



PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH CÁC DÒNG VI KHUẨN BẢN ĐỊA CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY THUỐC KÍCH THÍCH RA HOA ACLOBUTRAZOL TỪ ĐẤT VƯỜN TRỒNG CÂY ĂN TRÁI Ở MỘT SỐ TỈNH ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Đặng Phạm Thu Thảo¹, Đỗ Thị Xuân², Dương Minh Viễn² và Nguyễn Khởi Nghĩa²

¹ Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 14/03/2014

Ngày chấp nhận: 30/06/2014

Title:

Isolation of native bacterial strains having a degradation capacity for PBZ originate from orchard gardens in some provinces of Mekong Delta, Vietnam

Từ khóa:

Chất kích thích ra hoa, Pacllobutrazol, phân hủy sinh học, vi khuẩn phân lập

Keywords:

Bacterial isolates, biodegradation, Pacllobutrazol, plant flowering regulator

ABSTRACT

To find out bacterial isolates having ability to degrade Pacllobutrazol (PBZ), a plant flowering regulator, four soil samples were collected from four different orchard gardens located in Cho Lach, Ben Tre; Cai Lay, Tien Giang and Phong Dien, Can Tho (2 samples) where farmers have intensively applied PBZ in their gardens for a long history. Bacteria from soil samples were enriched in minimal salt medium (MSM) containing PBZ as a only carbon source for bacteria's growth. Thirty bacterial strains were isolated from the enrichment step. Eight out of 30 isolates were selected to examine their degradation capacity for PBZ in MSM liquid media containing 15 ppm of PBZ for 15 days in the dark at room temperature on a shaker. Results from experiment showed that among 8 tested bacterial strains, only 2 bacterial isolates coded as CT2-29 and CT3-18 revealed their high degradation capacity for PBZ. After 15 incubation days, 15,53% and 16,41% of the initially applied PBZ concentration were degraded by CT2-29 and CT3-18, respectively and the results of the 16S rRNA gene sequence analysis showed that these 2 PBZ degrading bacterial strains were genetically identified as species of Burkholderia sp. CT2-29 and Burkholderia cepacia CT3-18, respectively.

TÓM TẮT

Để tìm ra các dòng vi khuẩn bản địa có khả năng phân hủy thuốc kích thích ra hoa cây trồng Pacllobutrazol (PBZ), bốn mẫu đất được thu thập từ bốn vườn trồng cây ăn trái ở 3 địa điểm như sau: Chợ Lách, Bến Tre; Cai Lay, Tiền Giang và Phong Điền, Cần Thơ (2 mẫu), là các mẫu đất thuộc các vườn cây ăn trái đã sử dụng lâu dài và thường xuyên Pacllobutrazol trong quá trình canh tác. Qua quá trình làm giàu mật số vi khuẩn và phân lập trong môi trường khoáng tối thiểu loãng chứa PBZ như nguồn carbon duy nhất cho sự phát triển của vi khuẩn, tổng cộng 30 dòng vi khuẩn được phân lập. Tám trong số 30 dòng vi khuẩn trên được kiểm tra khả năng phân hủy PBZ của chúng trong môi trường khoáng tối thiểu (MM) có bổ sung 15 ppm PBZ trên máy lắc, trong điều kiện phòng thí nghiệm và trong tối trong 15 ngày. Kết quả thí nghiệm cho thấy chỉ có 2 dòng vi khuẩn kí hiệu CT2-29 và CT3-18 có khả năng phân hủy PBZ cao hơn các nghiệm thức còn lại và phân hủy lần lượt là 15,53% và 16,41% của nồng độ PBZ ban đầu (15 ppm). Kết quả giải mã trình tự đoạn gen 16S rRNA cho thấy 2 dòng vi khuẩn này được định danh lần lượt như là Burkholderia sp. CT2-29 và Burkholderia sp. CT3-18.

1 MỞ ĐẦU

Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) có tổng diện tích trồng cây ăn trái khoảng 288,3 nghìn hecta, chiếm 34,6% tổng diện tích cây ăn trái của cả nước. Vấn đề thị trường nông sản thường không ổn định và rất bất bình vì nhà vườn không thể định giá cho nông sản. Do đó, thường xảy ra hiện tượng “được mùa mất giá”. Vì vậy, sản xuất nông sản trong vụ nghịch rất được quan tâm. Bên cạnh các kỹ thuật canh tác giúp kích thích ra hoa trái vụ, các nhà khoa học thuộc khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ đã bắt đầu tập trung nghiên cứu biện pháp kích thích ra hoa trái vụ cho cây ăn trái bằng chất hóa học (Trần Văn Hậu và *ctv.*, 2005).

Pacllobutrazol (PBZ) là hợp chất hóa học xử lý được đánh giá là có hiệu quả cao trong việc xử lý ra hoa cây ăn trái (Trần Văn Hậu và *ctv.*, 2001; Nguyễn Việt Khởi và Nguyễn Bảo Vệ, 2004). Từ đó đến nay, PBZ đã được bán và tiêu thụ rộng rãi trong khu vực và được nông dân dùng ở nồng độ rất cao lên đến 1.000-1.500 ppm. Hiện tại, nông dân còn tưới trực tiếp vào gốc cây để kích thích ra hoa với nồng độ lên đến 5,0 g hoạt chất cho 1 m đường kính (Trần Văn Hậu và *ctv.*, 2005). Việc lưu tồn một lượng lớn PBZ trong môi trường đất và nước là điều không thể tránh khỏi vì PBZ là hợp chất khó phân hủy bởi vi sinh vật đất. Bên cạnh đó,

PBZ rất độc cho sức khỏe con người và ảnh hưởng đến môi trường sinh thái (Watson và Jacobs, 2012).

Việc ứng dụng công nghệ vi sinh trong xử lý ô nhiễm nông dư trong sản xuất nông nghiệp theo hướng thân thiện môi trường và sinh thái đang được quan tâm ở nhiều nước trên thế giới. Do đó, đề tài đã được thực hiện nhằm mục tiêu: Phân lập, tuyển chọn và định danh được các dòng vi khuẩn bản địa có khả năng phân hủy PBZ từ đất vườn trồng cây ăn trái ở một số tỉnh ĐBSCL có thời gian dài sử dụng PBZ.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguồn vi khuẩn

Bốn mẫu đất được dùng trong phân lập vi khuẩn bản địa có khả năng phân hủy PBZ từ đất trồng sầu riêng và xoài có sử dụng PBZ trong thời gian dài được thu thập tại 3 địa điểm: 1 mẫu ở Chợ Lách, Bến Tre; 1 mẫu ở Cai Lậy, Tiền Giang và 2 mẫu ở Phong Điền, Cần Thơ.

2.2 Phân lập các dòng vi khuẩn bản địa tiềm năng phân hủy PBZ từ 4 mẫu đất vườn trồng cây ăn trái

Các mẫu đất được dùng cho phân lập các dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy chuyên biệt PBZ dựa trên thông tin về tình hình sử dụng PBZ như mô tả ở Bảng 1.

Bảng 1: Một số đặc điểm về 4 vườn cây ăn trái được thu mẫu đất thí nghiệm

Code Mẫu	Địa điểm thu mẫu	Mô hình cây trồng	Thời gian sử dụng PBZ (năm)
BT2	Chợ Lách, Bến Tre	Sầu riêng	8
CT2	Phong Điền, Cần Thơ	Xoài	8
CT3	Phong Điền, Cần Thơ	Xoài	18
TG3	Cai Lậy, Tiền Giang	Sầu riêng	15

Mật số vi khuẩn ban đầu trong các mẫu đất thí nghiệm được xác định dựa theo qui trình đếm mật số vi khuẩn bằng phương pháp hòa loãng (Ian và Charles, 2004). Các đĩa môi trường sau khi chà vi khuẩn được bỏ vào túi nylon và ủ trong điều kiện phòng thí nghiệm. Sau ba ngày đếm mật số khuẩn lạc của vi khuẩn hiện diện trên bề mặt môi trường TSA, số khuẩn lạc đếm được sẽ được quy đổi theo hệ số thể tích và pha loãng để thu kết quả về mật số vi khuẩn ban đầu của từng mẫu đất thí nghiệm.

Qui trình phân lập vi khuẩn có khả năng phân hủy PBZ trong môi trường khoáng tối thiểu loãng được thực hiện như sau: chuẩn bị 25 mL môi trường khoáng tối thiểu chứa 18 ppm PBZ trong bình tam giác 100 mL đã tiệt trùng, 1g mẫu đất (trọng lượng khô kiệt) chứa vi khuẩn được cho vào bình tam giác. Công thức môi trường khoáng tối

thiểu trong 1 lít như sau: 1 g NaCl; 0,5 g NH₄Cl; 0,935 g MgCl₂; 0,015 g CaCl₂; 0,49 g K₂HPO₄ và 0,375 g KH₂PO₄ (Chen và *ctv.*, 2010). Môi trường được tiệt trùng trong 20 phút ở 121°C trong nồi hấp tiệt trùng. Bình đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không có mẫu đất được chừa vào. Các bình tam giác nuôi cấy được đặt trên máy lắc với tốc độ 90 rpm (nhằm tạo khả năng trao đổi oxy tốt cho dung dịch khi lắc) ở điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm và trong tối. Sau 15 ngày nuôi cấy, 1 mL dung dịch vi khuẩn của thể hệ nuôi cấy đầu tiên được cho vào bình tam giác 100 mL tiệt trùng chứa 24 mL dung dịch môi trường khoáng tối thiểu chứa 18 ppm PBZ. Tiếp tục nuôi cấy trên máy lắc, trong tối và trong điều kiện phòng thí nghiệm trong 15 ngày. Toàn bộ qui trình được lặp lại liên tục trong 5 lần (tức là 5 thế hệ nuôi cấy). Sau năm lần nuôi cấy liên tục tiến hành tách riêng và có được dòng

thuần. Sau năm lần tách rỗng và làm tinh sạch trên môi trường TSA các dòng vi khuẩn phân lập được xem như là các dòng thuần và tiến hành khảo sát các đặc tính về hình thái khuẩn lạc và hình dạng tế bào, Gram và đặc tính oxidase.

2.3 Đánh giá và so sánh khả năng phân hủy PBZ của 8 dòng vi khuẩn thử nghiệm trong môi trường khoáng tối thiểu loãng

Trong số 30 dòng vi khuẩn được phân lập từ qui trình phân lập các dòng vi khuẩn có tiềm năng phân hủy PBZ (Mục 2.2), 8 dòng vi khuẩn được chọn để bố trí thí nghiệm trong môi trường khoáng tối thiểu loãng nhằm đánh giá và kiểm tra khả năng phân hủy PBZ của chúng. Các dòng được chọn là những dòng có kích thước và đường kính khuẩn lạc lớn và có hình thái về khuẩn lạc khác nhau. Các dòng vi khuẩn này được nhân mật số trong bình tam giác 100 mL có chứa 50 mL dung dịch giàu dinh dưỡng GYM tiệt trùng trong ba ngày trên máy lắc tròn với tốc độ 100 rpm trong tối. Thành phần của dung dịch GYM gồm ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 10 g glucose và 10 g yeast extract. Sinh khối của các dòng vi khuẩn được thu hoạch riêng biệt bằng cách chuyển toàn bộ dung dịch dinh dưỡng GYM có chứa sinh khối vi khuẩn vào trong ống ly tâm Falcon tube 50 mL tiệt trùng. Quy trình ly tâm được thực hiện trong 10 phút với tốc độ 10.000 rpm trên máy ly tâm. Sau khi ly tâm, loại bỏ phần nước ở trên, tiếp tục cho 40 mL nước khử khoáng tiệt trùng vào Falcon tube chứa sinh khối vi khuẩn, vortex 2 phút nhằm hòa tan sinh khối vi khuẩn vào nước, sau đó ly tâm. Toàn bộ qui trình được lặp lại liên tục trong ba lần nhằm loại bỏ hoàn toàn nguồn carbon còn sót lại từ môi trường dung dịch giàu dinh dưỡng GYM. Tiếp theo, hiệu chỉnh độ đục của dung dịch chứa vi khuẩn với nước khử khoáng tiệt trùng bằng máy so màu Spectrometer về độ đục = 0,7 với bước sóng 600 nm.

Qui trình đánh giá và so sánh khả năng phân hủy PBZ của 8 dòng vi khuẩn thử nghiệm được thực hiện như sau: chuẩn bị 3,6 mL môi trường khoáng tối thiểu và 400 μL dung dịch vi khuẩn gồm vi khuẩn và nước cất tiệt trùng vào ống nghiệm để nồng độ cuối cùng của PBZ là 15 ppm. Thí nghiệm được thực hiện với 4 lần lặp lại cho mỗi dòng vi khuẩn. Nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự như những nghiệm thức khác nhưng không có vi khuẩn được chủng vào. Các ống nghiệm được để trên máy lắc ngang với tốc độ 130 rpm ở nhiệt độ phòng thí nghiệm và trong tối. Mỗi 2 ngày, các ống nghiệm được mở nắp để tránh việc thiếu hụt khí oxy cho vi khuẩn hô hấp.

Các chỉ tiêu theo dõi trong thời gian bố trí thí nghiệm bao gồm: 1) Đếm mật số vi khuẩn trong dung dịch nuôi cấy theo thời gian vào các ngày: 0, 3, 6, 9, 12 và 15 ngày. Mật số vi khuẩn được xác định bằng phương pháp nhỏ giọt: tiến hành pha loãng dịch nuôi vi khuẩn, 50 μL dung dịch vi khuẩn của mỗi nồng độ pha loãng được hút và nhỏ thành 5 giọt lên trên bề mặt môi trường TSA. Đĩa môi trường chứa vi khuẩn được bỏ vào túi nylon và ủ trong điều kiện phòng thí nghiệm trong ba ngày. Sau đó, đếm số khuẩn lạc hiện diện trên bề mặt môi trường TSA; 2) Phân tích nồng độ thuốc PBZ trong môi trường nuôi cấy tại hai thời điểm 0 và 15 ngày thí nghiệm: Nồng độ PBZ trong môi trường loãng thu được thông qua phương pháp trích. Qui trình trích PBZ từ môi trường nuôi cấy loãng được thực hiện như sau: Chuyển 4 mL dung dịch nuôi cấy từ ống nghiệm sang lọ bi 12 mL, tráng ống nghiệm 3 lần bằng 4 mL hỗn hợp toluen và acetone (2:1) cho vào lọ bi. Lọ bi được vortex với vận tốc 2.500 rpm, sau đó ly tâm với tốc độ 2.500 rpm trong 2 phút, hút phần dung môi tách lớp bên trên cho vào lọ bi mới. Qui trình trích này được lặp lại 3 lần để đạt hiệu suất trích cao. Lượng dung môi hấp phụ PBZ sau 3 lần trích được gom lại trong 1 lọ bi. Nồng độ PBZ trong dung dịch nuôi cấy loãng được xác định bởi máy sắc kí lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) với các thông số: cột C18 (dài: 25 cm, đường kính trong: 4,6 mm), tỉ lệ pha động acetone nitrile: nước khử khoáng 50:50 với bước sóng 225 nm.

2.4 Giải mã trình tự đoạn gene 16S rRNA và xác định ở mức độ loài của hai dòng vi khuẩn thể hiện khả năng phân hủy PBZ tốt nhất

Hai dòng vi khuẩn thí nghiệm thể hiện khả năng phân hủy PBZ cao nhất từ mục 2.3 được giải mã trình tự đoạn gen 16S rRNA nhằm định danh tên loài. Hai dòng vi khuẩn được nhân nuôi riêng biệt trên đĩa môi trường TSA trong ba ngày để thu sinh khối và sử dụng qui trình của Ihrmark và *ctv.* (2012) để trích DNA. Thực hiện PCR với cặp mồi 27F-907R (Xuan và *ctv.*, 2012) với chu trình nhiệt 94°C (3 phút), 25 chu kì : 92°C (30 giây) - 50°C (45 giây) - 72°C (30 giây), 72°C (7 phút). Các hóa chất để thực hiện 1 phản ứng PCR bao gồm: 4 μL Dream taq buffer (5x); 0,4 μL mỗi xuôi 27F (10 μM); 0,4 μL mỗi ngược 907R (10 μM); 10 μL DNA tinh sạch; 2,5 μL nước (không có DNA); 0,4 μL dNTP (10 mM); 2,2 μL MgCl_2 (25 mM); 0,1 μL Dream taq (5 U/ μL). DNA và hóa chất được cho vào các tube 300 μL để tiến hành phản ứng theo quy trình nhiệt ở trên với máy PCR. Sản phẩm được kiểm tra trên gel agarose để kiểm tra

sản phẩm trước khi gửi mẫu giải trình tự tại công ty Nam Khoa, Tp. Hồ Chí Minh. Từ kết quả giải trình tự, so sánh với ngân hàng gene thế giới trên trang web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> để xác định loài của hai dòng vi khuẩn.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân lập các dòng vi khuẩn bản địa có tiềm năng phân hủy PBZ từ 4 mẫu đất vườn trồng cây ăn trái

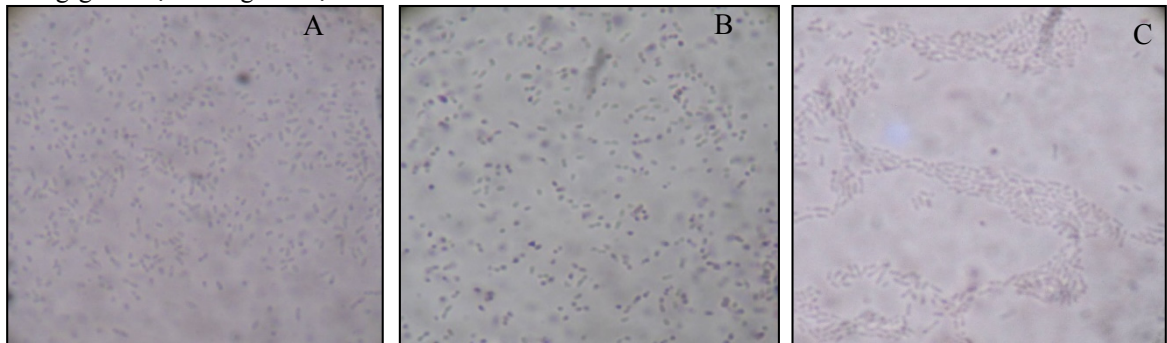
Mật số vi khuẩn ban đầu của 4 mẫu đất thí nghiệm được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2: Mật số vi khuẩn của 4 mẫu đất thí nghiệm

Code mẫu	CFU.g ⁻¹
BT2	10,5 x 10 ⁶
CT2	10,7 x 10 ⁶
CT3	3,2 x 10 ⁶
TG3	4,0 x 10 ⁶

Bốn mẫu đất trên được dùng để phân lập các cộng đồng và dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy PBZ trong môi trường khoáng tối thiểu loãng. Trong giai đoạn làm giàu mật số các vi khuẩn có

khả năng phân hủy PBZ, hai cộng đồng vi khuẩn ký hiệu CT2 và CT3 thể hiện khả năng phát triển độ đục rất nhanh chỉ sau 3-4 ngày nuôi cấy trong khi đó hai cộng đồng vi khuẩn ký hiệu BT2 và TG3 thể hiện khả năng phát triển độ đục rất chậm, do đó, hai cộng đồng vi khuẩn ký hiệu: CT2 và CT3 được chọn để phân lập các dòng vi khuẩn có tiềm năng phân hủy PBZ. Sau thời gian phân lập và tách riêng vi khuẩn có tiềm năng phân hủy PBZ trên môi trường TSA, tổng cộng có 30 dòng vi khuẩn được phân lập từ hai cộng đồng này. Quan sát về hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào trên kính hiển vi, 30 dòng vi khuẩn được nhóm lại thành 3 nhóm theo hình thái tế bào trên kính hiển vi như sau: Nhóm 1: dạng tế bào hình que ngắn gồm có 08 dòng vi khuẩn ký hiệu: CT2-10, CT2-24, CT2-29, CT2-30, CT2-33, CT3-2, CT3-21 và CT3-24. Nhóm 2: dạng tế bào hình que dài gồm có 07 dòng vi khuẩn ký hiệu: CT2-11, CT2-14, CT2-17, CT2-18, CT2-22, CT3-10 và CT3-12 và nhóm 3: dạng tế bào hình cầu gồm có 15 dòng vi khuẩn ký hiệu: CT2-1, CT2-2, CT2-3, CT2-12, CT2-13, CT2-19, CT2-27, CT3-1, CT3-9, CT3-14, CT3-17, CT3-18, CT3-19, CT3-23 và CT3-25 (Hình 1).



Hình 1: Hình dạng tế bào 03 nhóm vi khuẩn điển hình cho các dòng vi khuẩn phân lập: (A) Vi khuẩn dạng que ngắn; (B) vi khuẩn dạng hình cầu; (C) vi khuẩn dạng que dài

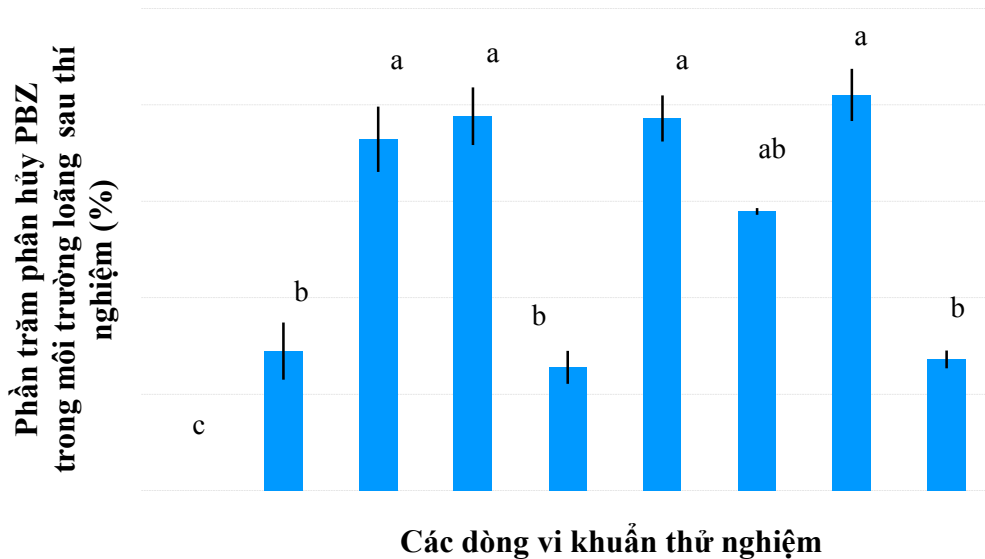
3.2 Đánh giá và so sánh khả năng phân hủy PBZ của 8 dòng vi khuẩn thử nghiệm trong môi trường khoáng tối thiểu loãng

Kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng phân hủy PBZ trong môi trường khoáng tối thiểu loãng của 8 dòng vi khuẩn thử nghiệm sau thời gian 15 ngày nuôi cấy được trình bày ở Hình 2. Kết quả cho thấy như sau: khả năng phân hủy PBZ của 8 dòng vi khuẩn thử nghiệm biến động từ 5,11-16,41%. Cả 8 dòng thí nghiệm đều có phần trăm phân hủy PBZ trong môi trường khoáng tối thiểu loãng chứa 15 ppm PBZ cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,01$). Phần trăm phân hủy PBZ của chúng dao động từ 11,58-

16,41%. Trong đó, 5 dòng vi khuẩn ký hiệu: CT2-24; CT2-29; CT3-1; CT3-9 và CT3-18 có phần trăm phân hủy cao hơn 3 dòng vi khuẩn còn lại, nhưng không khác biệt thống kê về khả năng phân hủy PBZ khi so sánh với nhau ($p > 0,05$). Ba dòng vi khuẩn còn lại ký hiệu: CT2-19; CT2-33 và CT3-24 không khác biệt ý nghĩa thống kê khi so sánh với nhau ($p > 0,05$). Kết quả này cho thấy vi khuẩn trên nền đất vườn trồng xoài có sử dụng thuốc xuyên thuốc kích thích ra hoa trái vụ PBZ có khả năng thích nghi tốt trong việc phân hủy PBZ. Có rất ít tài liệu tham khảo liên quan đến phân lập các dòng vi khuẩn phân hủy PBZ, chỉ có tài liệu của Chen và *ctv.* (2010) cho thấy đã phân lập được dòng *Pseudomonas* sp. từ bùn đô thị nhiễm PBZ

phân hủy tốt PBZ. Do cách bố trí thí nghiệm và điều kiện thí nghiệm của mỗi nghiên cứu khác nhau nên rất khó có thể so sánh hiệu quả phân

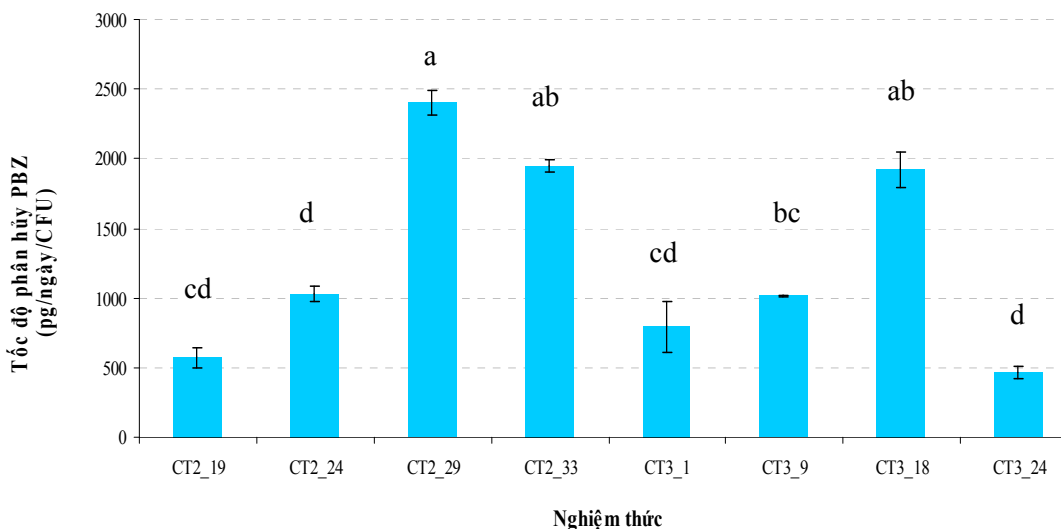
hủy PBZ của các dòng phân lập giữa các đề tài nghiên cứu.



Hình 2: Khả năng phân hủy PBZ của 8 dòng vi khuẩn thử nghiệm trong môi trường khoáng tối thiểu bổ sung 15 ppm PBZ sau 15 ngày nuôi cấy (n = 4, sai số chuẩn)

Khi so sánh tốc độ phân hủy PBZ/khuẩn lạc/ngày của 8 dòng vi khuẩn thử nghiệm vào ngày thứ 15 (Hình 3), kết quả cho thấy 8 dòng vi khuẩn này có tốc độ phân hủy dao động từ 500 đến 2400 pg/CFU/ngày. Trong đó, ba dòng vi khuẩn CT2-29, CT2-33 và CT3-18 có tốc độ phân hủy PBZ ở ngày thứ 15 cao hơn, hiệu quả hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với 5 dòng vi khuẩn còn lại, với kết quả lần lượt là: 2400, 1900 và 1900

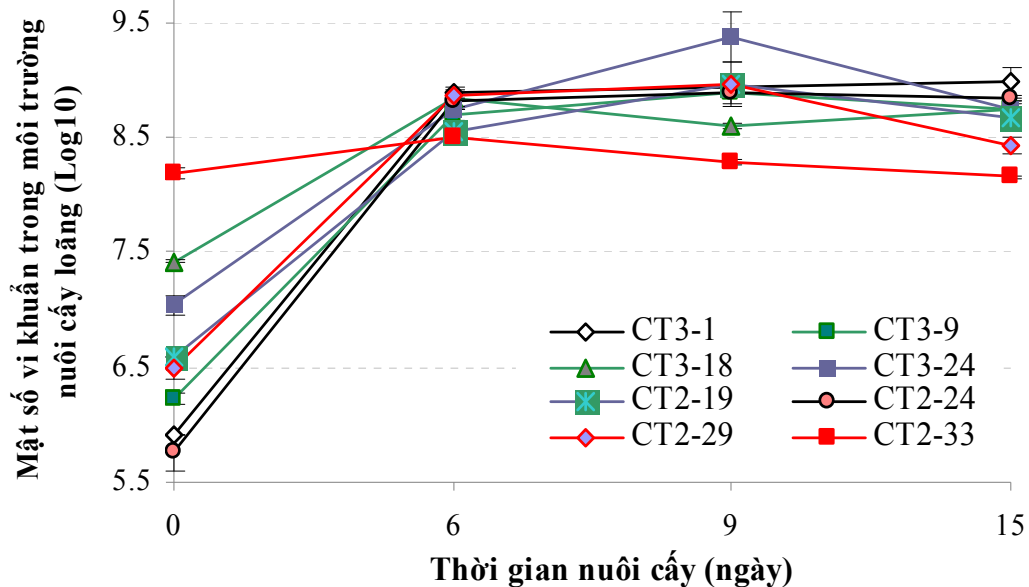
pg/CFU/ngày. Tuy nhiên, cả 3 dòng vi khuẩn này không khác biệt về tốc độ phân hủy PBZ/CFU/ngày khi so sánh với nhau ($p > 0,05$). Hai dòng vi khuẩn ký hiệu CT2-29 và CT3-18 được chọn để định danh ở mức độ loài và các nghiên cứu tiếp theo vì là 2 dòng phân hủy tốt nhất trong các dòng thử nghiệm đại diện lần lượt cho 2 cộng đồng vi khuẩn đất phân lập CT2 và CT3.



Hình 3: Tốc độ phân hủy PBZ của 8 dòng vi khuẩn thử nghiệm trong môi trường khoáng tối thiểu bổ sung 15 ppm PBZ ở ngày nuôi cấy thứ 15 (n = 4, sai số chuẩn)

Sự phát triển mật số vi khuẩn trong môi trường khoáng tối thiểu loãng bổ sung 15 ppm PBZ theo thời gian thí nghiệm được trình bày ở Hình 4. Nhìn chung, mật số của tất cả các dòng vi khuẩn trong môi trường loãng tăng nhanh trong giai đoạn 0-6

ngày nuôi cấy. Sau đó, mật số vi khuẩn một số tăng chậm và có xu hướng ổn định vào giai đoạn 6-9 ngày đến giai đoạn 9-15 ngày, hầu hết các dòng có xu hướng giảm mật số.



Hình 4: Sự phát triển mật số của 8 dòng vi khuẩn bố trí thí nghiệm trong môi trường khoáng tối thiểu loãng bổ sung 15 ppm PBZ trong 15 ngày nuôi cấy (n = 4, sai số chuẩn)

3.3 Giải mã trình tự đoạn gene 16S rRNA và xác định ở mức độ loài của hai dòng vi khuẩn thể hiện khả năng phân hủy PBZ tốt nhất

Hai dòng CT3-18 và CT2-29 được định danh và so sánh trình tự đoạn gene 16S rRNA với cơ sở dữ liệu trên ngân hàng gene thế giới. Kết quả cho thấy trình tự đoạn gen của vi khuẩn CT3-18 và CT2-29 lần lượt tương đồng với đoạn gene 16S rRNA của loài *Burkholderia cepacia* dòng SE-1

(KF681774.1) và *Burkholderia* sp. C5 (JX010988.1) với độ tương đồng là 100%. Như vậy dòng vi khuẩn CT3-18 và CT2-29 được sắp xếp theo bậc phân loại như sau: Prokaryota, Bacteria, Proteobacteria, Beta Proteobacteria, Burkholderiales, Burkholderiaceae, Burkholderia và chúng lần lượt được định danh như *Burkholderia cepacia* CT3-18 và *Burkholderia* sp. CT2-29 (Bảng 3).

Bảng 3: Định danh các dòng vi khuẩn phân hủy PBZ theo độ tương đồng của đoạn gene 16S rRNA

STT	Ký hiệu	Nguồn gốc	Độ tương đồng	Các dòng vi khuẩn trên cơ sở dữ liệu		Định danh
				Vi khuẩn	Số đăng ký	
1	CT3-18	Cần Thơ	100%	<i>Burkholderia cepacia</i> dòng SE-1	KF681774.1	<i>Burkholderia cepacia</i> CT3-18
2	CT2-29	Cần Thơ	100%	<i>Burkholderia</i> sp. C5	JX010988.1	<i>Burkholderia</i> sp. CT2-29

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

– Từ hai cộng đồng vi sinh vật ký hiệu CT2 và CT3 đã phân lập được 30 dòng vi khuẩn có tiềm năng phân hủy PBZ.

– Hai trong tổng số 8 dòng vi khuẩn thử nghiệm ký hiệu: CT2-29 và CT3-18 thể hiện khả năng và tốc độ phân hủy PBZ cao nhất, lần lượt là

15,43%-2400 pg/CFU/ngày và 16,41%-1900 pg/CFU/ngày trong 15 ngày nuôi cấy. Theo thứ tự hai dòng này được định danh là *Burkholderia* sp. CT2-29 và *Burkholderia cepacia* CT3-18.

– Một số loài vi khuẩn sống trong hệ sinh thái đất vườn canh tác xoài ở Phong Điền, Cần Thơ có khả năng thích nghi và phân hủy PBZ cao trong

điều kiện nông dân phun thường xuyên thuốc kích thích ra hoa PBZ cho xoài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen J., Xu L., Giesy J.P. and Jin H.J., 2010. Biodegradation of Paclobutrazol by a microbial consortium isolated from industrially contaminated sediment. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 92:8, 1487-1494.
2. Watson G. and Jacobs K., 2012. Control of Apple Scab and Cytospora Canker with Paclobutrazol. *Arboriculture & Urban Forestry* 2012. 38(3): 112–116. Ian L.P. and Charles P.G., 2004. *Environmental microbiology: A Laboratory*. Elsevier Academic Press, Second edition, 27-30.
3. Trần Văn Hậu, Đỗ Thị Út và Trần Quốc Tuấn, 2001. Hiệu quả của Paclobutrazol trên sự ra hoa trái vụ của sầu riêng Sữa Hột Lép tại Trại Thực Nghiệm Giống cây Trồng Khoa Nông Nghiệp, ĐHCT. Hội nghị Tổng kết chương trình IPM trên cây ăn trái ở ĐBSCL tại Trường ĐHCT, ngày 29/3/2001.
4. Trần Văn Hậu, Nguyễn Việt Khởi và Nguyễn Thanh Triều, 2005. Ảnh hưởng của nồng độ Paclobutrazol kết hợp với một số hóa chất kích thích ra hoa trên sự ra hoa mùa nghịch bưởi “5 Roi” tại Tam Bình, Vĩnh Long. Hội nghị chuyên đề “Cây có múi, xoài và khóm”- Cải thiện kỹ thuật canh tác, năng suất, chất lượng và chế biến bảo quản, Trường ĐHCT.
5. Xuan D.T., Guong V.T., Anna R., Sadhna A., Benli C and Nils H., 2012. Different crop rotation system as drivers of change in soil bacterial community structure and yield of rice, *Oryza sativa*. *Biology and Fertility of Soil*, 48:2, 217-225.