinh cây Thông nhựa rất phong phú về thành phần loài, được đặc trưng với nhiều màu sắc khác nhau: từ màu trắng trong, trắng đục, đến vàng nhạt, vàng sẫm, xanh nhạt, xanh lam vv..., từ hình dạng và độ dày khuẩn lạc. Tuyển chọn các chủng có khả năng sinh hàm lượng IAA cao và hiệu lực cao trong trong đối kháng với

nấm gây bệnh thối cổ rễ được tuyển chọn từ 36 chủng VSV này.

3.1.2. Kết quả tuyển chọn vi sinh vật nội sinh

Kết quả đánh giá khả năng sinh IAA và đối kháng với nấm *F. Oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả tuyển chọn chủng vi khuẩn sinh tổng hợp IAA và đối kháng nấm gây bệnh thối cổ rễ

STT	Tên chủng	VSV nội sinh sinh tổng hợp IAA		VSV nội sinh đối kháng nấm gây bệnh	
		Phản ứng với thuốc thử Salkowski	Hàm lượng IAA thô (mg/l)	Đường kính ức chế (mm) sau 7 ngày	Đường kính ức chế (mm) sau 10 ngày
1	QI ₁	+	11,872	16,6	20,1
2	Cl ₂	+	0,64	6,2	9,3
3	Cl ₃	+	0,576	0	0
4	Cl ₄	+	1,952	0	0
5	Cl ₅	+	5,344	13,4	15,5
6	Cl ₆	+	2,944	9,1	11,5
7	Cl ₇	+	0,48	0	0
8	Cl ₉	-	-	12,5	14,6
9	Cl ₁₀	-	-	10,4	13,3
10	Cl ₁₁	-	-	0	0
11	Cl ₁₂	-	-	8,2	9,1
12	Cl ₁₃	-	-	2,3	4,5
13	QI ₈	+	15,328	11,4	15,2
14	QI ₉	+	0,064	14,2	17,7
15	QI ₁₀	+	0,48	0	0
16	QI ₁₁	+	0,48	14,5	0
17	QI ₁₂	+	1,792	5,2	10,3
18	QI ₁₃	+	0,64	0	0
19	QI ₁₄	+	4,416	0	5,13
20	QI ₁₅			12,5	19
21	QI ₁₆	+	4,784	5,2	20,5
22	QI ₁₉	+	1,696	0	0
23	QI ₂₀	+	0,832	0	0
24	QI ₂₁	+	1,76	18,5	11,2
25	QI ₂₃	+	3,36	13,6	19,3
26	QI ₁₅	-	-	12,3	17,3
27	QI ₂₄	+	5,312	8,1	22,1
28	QI ₂₅	+	5,312	4,2	9,4
29	QI ₂₆	+	0,352	0	0
30	QI ₂₇	+	2,944	13,2	17,1
31	QI ₂₉	+	0,864	15,3	18,2
32	QI ₃₀	-	-	0	0
33	QI ₃₁	-	-	14,3	18,5
34	QI ₃₂	-	-	0	0
35	QI ₃₃	-	-	12,5	14,3
36	QI ₃₄	+	3,36	0	0

(+) Có phản ứng dương tính với thuốc thử Salkowski, lên màu tím hồng nghĩa là có sinh tổng hợp IAA; (-) Không có phản ứng với thuốc thử Salkowski nghĩa là không sinh tổng hợp IAA.

Qua kết quả bảng 3 cho thấy: Có 25 chủng phản ứng dương tính với thuốc thử Salkowski, có nghĩa rằng có khả năng sinh IAA. Hàm lượng IAA tạo ra giữa các chủng vi sinh vật không giống nhau. Hai chủng QI₈ và QI₁ có khả năng tổng hợp được 15,382 và 11,872 mg/l IAA (theo thứ tự). Trong khi đó có những chủng khác có khả năng tổng hợp IAA nhưng hàm lượng thu được không đáng kể.

Cũng với 36 chủng vi khuẩn đưa vào thử nghiệm khả năng đối kháng nấm gây bệnh thối cổ rễ, có 23 chủng (chiếm gần 64% tổng số chủng phân lập) có khả năng ức chế nấm gây bệnh *F. oxysporum*, trong đó có 3 chủng có khả năng ức chế với hiệu lực mạnh và rất mạnh, đó là những chủng QI₁, QI₁₆ và QI₂₄ (đường kính vòng ức chế từ 20 đến 22mm).

Chủng QI₁ có khả năng sinh tổng hợp IAA rất mạnh đạt 11,872 mg/l IAA, thì chúng lại có khả năng kháng nấm bệnh thối cổ rễ cây thông cũng rất lớn đạt vòng ức chế 20,1mm sau 10 ngày thí nghiệm. Chủng QI₈ có khả năng sinh tổng hợp IAA rất mạnh đạt 15,328 mg/l IAA, thì chúng lại có khả năng kháng nấm bệnh thối cổ rễ cây thông cũng khá lớn đạt vòng ức chế 15,2mm sau 10 ngày thí nghiệm. Chủng QI₁₆ có khả năng kháng nấm bệnh thối cổ rễ cây thông cũng rất lớn đạt vòng ức chế 20,5mm sau 10 ngày thí nghiệm và có khả năng sinh tổng hợp IAA khá đạt 4,784mg/l IAA. Chủng QI₂₄ có đường kính vòng phân giải lớn nhất là 22,1mm và có khả năng sinh tổng hợp IAA khá đạt 5,312/l IAA. Vì vậy 4 vi khuẩn QI₁, QI₈, QI₁₆, QI₂₄ được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Đặc điểm sinh học các chủng vi sinh vật có hiệu lực cao

3.2.1. Đặc điểm hình thái, sinh hoá của các chủng vi khuẩn hiệu lực cao

Từ kết quả tuyển chọn các chủng vi sinh vật có ích được trình bày ở trên, 4 chủng vi khuẩn có

hoạt tính tốt nhất đã được tuyển chọn nghiên cứu đặc điểm hình thái và đặc điểm sinh hoá. Trong đó 2 chủng QI₁ và chủng QI₈ có khả năng cao nhất sinh tổng hợp IAA. Chủng QI₁₆ và chủng QI₂₄ tạo vòng phân giải kháng nấm bệnh có đường kính lớn nhất.

Từ các phương pháp đã trình bày ở trên, 4 chủng vi khuẩn được thử nghiệm gram, nhuộm tế bào mô tả hình ảnh, đo kích thước kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Hình thái tế bào và đặc điểm sinh hóa

STT	Chủng	Gram	Hình dạng tế bào	Kích thước tế bào (µm)
1	QI ₁	-	Hình hạt gạo dài	2,2 × 3,4
2	QI ₈	-	Hình que dài	1,6 × 2,7
3	QI ₁₆	+	Hình que ngắn	1,8 × 2,8
4	QI ₂₄	-	Hình que ngắn	1,7 × 2,2

Kết quả của bảng 4 cho ta thấy hình dạng tế bào của các chủng vi khuẩn cũng khá khác biệt chiếm phần lớn là các tế bào vi khuẩn hình que có các kích thước khác nhau, có dạng dài, dạng ngắn. Chủng QI₁ lại có hình hạt gạo dài, đây là hình dạng tế bào ít phổ biến.

3.2.2. Xác định điều kiện tối ưu nhân sinh khối vi khuẩn

3.2.2.1. Xác định điều kiện môi trường nhân sinh khối tối ưu chủng vi khuẩn sinh IAA.

Mỗi chủng vi khuẩn sinh trưởng và phát triển tốt đều cần phải có một môi trường phù hợp nhất định. Thử nghiệm với các loại môi trường khác nhau giúp phát hiện môi trường nuôi dưỡng thích hợp nhất với từng loại vi khuẩn. Khi thử nghiệm môi trường phù hợp chủng vi khuẩn sinh tổng hợp IAA với 3 loại môi trường đưa vào thử nghiệm: môi trường gi đường, môi trường GPB, môi trường SPA. Kết quả tế bào hữu hiệu của các chủng khuẩn được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả mật độ tế bào và hàm lượng IAA được sinh ra, khi nuôi cấy ở các môi trường khác nhau

TT	Môi trường dinh dưỡng	QI ₁		QI ₈	
		Mật độ tế bào (CFU/ml)	Hàm lượng IAA thô (mg/l)	Mật độ tế bào (CFU/ml)	Hàm lượng IAA thô (mg/l)
1	Môi trường gi đường	$5,7 \times 10^8$	12,52	$8,5 \times 10^7$	9,35
2	Môi trường GPB	$3,21 \times 10^8$	10,25	$4,1 \times 10^8$	11,41
3	Môi trường SPA	$4,7 \times 10^8$	9,74	$9,7 \times 10^7$	10,20

Các chủng khuẩn được cấy vào 3 môi trường khác nhau, ban đầu chúng đều ở dạng dịch trong và lỏng, sau thời gian nuôi 120 giờ với tốc độ lắc 200 vòng/phút, ở nhiệt độ 28°C. Các dịch khuẩn trở nên đục và đặc sánh. Như vậy trên cả 3 môi trường dinh dưỡng các chủng khuẩn đều có khả năng sinh trưởng và phát triển, nhưng có sự khác nhau đáng kể về mật độ tế bào của các chủng khi được nuôi ở các môi trường khác nhau. Chủng QI₁ đạt mật độ tế bào hữu hiệu cực đại là $5,7 \times 10^8$ (CFU/ml) và hàm lượng IAA được sinh ra là cao nhất đạt 12,52mg/l khi nuôi cấy ở môi trường gi đường. Tuy nhiên khi nuôi cấy chủng QI₈ thấy rằng chúng phát triển tốt nhất trên môi trường GPB đạt mật độ tế bào hữu hiệu là $4,1 \times 10^8$ (CFU/ml) và hàm lượng IAA được sinh ra là cao nhất đạt 12,52mg/l. Tuy vậy mật độ tế bào

tối ưu của chủng QI₈ phát triển kém hơn (đạt 72%) so với mật độ tối ưu của chủng QI₁. Ngoài ra môi trường gi đường có giá cả cạnh tranh so với các môi trường GPB, vì thế chủng QI₁ được chọn trong sản xuất chế phẩm đa chủng vi sinh vật.

3.2.2.2. Xác định điều kiện môi trường nhân sinh khối tối ưu chủng vi khuẩn đối kháng nấm gây bệnh.

Dựa vào kết quả tuyển chọn các chủng vi khuẩn đối kháng với nấm bệnh ở trên, chủng vi khuẩn QI₁₆ và QI₂₄ đối kháng nấm gây bệnh thối cổ rễ thông đã được đưa vào nghiên cứu. Thí nghiệm được tiến hành khi nuôi cấy các chủng vi khuẩn này tại các môi trường khác nhau, môi trường PD, môi trường King'B, môi trường PBS kết quả được trình bày tại bảng 6.

Bảng 6. Kết quả mật độ tế bào và khả năng ức chế nấm gây bệnh khi nuôi cấy ở các môi trường khác nhau

TT	Môi trường dinh dưỡng	QI ₁₆		QI ₂₄	
		Mật độ tế bào (CFU/ml)	Đường vòng kính ức chế (mm)	Mật độ tế bào (CFU/ml)	Đường vòng kính ức chế (mm)
1	Môi trường PD	$4,2 \times 10^8$	20,7	$5,6 \times 10^8$	22,6
2	Môi trường King'B	$2,41 \times 10^8$	18,2	$9,8 \times 10^7$	20,7
3	Môi trường PBS	$8,9 \times 10^7$	20,1	$3,5 \times 10^8$	19,4

Kết quả nuôi cấy trên 3 môi trường khác nhau cho thấy ở cả 2 chủng đều phát triển trên cả 3 môi trường, tuy nhiên có sự khác nhau rõ rệt

của mật độ bào tử ở những môi trường khác nhau. Ở môi trường PD cả 2 chủng đều có kết quả vượt trội. Chủng QI₁₆ đạt mật độ tế bào

hữu hiệu cực đại là $4,2 \times 10^8$ (CFU/ml) và đạt đường kính vòng ức chế đạt 20,7mm. Tuy nhiên chủng QI₂₄ đạt mật độ tế bào hữu hiệu là $5,6 \times 10^8$ (CFU/ml) gấp khoảng 50 lần so với khi nuôi cấy chúng ở môi trường PBS. Mật khác 2 chủng QI₁₆ và QI₂₄ đều phát triển rất tốt trên môi trường PD nhưng chủng QI₂₄ có khả năng phát triển vượt trội hơn, chủng này được lựa chọn cho sản xuất chế phẩm đa chủng vi sinh vật. Ngoài ra môi trường PD là loại môi trường phổ thông khi nuôi cấy và giá thành cạnh tranh tốt so với các loại môi trường khác.

3.2.2.3. Ảnh hưởng của thời gian nhân sinh khối đến mật độ tế bào vi khuẩn

Tốc độ phát triển của các loài vi khuẩn là khác nhau theo thời gian, có loài phát triển rất nhanh ở thời gian đầu và chậm lại ở thời gian sau, nhưng cũng có loài phát triển chậm ở thời gian đầu và tăng tốc rất nhanh ở thời gian sau. Vì vậy nghiên cứu thời gian đạt mật độ 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. Kết quả thí nghiệm ở các thời gian nuôi cấy khác nhau được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Ảnh hưởng của thời gian nhân sinh khối đến mật độ tế bào vi khuẩn.

STT	Thời gian nuôi cấy	Mật độ tế bào hữu hiệu của các chủng VK (CFU/ml)			
		QI ₁	QI ₈	QI ₁₆	QI ₂₄
1	48 giờ	$6,7 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	$8,2 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$
2	72 giờ	$1,3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$4,8 \times 10^8$	$5,6 \times 10^8$
3	96 giờ	$2,3 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
4	120 giờ	$5,8 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
5	144 giờ	$2,0 \times 10^8$	$3,8 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$	$7,2 \times 10^7$

Với các thời gian nhân sinh khối các chủng vi khuẩn khác nhau thì mật độ tế bào hữu hiệu đạt được là khác nhau. Trong 4 chủng đưa vào nghiên cứu kết quả cho thấy phần lớn các chủng đều theo quy luật thời gian tăng thì mật độ tế bào hữu hiệu tăng, đạt cực đại ở thời gian nhất định, sau đó mật độ tế bào lại giảm dần. Trong 2 ngày đầu (48 giờ) nuôi cấy mật độ tế bào vi khuẩn có trong 1ml dung dịch ở cả 4 chủng đều đạt thấp, chỉ từ $3,0 - 8,2 \times 10^7$ CFU/ml. Sau (72 giờ) có 2 chủng đạt tế bào hữu hiệu tối đa là các chủng QI₁₆, QI₂₄, với mật độ tế bào hữu hiệu đạt được là từ $4,8 - 5,6 \times 10^8$ CFU/ml. Tuy nhiên chủng QI₈ đạt mật độ tế bào hữu hiệu nhỏ thua (bằng 55%) so với tế bào hữu hiệu chủng QI₁ cùng trong thời gian 5 ngày đạt tế bào hữu hiệu cực đại (120 giờ).

Ngoài ra chủng QI₁₆ đạt mật độ tế bào hữu hiệu nhỏ thua (bằng 86%) so với tế bào hữu hiệu chủng QI₂₄ cùng trong thời gian 3 ngày (72 giờ) đạt tế bào hữu hiệu cực đại.

3.2.2.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường nhân sinh khối mật độ tế bào vi khuẩn

Sự phù hợp nhiệt độ của chủng vi khuẩn biểu hiện ở khả năng sinh trưởng của chúng (mật độ tế bào hữu hiệu trên 1ml dung dịch nuôi cấy là lớn nhất). Ở mỗi loài vi khuẩn thì sự phù hợp với các nhiệt độ là khác nhau để đảm bảo được mật độ tế bào hữu hiệu tối ưu. Thí nghiệm được thực hiện trên 8 chế độ nhiệt độ khác nhau 17°C, 20°C, 23°C, 25°C, 28°C, 30°C, 33°C và 35°C, kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 8.

Bảng 8. Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường nhân sinh khối đến mật độ tế bào VK

STT	Thời gian nuôi cấy	Mật độ tế bào hữu hiệu của các chủng VK (CFU/ml)			
		QI ₁	QI ₈	QI ₁₆	QI ₂₄
1	17°C	$2,7 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	$8,2 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$
2	20°C	$1,0 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$
3	23°C	$2,1 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
4	25°C	$4,8 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
5	27°C	$3,8 \times 10^8$	$2,8 \times 10^7$	$4,6 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$
6	30°C	$2,5 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
7	33°C	$1,3 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$
8	35°C	$1,4 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$

Thông qua kết quả ở bảng 8 cho thấy dù ở mức nhiệt độ nghiên cứu nào các chủng khuẩn cũng phát triển nhưng sự phát triển tế bào hữu hiệu cho kết quả là khác nhau. Ở ngưỡng nhiệt độ 25 - 27°C phần lớn các chủng vi khuẩn phát triển tốt. Ở các ngưỡng nhiệt độ thấp hơn dù các chủng vi khuẩn có phát triển nhưng rất chậm. Như chủng QI₁ ở khung nhiệt độ 17°C mật độ tế bào hữu hiệu chỉ đạt $2,7 \times 10^7$ CFU/ml, tuy nhiên khi ở mức nhiệt độ tối thích chúng phát triển (gấp 200 lần) đạt $4,8 \times 10^8$ CFU/ml khi ở mức nhiệt độ là 25°C. Khi nghiên cứu chủng QI₁₆ và chủng QI₂₄ cho thấy 2 chủng vi khuẩn kháng nấm này phát triển tốt nhất khi được nuôi ở khoảng nhiệt độ 25 - 27°C. Tuy

nhiên chúng đạt mật độ tế bào hữu hiệu cực đại khi được nuôi ở 27°C và tế bào giảm dần khi nuôi ở mức nhiệt độ cao hơn. Chủng QI₁₆ có số lượng tế bào hữu hiệu cao hơn chủng QI₂₄, tuy nhiên chủng QI₂₄ lại có biên độ phát triển rộng, biên độ tối thích của chúng thích hợp từ 20 - 35°C.

3.2.2.5 Ảnh hưởng của độ pH môi trường nhân sinh khối đến mật độ tế bào VK.

Độ pH của môi trường nuôi cấy rất quan trọng trong quá trình sinh trưởng và phát triển của các chủng vi sinh. Thí nghiệm được thực hiện ở 7 cấp độ pH là: 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5 và 8. Kết quả được trình bày ở bảng 9.

Bảng 9. Ảnh hưởng của độ pH đến mật độ tế bào VK

STT	PH	Mật độ tế bào hữu hiệu của các chủng VK (CFU/ml)			
		QI ₁	QI ₈	QI ₁₆	QI ₂₄
1	5,0	0	0	0	$2,9 \times 10^5$
2	5,5	$1,0 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	$1,8 \times 10^8$	$1,6 \times 10^7$
3	6,0	$1,8 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$
4	6,5	$2,3 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
5	7,0	$6,2 \times 10^8$	$5,5 \times 10^7$	$9,8 \times 10^8$	$7,2 \times 10^8$
6	7,5	$5,8 \times 10^8$	$5,7 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
7	8,0	$2,2 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$

Quá trình nhân sinh khối của vi sinh vật nói riêng và vi khuẩn nói chung cho thấy độ pH môi trường có ảnh hưởng lớn tới quá trình sinh

trưởng và phát triển của VK, thể hiện ở mật độ tế bào hữu hiệu trong 1ml dung dịch mà chúng đạt được. Trong trường hợp độ pH = 5, có 3

chúng phát triển kém, chủng QI₂₄ phát triển nhưng mật độ rất thấp chỉ đạt được $2,9 \times 10^5$ CFU/ml. Cả 4 chủng vi khuẩn này đều có mật độ tế bào cao hơn khi nuôi chúng ở những môi trường có độ pH khoảng từ 6,6 - 7,5. Chủng QI₁ đạt mật độ tế bào hữu hiệu cực đại khi được nuôi ở độ pH = 7 - 7,5 với trị số là $5,8 - 6,2 \times 10^8$ CFU/ml. Chủng QI₁₆ và QI₂₄ đạt mật độ tế bào hữu hiệu cực đại khi được nuôi ở độ pH = 7, với trị số là $7,2 - 9,8 \times 10^8$ CFU/ml.

3.3. Kết quả định danh đến loài các chủng VSV có hoạt tính cao

Thông qua kết quả nghiên cứu 2 chủng vi sinh vật tiềm năng nhất được lựa chọn đưa vào định

danh đến loài như sau: Chủng vi khuẩn sinh tổng hợp IAA là chủng QI₁, chủng vi khuẩn đối kháng nấm gây bệnh thối cổ rễ cây thông là chủng QI₂₄. ADN của các chủng vi khuẩn (QI₁, QI₂₄) được tách chiết, phân đoạn 16S rDNA của các vi khuẩn được khuếch đại PCR bằng cặp mồi 16S-8F và 16S1510R. ADN của phân đoạn 16S được giải trình tự bằng phương pháp ‘dideoxy chain termination’, các chuỗi ADN của các chủng vi sinh vật được so sánh độ tương đồng với các chuỗi ADN của các chủng vi khuẩn khác trên ngân hàng Gen (Genbank). Kết quả xác định các chủng VSV được trình bày ở bảng 10.

Bảng 10. Xác định tên các chủng VSV dựa trên trình tự phân đoạn 16S rDNA

TT	Chủng	Mã số trên Genbank	Độ tương đồng	Loài	Dữ liệu FIRI ¹
1	QI ₁	CP000839	100% (821/821 bp)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	VT320
2	QI ₂₄	EU557030	100% (753/753 bp)	<i>Bacillus subtilis</i>	VT322

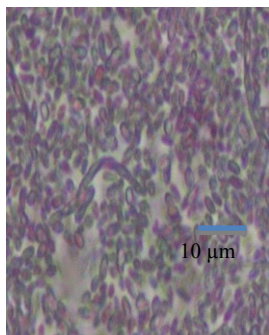
Qua bảng 10 cho thấy định danh đến loài được 1 chủng vi khuẩn QI₁ sinh tổng hợp IAA bằng phương pháp sinh học phân tử có tên khoa học là *Pseudomonas fluorescens*; 1 chủng vi khuẩn QI₂₄ đối kháng nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ thông bằng phương pháp sinh học phân tử có tên khoa học là *Bacillus subtilis*. Chủng QI₁ được xác định là loài *Pseudomonas fluorescens* với độ tương đồng lên đến 100%.

III. KẾT LUẬN

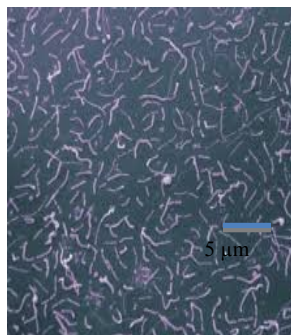
- Chọn được chủng QI₁ được xác định là loài *Pseudomonas fluorescens* khả năng sinh tổng hợp IAA đạt 11,872mg/l, khuẩn lạc có màu trắng đục, khuẩn lạc dày, mịn, mọc đều, có gram (-) tế bào hình hạt gạo dài, kích thước tế

bào $1,2 \times 3,4$ (µm). Chủng QI₁ phù hợp môi trường nuôi cấy gi đường, thời gian nuôi cấy là 120 giờ (5 ngày), nhiệt độ nuôi cấy tối thích là 25°C, độ pH thích hợp 7 - 7,5.

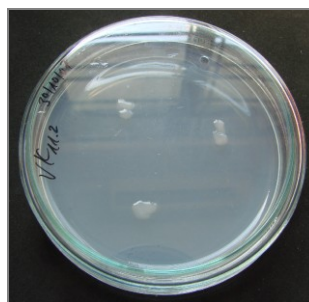
- Chọn được chủng QI₂₄ được xác định là loài *Bacillus subtilis* đối kháng nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ thông, sau 10 ngày có đường kính vòng ức chế nấm gây bệnh là 22mm, có phản ứng màu dương tính với thuốc thử Salkowski, khả năng sinh tổng hợp IAA đạt 5,312mg/l, khuẩn lạc chủng này màu xanh lam nhạt, khuẩn lạc dày, hơi sần, mọc lan, có gram (-) tế bào hình que ngắn, kích thước tế bào $0,7 \times 1,6$ (µm). Chủng QI₂₄ phù hợp môi trường nuôi cấy PD, thời gian nuôi cấy là 72 giờ (3 ngày), nhiệt độ nuôi cấy tối thích là 27°C, độ pH thích hợp 7.



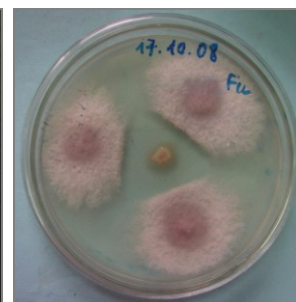
Hình 1. Tế bào vi khuẩn chủng QI₁ sinh tổng hợp IAA mạnh và có khả năng ức chế nấm gây bệnh



Hình 2. Tế bào vi khuẩn chủng QI₂₄ đối kháng nấm gây bệnh mạnh và có khả năng sinh tổng hợp IAA



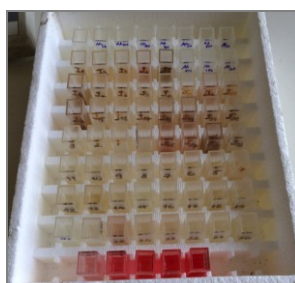
Hình 3. Khuẩn lạc chủng QI₁ sinh tổng hợp IAA



Hình 4. Chủng QI₂₄ đối kháng nấm *Fusarium oxysporum*, có V = 22,1mm



Hình 5. Biểu đồ đường chuẩn và kết quả đo nồng độ IAA



Hình 6. Ống nghiệm chứa dịch IAA



Hình 7. Các chủng vi khuẩn sinh tổng hợp IAA

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Barbieri, R. L., Makris, A., and Randall, R.W. Daniels, G, Kistner, R. W., and Ryan, K. J., 1986. "Insulin stimulates androgen accumulation in incubation of ovarian stroma obtained from women with hyperandrogenism". J. Clin. Endocrinol. Metab. 62,904 - 910.
2. Ruben Puga-Freitas, Samir Abbad, Agnès Gigon, Evelyne Garnier-Zarli, and Manuel Blouin., 2012. "Control of Cultivable IAA-Producing Bacteria by the Plant *Arabidopsis thaliana* and the Earthworm *Aporrectodea caliginosa*". Applied and Environmental Soil Science Volume, Article ID 307415, 4 pages
3. Jinwi Kim, 2000. Isolation and purification of antifungal compound and lactamase inhibitor from endophytic bacteria MS thesis, SNU
4. Đỗ Kim Nhung và Vũ Thành Công, 2011. "Khảo sát khả năng sinh tổng hợp IAA và cố định đạm của vi khuẩn *Gluconacetobacter* sp và *Azospirillum* sp. được phân lập từ cây Mía" Tạp chí Khoa học 2011:18a 161 - 167. Trường Đại học Cần Thơ.
5. Nguyễn Thị Huỳnh Như, Nguyễn Hữu Hiệp, Nguyễn Minh Đới, Trần Nguyễn Nhật Khoa và Thái Trần Minh Phương, 2013. "Phân lập các dòng vi khuẩn nội sinh có khả năng tổng hợp IAA và cố định đạm trên cây chuối" Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học: 27 (2013): 24 - 31. Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ.

Người thẩm định: PGS.TS. Phạm Quang Thu