

PHÂN LẬP CÁC DÒNG VI KHUẨN NỘI SINH ĐỂ SẢN XUẤT PHẦN VI SINH Ở QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM CHO CÂY MÍA TRỒNG TẠI TỈNH SÓC TRĂNG

Nguyễn Hữu Hiệp¹, Renato Fani², Lê Ngọc Thúy³, Ngô Bảo Ngọc⁴,
Trần thị Ngọc Tô⁴ và Phạm thị Khánh Vân¹

ABSTRACT

Twenty six endophytic isolates from roots, stems and leaves of twelve sugarcane cultivars grown in fields in Cu Lao Dung district and My Tu district of Soc Trang province were isolated. With PCR technique using specific primers of *nifH* gene of *Gluconacetobacter diazotrophicus*, we could identify fifteen strains. These strains have the same characteristics with the *G. diazotrophicus* species. Molass is a good carbon source for *G. diazotrophicus* especially at the concentration of 10g/l, *G. diazotrophicus* reached $6,7 \times 10^{10}$ CFU/ml after 6 days of incubation. Carriers containing of 50% of peat, 25% of filtercake, 25% of bagasse and 8% CaCO_3 supported the good survival of *G. diazotrophicus*. After two months of storing at room temperature the viable count was still high $5,3 \times 10^9$ CFU/g.

Keywords: Endophytic bacteria, sugarcane, PCR technique, primer, *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Title: Isolation of endophytes for the production of biofertilizer at lab scale for the cultivation of sugarcane in Soc Trang province

TÓM TẮT

Hai mươi sáu dòng vi khuẩn nội sinh đã được phân lập từ lá, thân và rễ của mười hai giống mía trồng tại huyện Cù Lao Dung và huyện Mỹ Tú, Tỉnh Sóc Trăng. Sử dụng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu thiết kế dựa trên trình tự gen *nif H* của *Gluconacetobacter diazotrophicus*, chúng tôi nhận diện được mười lăm dòng vi khuẩn *G. diazotrophicus*. Các dòng có các đặc điểm hoàn toàn phù hợp với những nghiên cứu trước đây về vi khuẩn *G. diazotrophicus*. Nguồn carbon thích hợp cho sự tăng trưởng của vi khuẩn *G. diazotrophicus* là rỉ đường (10g/l, 5g/l, 2,5g/l), đặc biệt là nghiệm thức rỉ đường 10g/l cho mật số cao nhất ($6,7 \times 10^{10}$ CFU/ml) sau 6 ngày nên được chọn là nguồn carbon sử dụng trong môi trường nuôi vi khuẩn thu sinh khối. Thành phần chất mang 50% than bùn + 25% bã bùn mía + 25% xác mía + 8% CaCO_3 giúp vi khuẩn sống sót cao nhất, mật số vi khuẩn đạt $5,3 \times 10^9$ CFU/g chất khô khi bảo quản sản phẩm trong 2 tháng ở nhiệt độ phòng (28-30°C).

Từ khóa: vi khuẩn nội sinh, mía, kỹ thuật PCR, mồi, *Gluconacetobacter diazotrophicus*

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Để đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng về lương thực, mức tiêu thụ của thế giới về đạm, lân, kali đã tăng dần từ 112 triệu tấn năm 1980 đến 143 triệu tấn năm 1990

¹ Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Đại học Cần Thơ.

² Bộ môn Sinh học Động vật và Di truyền, Đại học Florence, Ý.

³ Sinh viên Công nghệ Sinh học K 27

⁴ Sinh viên Công nghệ Sinh học K 28

(Lauriente, 1995). Nhu cầu N ngày càng tăng, lượng urê sản xuất trong nước không thể cung ứng đủ, vì vậy Việt Nam phải nhập khẩu phân urê từ nước ngoài. Bón quá nhiều đạm hoá học gây ô nhiễm môi trường. Sử dụng đạm sinh học còn giúp tiết kiệm chi phí rất nhiều so với đạm hoá học. Trước đây, đa số nghiên cứu về sự cố định đạm đều được tiến hành trên cây họ đậu. Nhưng nguồn lương thực, thực phẩm thế giới lại phụ thuộc chủ yếu vào các cây thuộc họ hoà bản (mía, lúa, bắp) nên trong ba thập kỷ gần đây, những nghiên cứu về cố định đạm của các nhóm không cộng sinh với cây họ đậu mới được quan tâm. Vi khuẩn *Gluconacetobacter diazotrophicus* (*G. diazotrophicus*), một vi sinh vật cố định đạm đầy hứa hẹn của vùng nhiệt đới (Muthukumarasamy *et al.*, 2002) nội cộng sinh ở mía và một số cây trồng khác (bắp, lúa, cà rốt...) được phân lập và nhận diện, hướng tới việc sản xuất phân đạm sinh học cho các cây lương thực không thuộc họ đậu trong tương lai, như là một giải pháp để nâng cao năng suất nông nghiệp, hạn chế ô nhiễm môi trường và giảm thiểu những chi phí do việc bón đạm hoá học gây ra. Chúng tôi chọn địa điểm lấy mẫu là Huyện Cù Lao Dung và Huyện Mỹ Tú, Tỉnh Sóc Trăng vì đây là hai vùng mía nguyên liệu lớn nhất tỉnh và khu vực phía Tây sông Hậu. Năm 2005, diện tích mía tại Sóc Trăng chiếm 4,77% diện tích cả nước, trong đó chỉ riêng 2 Huyện Cù Lao Dung và Mỹ Tú, diện tích trồng mía đã vào khoảng 3,98% diện tích cả nước (Niên giám thống kê của Tỉnh Sóc Trăng, 2005). Với ưu thế đất đai màu mỡ, được phù sa bồi đắp quanh năm, độ pH khoảng 4,2 - 4,5 ở tầng đất mặt và 5,5 - 6,0 khi xuống sâu 0,5 - 1,2m (www.agroviet.gov.vn) nên huyện Cù Lao Dung và huyện Mỹ Tú có rất nhiều thuận lợi trong công nghiệp sản xuất mía đường, diện tích mía mở mới ở 2 huyện này ngày càng gia tăng. Vì thế, đề tài “ **Phân lập các dòng vi khuẩn nội sinh và sản xuất phân vi sinh ở quy mô phòng thí nghiệm cho cây mía trồng tại Tỉnh Sóc Trăng**” đã được chúng tôi chọn để thực hiện.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện nghiên cứu

2.1.1 Địa điểm

Phòng thí nghiệm Vi Sinh Vật, Viện Nghiên Cứu và Phát Triển Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại Học Cần Thơ.

2.1.2 Mẫu vật

Rễ, thân, lá của các giống mía trồng ở huyện Cù Lao Dung và huyện Mỹ Tú, Tỉnh Sóc Trăng. Than bùn U Minh có pH = 4,3; chất hữu cơ, 12,4%; đạm tổng số, 0,3; lân tổng số, 0,047; Bã bùn mía (nguồn: Công ty mía đường Sóc Trăng) có pH=6,7; chất hữu cơ, 50,8%; đạm tổng số, 2,32%; lân dễ tiêu, 5,29 mg/100g và kali trao đổi, 1,79 meq/100g.

Bộ micropipet: 500-1.000 µl và 20-200 µl, đầu cone (vàng, xanh), Máy lắc GFL, máy ly tâm Heraeus, máy ly tâm chân không Eppendorf concentrator 5301, Máy PCR Apollo ATC 401, Máy đo OD Beckman DU-600, Bộ điện di Embi-Tec, máy chụp gel Biorad UV 2000.

2.1.3 Hóa chất

Môi trường LGIP không đậm (Cavalcante & Dobereiner, 1988) trong một lít nước cất (pH=5,5) gồm: sucrose, 100g; K₂HPO₄, 0,2g ; KH₂PO₄, 0,6g; MgSO₄.7H₂O, 0,2g ; CaCl₂.2H₂O, 0,02g; Na₂MO₄.2H₂O, 0,002g và FeCl₃.6H₂O, 0,01 g; bromothymol blue 500ml (0,5% trong 0,2 M KOH), PCR buffer, dNTP, DNA template, MgCl₂, Taq polymerase, cặp primer đặc hiệu có trình tự như sau: 5' – TTA TGG AAA GGG AGG AAT CGG – 3' (mũi xuôi) và 5' – AGC GCT GCC GCG GCC TTG – 3' (mũi ngược) được thiết kế dựa vào trình tự gen *nifH* của *G. diazotrophicus* theo genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Thu thập mẫu

Thu hoạch toàn bộ cây mía . Đào vùng đất quanh rễ mía đến độ sâu 25-30cm. Dùng bọc nylon trữ tạm thời toàn bộ rễ, thân, lá đem về phòng thí nghiệm để tiến hành các bước tiếp theo.

2.2.2 Phân lập *G. diazotrophicus*

Lá và rễ sau khi được rửa sạch bằng nước máy sẽ được cắt thành nhiều mảnh nhỏ khoảng 2 cm rồi tiếp tục khử trùng bề mặt bằng Tween 20% (10'), H₂O₂ 6% (10') và cồn 70° (5'). Cuối cùng rửa lại 5 lần bằng nước cất. Rễ, lá đã qua khử trùng sẽ được giã nhuyễn trong cối để thu lấy dịch trích. Đối với thân thì tiến hành rửa sạch bằng nước máy và xả phòng rồi tách bỏ vỏ, ép lấy phần nước mía để phân lập. Dùng micropipet hút lấy phần dịch trích cho vào eppendorf 2 ml, pha loãng 10 lần. Rút 10 µl dịch trích đã pha loãng cho vào ống nghiệm chứa môi trường LGIP bán đặc đã khử trùng đem ủ ở nhiệt độ 30°C. Khoảng 3 ngày sau thấy xuất hiện một lớp màng mỏng màu vàng cam gần bề mặt môi trường. Hút 10 µl tại lớp màng mỏng này cho vào mỗi đĩa petri môi trường LGIP đặc không đậm, ria cây làm rỗng. Sau 3 ngày chọn những đĩa petri có xuất hiện khuẩn lạc màu vàng cam đặc trưng trên bề mặt môi trường để tách riêng ra. Sau đó đem cấy chuyển nhiều lần vào môi trường đặc LGIP không đậm để làm rỗng dòng vi khuẩn.

2.3 Khảo sát một số đặc điểm vi khuẩn

Mô tả hình dạng, màu sắc và đường kính khuẩn lạc. Quan sát hình dạng, sự chuyển động, kích thước tế bào, xác định Gram của vi khuẩn.

2.4 Nhận diện vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR

Sử dụng cặp môi chuyên biệt cho *G. diazotrophicus* để nhận diện các dòng vi khuẩn này. Nuôi vi khuẩn trong môi trường LGIP lỏng (3 ml/ống) trên máy lắc. Trích ADN, rồi tiến hành phản ứng PCR với cặp môi đặc hiệu được thiết kế dựa trên trình tự gen *nifH* của vi khuẩn *G. diazotrophicus* để nhân lên một đoạn 800 bp tương đồng hiện diện ở các dòng *G. diazotrophicus*. Thành phần trong mỗi tube PCR 50 µl gồm: H₂O cất 2 lần, 10 µl, PCR buffer (Fermentas), 2,5 µl, MgCl₂ 25 mM, 3 µl, dNTPs, 4 µl, 0.1% BSA, 0,25 µl, Taq V₀₇, 0,25 µl, Môi, 2 µl, V_{ADN}, 3 µl. Chu kỳ PCR gồm 95°C (5'), sau đó 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm: 95°C (1'), 50°C (1'), 72°C (1'), 72°C (10'), giữ lại ở 4°C. Điện di các sản phẩm PCR trên gel agarose để xác định vi khuẩn phân lập được có phải là các dòng *G. diazotrophicus*.

2.5 Xác định nguồn carbon thích hợp để nuôi cấy vi khuẩn thu sinh khối

Thí nghiệm gồm 10 nghiệm thức được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Trong đó nghiệm thức 1 là đối chứng (không bổ sung nguồn carbon), 3 nguồn carbon là sucrose, glucose và ri đường ở 3 nồng độ 2,5; 5,0 và 10g/l. Mỗi bình tam giác chứa 50ml môi trường LGIP lỏng theo các nghiệm thức như trên đem khử trùng nhiệt ướt ở 121⁰C, 1atm trong 15 phút. Chủng vi khuẩn *G. diazotrophicus* (1ml/bình) vào các bình tam giác và đặt lên máy lắc vận tốc 150 vòng/phút. Theo dõi pH, mật số vi khuẩn ở các thời điểm ngày 0, 2, 4 và 6. Mỗi lần lấy 6ml mẫu, 5ml để đo pH, 1ml để xác định mật số bằng phương pháp đếm sống.

2.6 Xác định chất mang thích hợp để sản xuất phân vi sinh từ nguồn nguyên liệu sẵn có trong nước

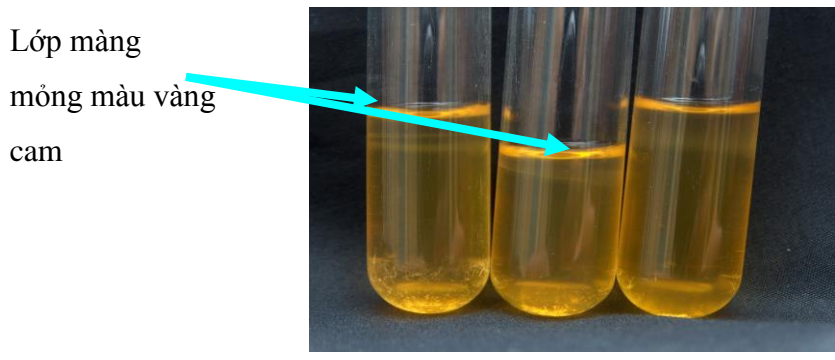
Thí nghiệm gồm 7 nghiệm thức chất mang được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, với 4 lần lặp lại. Các nghiệm thức gồm 100% than bùn (TB); 100% bã bùn mía (BBM), 100% xác mía (XM), 50% TB + 50% BBM, 50% TB + 50% XM, 50% BBM + 50% XM, 50% TB + 25% XM + 50% BBM. Sử dụng CaCO₃ để điều chỉnh pH =6,8. 100g hỗn hợp chất mang/túi khử trùng nhiệt ướt cách nhật ở 121⁰C, 1atm. Vi khuẩn nuôi đạt mật số 10⁹ tế bào/ml chủng vào mỗi túi nylon sao cho đạt độ ẩm 50% rồi hàn kín miệng túi. Trữ mẫu ở điều kiện nhiệt độ phòng 28-30⁰C. Theo dõi mật số vi khuẩn tại các thời điểm: mới chủng (tuần 0), 1, 2, 3, 4, 6 và tuần 8. Mỗi lần lấy 5g mẫu cho vào bình tam giác (chứa 95ml nước cất đã khử trùng), lắc đều trên máy lắc trong 10 phút rồi tiến hành pha loãng rồi đếm mật số tế bào vi sinh vật bằng phương pháp đếm sống.

Số liệu sau khi thu thập được xử lý bằng Excel. Phân tích thống kê bằng phần mềm MSTATC 1.20, vẽ biểu đồ bằng Microsoft Excel.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập

Sau khi chủng dịch trích vi khuẩn vào môi trường bán đặc LGIP một lớp màng mỏng màu vàng cam gần bề mặt môi trường sẽ xuất hiện (Hình 1).



Hình 1: Lớp màng mỏng màu vàng cam trên môi trường bán đặc LGIP

Từ màng mỏng này chúng tôi phân lập được 26 dòng vi khuẩn, đặt tên theo thứ tự từ 1 đến 20: Gn1, Gn2... Gn20. Trong số 26 dòng này có 11 dòng ở huyện Mỹ Tú,

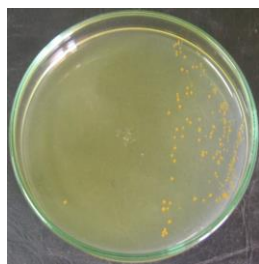
15 dòng còn lại thuộc huyện Cù Lao Dung. Trong 26 dòng này có 11 dòng vi khuẩn được phân lập từ rễ, 7 dòng được phân lập từ thân và 8 dòng thu được từ lá.

3.2 Đặc điểm khuẩn lạc

Các khuẩn lạc đều có dạng tròn, bìa nguyên, lồi. Đường kính trung bình là 1,14 mm. Đa số khuẩn lạc có màu vàng cam giống như mô tả của Cavalcante và Dobereiner (1988), Ingrid H. Franke *et al.* (1999), một số dòng lại có khuẩn lạc màu vàng nhạt.

3.3 Đặc điểm vi khuẩn

Tất cả các dòng vi khuẩn đều chuyển động và có gram âm. 22 dòng vi khuẩn có dạng que ngắn, 4 dòng có dạng que dài. Kích thước biến thiên từ 1,539-2,565 μm x 0,513-0,855 μm . Kết quả này giống sự mô tả của Cavalcante và Dobereiner về *G. diazotrophicus* (1988).

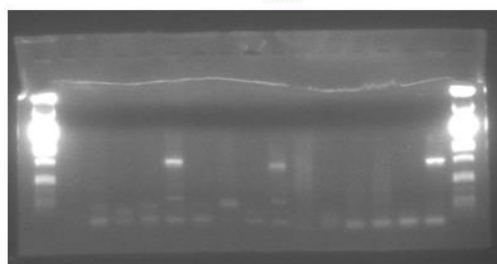


Hình 2: Dạng khuẩn lạc màu vàng cam

3.4 Nhận diện vi khuẩn *G. diazotrophicus* bằng kỹ thuật PCR

Chúng tôi đã nhận diện được 15/26 dòng đã phân lập là vi khuẩn *G. diazotrophicus*, các dòng này tạo băng ADN nằm đúng vị trí 800bp giống như dòng đối chứng *G. diazotrophicus* G44639. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Kollofel B *et al.* (1997), Madhaiyan M *et al.* (2004). Một số dòng tạo băng không nằm đúng vị trí 800 bp, số khác không xuất hiện băng chứng tỏ không thuộc loài *G. diazotrophicus*.

T 1 2 3 4 5 6 7 8 9,10 11 12 13 14 15 T



Hình 3: Kết quả điện di một số dòng vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR

T: Thang chuẩn Λ_{pstI} . 1: Gn1, 2: Gn2, 3: Gn3, 4: Gn6, 5: Gn4, 6: Gn7, 7: Gn10, 8: Gn11, 9: Gn9, 10: Gn12, 11: Gn13, 12: Gn14, 13: Gn15, 14: Gn16 và 15: Đối chứng dương G44639.

Hai dòng Gn4 và Gn9 tuy đều thu được từ thân của cùng một giống mía nhưng địa điểm lấy mẫu của từng dòng lại nằm ở 2 huyện khác nhau (Gn4 thu được từ cây mía trồng tại huyện Cù Lao Dung còn Gn9 thu được từ mía trồng ở huyện Mỹ Tú), kích thước của 2 dòng này cũng hoàn toàn khác nhau, đường kính khuẩn lạc cũng không giống nhau. Từ đó, chúng tôi kết luận tạm thời rằng 2 dòng Gn4 và Gn9 có thể là 2 dòng khác nhau của *G. diazotrophicus*. Tuy nhiên, để xác định chính xác được chúng là cùng một dòng *G. diazotrophicus* hay khác dòng thì cần tiến hành giải trình tự của chúng.

3.5 Sự phát triển của vi khuẩn *G. diazotrophicus* trong môi trường có nguồn carbon khác nhau

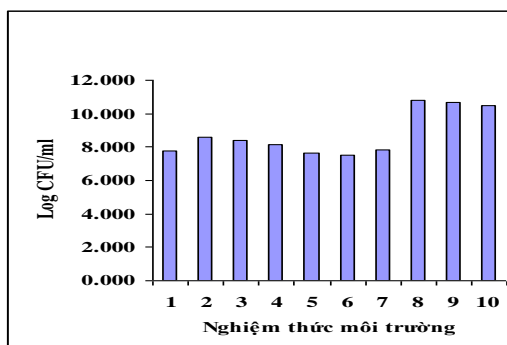
Kết quả thí nghiệm cho thấy, số lượng vi khuẩn ban đầu (ngày 0) chủng vào khoảng $2,35 \times 10^7$ CFU/ml thì không có khác biệt giữa các nghiệm thức, nhưng sau 2, 4, 6 ngày nuôi thì các nghiệm thức có khác nhau ở mức ý nghĩa 5%. Sau 2 ngày nuôi ta thấy mật số vi khuẩn đều tăng lên nhưng có khác biệt nhau giữa các nghiệm thức ở mức ý nghĩa 5%. Ba nghiệm thức 8 (rỉ đường 10g/l), nghiệm thức 9 (rỉ đường 5g/l) và nghiệm thức 10 (rỉ đường 2,5g/l) có mật số cao nhất (5×10^9 CFU/ml) so với các nghiệm thức còn lại nhưng giữa các nồng độ rỉ đường thì không có sự khác biệt. Mật số vi khuẩn ở các nghiệm thức sucrose (nghiệm thức 2, 3, 4) thấp hơn các nghiệm thức rỉ đường. Trong đó nghiệm thức 2 (sucrose 10g/l) có mật số cao hơn ($2,5 \times 10^8$ CFU/ml) và khác biệt ý nghĩa với nghiệm thức 3 (sucrose 5g/l), nghiệm thức 4 (sucrose 2,5g/l). Các nghiệm thức 6 (glucose 5g/l), nghiệm thức 7 (glucose 2,5g/l) có mật số vi khuẩn thấp hơn nữa ($7,5 \times 10^7$ CFU/ml) và khác biệt rõ với đối chứng (không bổ sung nguồn carbon), nghiệm thức glucose, 10g/l có mật số vi khuẩn thấp nhất ($3,1 \times 10^7$ CFU/ml). Ở ngày 4 mật số vi khuẩn tiếp tục tăng nhanh, thời điểm này đang ở giai đoạn tăng trưởng log của vi khuẩn. Mật số cao nhất đã lên tới $1,7 \times 10^{10}$ CFU/ml ở nghiệm thức có glucose 5g/l. Mật số vi khuẩn ở ngày 4 vẫn có khác biệt giống như ngày 2 nhưng ở các nghiệm thức, 6 và 7 thì mật số đã bắt đầu giảm ít. Ở ngày 6 ta thấy mật số vi khuẩn vẫn còn tăng ít ở nghiệm thức 8, 9, 10, 2, 3, 4. Còn ở các nghiệm thức 1, 5, 6, 7 thì mật số vi khuẩn đã giảm (Hình 4).

pH môi trường thay đổi theo sự tăng trưởng của vi khuẩn. Khi vi khuẩn *G. diazotrophicus* càng phát triển mạnh thì pH càng tăng và ngược lại (Hình 5). Vi khuẩn *G. diazotrophicus* phát triển mạnh nhất trong môi trường có rỉ đường (ở cả 3 nồng độ thì mật số vi khuẩn khác biệt nhau không ý nghĩa). Trong môi trường có sucrose vi khuẩn *G. diazotrophicus* vẫn phát triển tốt, trong đó tốt nhất là sucrose 10%.

Môi trường có glucose không thích hợp cho sự phát triển của vi khuẩn *G. diazotrophicus*. Nồng độ glucose càng cao thì vi khuẩn càng kém phát triển (Hình 6).

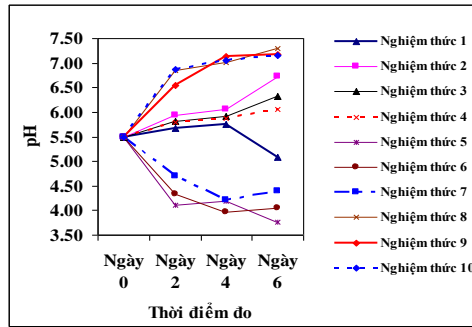
Theo R. Muthukumarasamy *et al.* (2002) thì bản thân vi khuẩn *G. diazotrophicus* có thể tự tạo ra được một lượng nhỏ đường (sucrose, glucose) hoặc acid malate, citrate,... để sử dụng như nguồn năng lượng nên mật số vi khuẩn ở nghiệm thức đối chứng không khác biệt so với các nghiệm thức có glucose.

Tóm lại, nguồn carbon được chọn để nuôi vi khuẩn *G. diazotrophicus* thu sinh khối là rỉ đường 10% với mật số cao nhất đạt được là $6,7 \times 10^{10}$ CFU/ml.



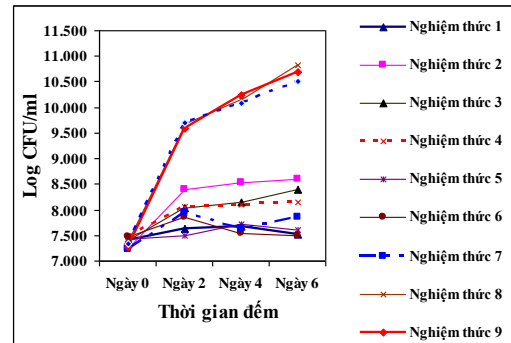
Hình 4: Mật số vi khuẩn *G. diazotrophicus* 6 ngày sau khi nuôi

Ghi chú: 1: đối chứng; 2: sucrose 10g/l; 3: sucrose 5g/l; 4: sucrose 2,5g/l; 5: glucose 10g/l; 6: glucose 5g/l; 7: glucose 2,5g/l; 8: rỉ đường 10g/l; 9: rỉ đường 5g/l và 10: rỉ đường 2,5g/l.



Hình 5: Sự biến đổi pH của môi trường nuôi có nguồn carbon khác nhau

Ghi chú: 1: đối chứng; 2: sucrose 10g/l; 3: suc.5g/l; 4: suc. 2,5g/l; 5: glucose 10g/l; 6: glu.5g/l; 7: glu. 2,5g/l; 8: ri đường 10g/l; 9: ri đường 5g/l và 10: ri đường 2,5g/l.



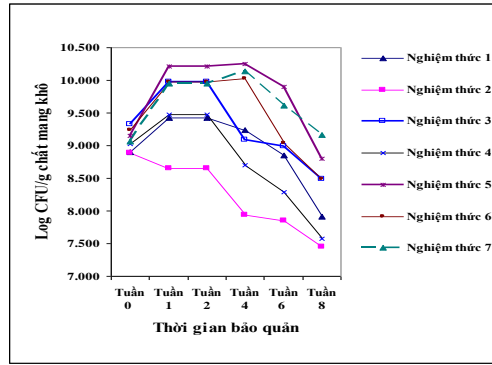
Hình 6: Sự phát triển của vi khuẩn ở các nguồn carbon khác nhau

Ghi chú: 1: sucrose 10g/l; 2: suc. 5g/l; 3: suc 2,5g/l; 4: glucose 10g/l; 5: glu. 5g/l; 6: glu. 2,5g/l; 7: ri đường 10g/l; 8: ri đường 5g/l; 9: ri đường 2,5g/l.

3.6 Ảnh hưởng của các nguồn chất mang lên sự sống sót và phát triển của vi khuẩn *G. diazotrophicus*

Kết quả thí nghiệm cho thấy mật số vi khuẩn ban đầu (tuần 0) chủng vào các nghiệm thức chất mang là tương đương nhau (khoảng 10^9 CFU/g chất khô). Khi bảo quản ở nhiệt độ phòng ($28 - 30^{\circ}\text{C}$) thì mật số vi khuẩn từ tuần 1 đến tuần 8 ở tất cả các nghiệm thức đều khác biệt nhau ở mức ý nghĩa 1%. Các nghiệm thức có thành phần chất mang là xác mía (nghiệm thức 3, 5, 6, 7) có mật số luôn cao hơn các nghiệm thức không có xác mía (nghiệm thức 1, 2, 4). Do xác mía có khả năng giữ ẩm tốt, độ ẩm luôn cao nên thích hợp cho sự sống sót và phát triển của vi khuẩn hơn các nghiệm thức không có thành phần này. Theo Panlada Tittabutr *et al.* (2002) thì *Rhizobium* cũng tăng trưởng tốt trong các chất mang có ẩm độ cao đặc biệt là các chất mang ở dạng dung dịch. Ngoài ra, trong xác mía còn chứa một lượng đường sucrose thừa giúp cho sự phát triển của vi khuẩn *G. diazotrophicus*. Từ tuần 1 đến tuần 2 thì mật số vi khuẩn tăng đều ở hầu hết các nghiệm thức, cao nhất là nghiệm thức 3 ($1,1 \times 10^{10}$ CFU/g chất mang). Riêng nghiệm thức 2 thì mật số vi khuẩn giảm. Đến tuần 4 thì mật số vi khuẩn ở các nghiệm thức 1, 2, 3, 4 đã giảm, ở nghiệm thức 6 mật số vẫn không đổi, còn mật số ở nghiệm thức 5, 7 vẫn tiếp tục tăng (đạt khoảng $1,2 \times 10^{10}$ CFU/g chất mang). Từ tuần 6 đến tuần 8 thì mật số vi khuẩn đã giảm ở tất cả các nghiệm thức. Tuy nhiên nghiệm thức 7 có mật số cao nhất ($5,3 \times 10^9$ CFU/g chất mang). Nghiệm thức 2 có mật số thấp nhất là $1,7 \times 10^6$ CFU/g chất mang (Hình 7).

Như vậy qua 8 tuần bảo quản phân ở nhiệt độ phòng ta thấy nghiệm thức 7 có thành phần chất mang thích hợp nhất cho sự sinh trưởng của vi khuẩn *G. diazotrophicus* đạt mật số $5,3 \times 10^9$ CFU/g chất mang. Kế đến là các nghiệm thức 5, 6, 3 có mật số vi khuẩn khác biệt nhau khoảng 3×10^8 CFU/g chất mang. Các nghiệm thức 1, 2, 4 cũng có sự khác biệt rõ và đều có mật số thấp khoảng 10^6 CFU/g chất mang. Vì vậy nguồn chất mang tốt nhất được lựa chọn gồm các thành phần: 50% than bùn + 25% bã bùn + 25% xác mía.



Hình 7: Mật số vi khuẩn trong thời gian bảo quản ở nhiệt độ phòng

Ghi chú: 1: than bùn 100%; 2: bã bùn mía 100%; 3: xác mía 100%; 4: than bùn 50% + bã bùn mía 50%; 5: than bùn 50% + xác mía 50%; 6: bã bùn mía 50% + xác mía 50%; 7: than bùn 50% + xác mía 25% + bã bùn mía 25%

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1 Kết luận

Chúng tôi đã phân lập và nhận diện được 26 dòng vi khuẩn từ các mẫu mía thu ở 2 huyện Cù Lao Dung và Mỹ Tú, Tỉnh Sóc Trăng. Sau khi xác định bằng kỹ thuật PCR và điện di, chúng tôi đã xác định được 15 dòng thuộc loài *G. diazotrophicus* do xuất hiện băng ADN nằm ở vị trí 800 bp giống với đối chứng dương, các dòng còn lại không phải là *G. diazotrophicus* vì không xuất hiện băng. Về hình dạng, kích thước vi khuẩn; màu sắc, hình dạng khuẩn lạc hoàn toàn phù hợp với những mô tả trước đây về *G. diazotrophicus*.

Nguồn carbon thích hợp cho sự phát triển của vi khuẩn *G. diazotrophicus* là rỉ đường. Vi khuẩn đạt mật số cao nhất ở nồng độ 10% rỉ đường được chọn để nuôi vi khuẩn thu sinh khối dùng trộn vào chất mang sản xuất phân vi sinh.

Thành phần chất mang thích hợp nhất cho sự sinh trưởng của vi khuẩn *G. diazotrophicus* là 50% than bùn + 25% bã bùn + 25% xác mía.

Thời gian tồn trữ vi khuẩn *G. diazotrophicus* với thành phần chất mang này ở nhiệt độ phòng là 2 tháng vi khuẩn vẫn đạt mật số hơn 10^9 CFU/g chất mang.

4.2 Đề nghị

Vì thời gian và kinh phí có hạn nên chúng tôi chưa tiến hành kiểm tra các dòng không phải *G. diazotrophicus* bằng những đoạn môi chuyên biệt của các loài vi khuẩn khác. Đề nghị tiếp tục kiểm tra bằng phương pháp PCR đối với các dòng này xem chúng thuộc loài vi khuẩn nào.

Đối với các dòng đã xác định là loài *G. diazotrophicus* thì tiến hành giải trình tự nucleotide của chúng để xem chúng có trình tự nucleotide giống hay khác nhau.

Nghiên cứu các nguồn dinh dưỡng khác thích hợp cho sự phát triển của vi khuẩn *G. diazotrophicus* như đạm, khoáng...

Nghiên cứu thêm về thời gian và nhiệt độ tồn trữ thích hợp để có thể giữ sản phẩm lâu hơn đáp ứng yêu cầu thị trường.

Đánh giá hiệu quả của loại phân vi sinh này trên cây mía ở điều kiện ngoài đồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cavalcante VA and Dobereiner J. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil* 108: 23-31.
- Dobereiner J., Reis J. and Lazarini A.C. 1988. New nitrogen fixing bacteria in association with cereals and sugarcane. In: *Nitrogen fixation: Hundred Years After* (Bothe H., de Bruijin F.J. and Newton W.E. eds), Grusav Fisher, Stuttgart, pp.712-722.
- <http://www.agroviet.gov.vn>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>
- Ingrid H. Franke, Mark Fegan, Chris Hayward, Graham Leonard, Erko Stackebrandt and Lindsay I. Sly. 1999. Description of *Gluconacetobacter sacchari* sp. nov.-a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugarcane and from the pink sugarcane mealy bug. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1681-1693.
- Lauriente Donald H.1995. World fertilizer overview. *Chemical Economics Handbook*, Institute, SR, ed. SRI, Menlo Park, CA, 67: 69.
- Muthukumarasamy. R, G.Revathi, S.Seshadri and C.Lakshminarasimhan. 2002. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics, *Current science*, 83 (2) : 138-139.