

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG SINH IAA CỦA CÁC CHỦNG VI SINH VẬT PHÂN HỦY LÔNG GÀ VÀ ỨNG DỤNG DỊCH THỦY PHÂN LÔNG GÀ LÀM CHẤT KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG THỰC VẬT

A STUDY OF IAA PRODUCING ABILITY OF CHICKEN FEATHER BIODEGRADATION BACTERIA AND APPLICATION OF FEATHER LYSATE AS PLANT GROWTH PROMOTING AGENT

Tạ Ngọc Ly¹, Quách Thị Toán², Trương Văn Thiên¹

¹Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng; tnly@cb.dut.udn.vn

²Sinh viên lớp 12SHLT, Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng; quachtoanhb@gmail.com

Tóm tắt - Tiềm năng sử dụng chất thải keratin có nguồn gốc từ công nghiệp giết mổ gia cầm như là một loại phân bón hữu cơ có giá trị làm tăng số lượng nghiên cứu gần đây. Nghiên cứu nhằm xác định khả năng sinh indole acetic acid (IAA) và ảnh hưởng của dịch thủy phân (TP1) lên sự phát triển thực vật của các chủng VSV phân lập. Kết quả cho thấy cả 5 chủng đều có khả năng sinh IAA. Điều kiện tối ưu để sinh IAA của ĐHK1 là môi trường dịch chiết khoai tây bổ sung 20 g/l bột lông gà trong thời gian nuôi cấy 6 ngày. TP1 làm tăng số chồi và rễ của cây cúc nuôi cấy *invitro*. TP1 còn làm tăng tỉ lệ nảy mầm và kích thích sinh trưởng của cây đậu xanh sau 4 tuần gieo. Kết luận rằng, chủng ĐHK1 có nhiều đặc tính có lợi cho việc phân hủy lông gà và kích thích sinh trưởng thực vật. Từ đó, chúng tôi đề xuất sử dụng dịch thủy phân lông gà như một phương pháp hiệu quả để thay thế phân bón hóa học.

Từ khóa - lông gà; indole acetic acid (IAA); kích thích sinh trưởng thực vật; dịch thủy phân; phế phẩm.

Abstract - The potential of using keratin wastes originating from the poultry industry as a valuable organic fertilizer gives rise to the need for intensive study recently. The aims of this study is to identify indole acetic acid (IAA) producing activity and effect of chicken feather lysate (TP1) on plant growth of isolated strains. The results has shown that all 5 isolated strains are able to produce IAA. The optimum conditions for IAA producing of ĐHK1 strain are potato extract medium added 20g/l of chicken powder in 6 days of incubation. TP1 increased the number of shoots and roots of *Chrysanthemum sp* in *invitro* culture. Moreover, TP1 also increased germination rate and promoted plant growth of mung beans after 4 weeks seeding. In conclusion, ĐHK1 have multi trait activity which are useful for feather biodegradation and plant growth promotion. From this result, we suggest using chicken feather hydrolysate as an attractive way to replace chemical fertilizers.

Key words - chicken feather; Indole acetic acid (IAA); phytohormone; hydrolysate; waste.

1. Đặt vấn đề

Sử dụng chất kích thích sinh trưởng thực vật không rõ nguồn gốc tiềm ẩn nhiều nguy cơ ảnh hưởng đến môi trường và sức khỏe người tiêu dùng. Vì vậy, việc nghiên cứu tìm ra các tác nhân kích thích sinh trưởng thực vật mới có nguồn gốc sinh học và an toàn có ý nghĩa thực tế. Nhiều VSV trong đất có khả năng thúc đẩy sinh trưởng của thực vật qua nhiều con đường khác nhau như cố định nitơ hoặc kích thích sản sinh chất kích thích sinh trưởng, ví dụ như sinh IAA [1-3]. Kích thích sinh trưởng thực vật bằng các VSV đó còn có tác dụng kiểm soát sinh học, ức chế sự phát triển của VSV có hại và cải tạo đất [4, 5]. Nghiên cứu gần đây của Paul và cộng sự [6] cho thấy có mối quan hệ giữa các chủng VSV phân hủy keratin và sinh IAA. Nghiên cứu của Anwar [7] cũng cho thấy các VSV phân giải keratin đồng thời sinh IAA. Trên cơ sở đó, sử dụng các chủng VSV phân hủy keratin của lông gà phân lập từ khu giết mổ gia cầm như công bố năm 2014 [8], chúng tôi tiếp tục khảo sát khả năng sinh IAA của các chủng trên và tiềm năng sử dụng dịch thủy phân như là tác nhân kích thích sinh trưởng của thực vật. Khả năng kích thích sinh trưởng của dịch thủy phân lên sinh trưởng của thực vật được đánh giá qua sự sinh trưởng phát triển của cây đậu xanh qua 6 tuần gieo trồng.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

- Mẫu đất, mẫu nước và lông gà được lấy tại khu giết mổ gia cầm chợ Hòa Khánh, quận Liên Chiểu, thành phố Đà Nẵng.

- Hạt đậu xanh giống và chồi cây hoa cúc (*Chrysanthemum spp.*) mua tại thị trường Đà Nẵng.

2.2. Dụng cụ và thiết bị

Bao gồm: Tủ cấy vô trùng (Daiki); bếp điện (Hữu Nghị, Việt Nam); máy li tâm (Zentrifugen, Đức); lò vi sóng (Sharp); cân kỹ thuật (ARC 120 OHAUS, Mỹ); cân phân tích (OHAUS, Mỹ); nồi hấp vô trùng (ALP-Japan); tủ ẩm (BE500 Memmert, Đức); máy đo pH (Mettler Toledo); Micropipet (Axygen); tủ sấy chân không (VO 400 Memmert, Đức); máy quang phổ UV-vis (BioRad, USD); tủ lạnh (Sanyo); kính hiển vi (Olympus, USA).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Xác định hàm lượng IAA của chủng phân lập bằng thuốc thử Salkowski theo mô tả của Gutierrez và cộng sự [9]. Cân 0,025g IAA chuẩn + 100ml nước cất để thành 250µg/l, pha loãng thành dãy nồng độ từ 10-100 µg/l. Xây dựng đường chuẩn IAA bằng cách đo OD ở bước sóng 530 nm. Sinh khối được nuôi ở 37°C, có lắc 200 vòng/phút, trong khoảng thời gian là 3 – 7 ngày, được mang đi ly tâm 3500 vòng/phút ở 20 phút để thu dịch. Hút 1 ml dịch ly tâm + 2 ml thuốc thử Salkowski, xác định mật độ quang ở bước sóng 530nm. Xác định nồng độ IAA dựa vào đường chuẩn.

2.3.2. Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của dịch thủy phân lông gà bằng chủng ĐHK1 lên sự sinh trưởng của thực vật

- Bố trí thí nghiệm: Mỗi thí nghiệm được bố trí theo phương pháp khối hoàn toàn ngẫu nhiên- Randomized completeblock design (RCBD) với 3 lần nhắc lại.

- Xác định ảnh hưởng của dịch thủy phân từ lông gà bằng chủng ĐHK1 lên quá trình nuôi cấy chồi invitro.

Mẫu cục được lựa chọn là mẫu cục invitro khỏe mạnh, phát triển tốt, không bị nhiễm nấm. Cắt đoạn thân mang chồi ngủ khoảng 8-10 mm, cấy vào môi trường nuôi cấy khác nhau. Chỉ tiêu theo dõi: Chiều cao trung bình mẫu (cm); số lá trên mẫu; tỷ lệ mẫu tạo rễ (%); số rễ/mẫu; chiều dài rễ(cm). Theo dõi và ghi nhận kết quả sau 3 tuần nuôi cấy ở nhiệt độ 25°C, ánh sáng 2000- 3000 lux.

- Xác định ảnh hưởng của dịch thủy phân từ lông gà bằng chủng ĐHK1 lên sự nảy mầm và phát triển của đậu xanh

- 2 gram hạt giống được khử trùng bề mặt bằng ethanol 95% trong 30 giây và ngâm trong javen 20% trong 5 phút. Sau đó hạt giống đã khử trùng sẽ được rửa lại 5 lần bằng nước cất vô trùng. Các hạt sau khử trùng được mang đi ngâm với dịch thủy phân trong 10 phút, sau đó được làm khô và gieo trên thạch mềm agar 0,5%. Quan sát sự nảy mầm hạt giống để xác định ảnh hưởng của IAA.

- Cây đậu xanh sau khi cho nảy mầm được trồng trên đất cát tại phòng thí nghiệm, sau 1 tuần gieo trồng, tưới cây bằng các dung dịch thủy phân lông gà pha loãng 100 lần. Mẫu đối chứng không là nước thông thường. Chỉ tiêu theo dõi: Chiều cao trung bình mẫu (cm); số lá; số rễ, trọng lượng rễ (g). Theo dõi và ghi nhận kết quả sau 3 tuần tưới dịch thủy phân.

2.3.3. Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả ghi nhận là giá trị trung bình của 3 lần lặp và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft excel 2010.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Khảo sát khả năng sinh IAA của chủng VSV phân lập

Sử dụng 5 chủng VSV có khả năng phân giải lông gà đã được phân lập trước đây. Trong nghiên cứu này chúng tôi khảo sát khả năng sinh IAA của các chủng VSV đó. Khả năng sinh IAA của chủng VSV phân lập có ảnh hưởng rất lớn từ môi trường nuôi cấy. Kết quả xác định hàm lượng IAA trong 4 ngày ở 2 bảng trên cho thấy tất cả các chủng đều có khả năng sinh IAA. Kết quả khảo sát sinh IAA trên các môi trường khác nhau được thể hiện ở Bảng 1:

Bảng 1. Khả năng sinh IAA của các chủng phân lập trên các môi trường khác nhau

Chủng	Hàm lượng IAA($\mu\text{g/ml}$) trong các môi trường							
	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4
ĐHK1	4,043	5,912	6,935	8,877	2,54	17,94	17,77	35,75
ĐHK2	6,918	13,719	2,276	13,39	2,22	19,54	3,54	20,88
ĐHK3	7,106	16,78	8,211	6,73	3,606	11,8	17,64	24,33
ĐHK4	8,835	20,912	2,357	6,812	3,812	23,6	12,64	15,68
ĐHK5	9,335	19,245	1,788	6,619	4,34	3,74	11,76	10,68

A1: Môi trường thạch thịt peptone chuẩn bị theo [6]; A2: Môi trường A1 + 10g/l bột lông gà; A3: Môi trường A1 + 10g/l tryptone; A4: Môi trường A1 + 10g/l tryptone + 10g/l lông gà; B1: Môi trường dịch chiết khoai tây; B2: Môi trường B1 + 10g/l bột lông gà; B3: Môi trường B1 + 10g/l tryptone; B4: Môi trường B1 + 10 g/l tryptone + 10g/l bột lông gà

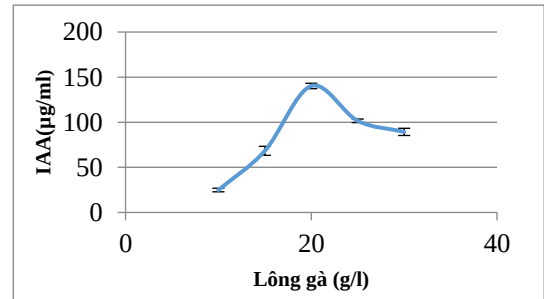
Ở môi trường A, kết quả cao nhất là chủng ĐHK4 với hàm lượng IAA thu được 20,912 $\mu\text{g/ml}$; trong khi ở môi trường B, nồng độ IAA cao nhất thu được là 35,75 $\mu\text{g/ml}$. Từ kết quả đó chúng tôi lựa chọn chủng ĐHK1 và môi

trường B để tiếp tục khảo sát.

3.2. Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng quá trình sinh IAA của chủng ĐHK1

3.2.1. Ảnh hưởng của hàm lượng lông gà đến khả năng sinh IAA của chủng ĐHK1 trên môi trường dịch chiết khoai tây

Tiến hành khảo sát trên môi trường dịch chiết khoai tây với những nồng độ lông gà khác nhau trong thời gian nuôi là 6 ngày, 37°C.

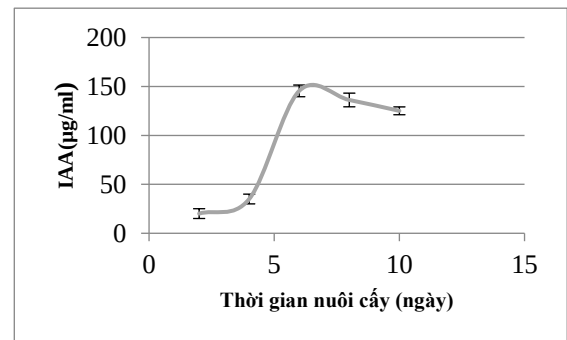


Hình 1. Ảnh hưởng của lượng lông gà lên khả năng sinh IAA của chủng ĐHK1

Kết quả cho thấy, khi tăng lượng lông gà từ 10 g/l đến 20 g/l, lượng IAA sinh ra có xu hướng tăng, khi vượt quá 20 g/l lượng IAA sinh ra giảm dần. Quá trình sinh IAA của VSV trải qua nhiều giai đoạn, như vậy, 20 g/l có thể là giới hạn mà tại đó chủng ĐHK1 cần nhiều thời gian hơn để chuyển hóa lông gà và IAA còn đang trong giai đoạn tổng hợp các tiền chất của IAA.

3.2.2. Khảo sát khả năng sinh IAA trên môi trường dịch chiết khoai tây bổ sung 20/l lông gà của chủng ĐHK1 theo thời gian

Chọn môi trường dịch chiết khoai tây có bổ sung 20 g/l lông gà để tiếp tục khảo sát khả năng sinh IAA của chủng ĐHK1 theo thời gian nuôi cấy. Kết quả khảo sát thể hiện ở Hình 2:



Hình 2. Khả năng sinh IAA của chủng ĐHK1 theo thời gian nuôi cấy

Khả năng sản sinh IAA tăng dần lên ngày thứ 4, tăng mạnh tới ngày thứ 6 là 144,69 $\mu\text{g/ml}$ và giảm xuống ở ngày thứ 8 còn 28,67 $\mu\text{g/ml}$. Thời gian nuôi cấy để sinh IAA tốt nhất được xác định là 6 ngày.

3.2.3. Ảnh hưởng của thời gian bảo quản đến hàm lượng IAA của chủng ĐHK1

IAA là chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm auxin có nhân indole rất dễ bị biến tính bởi nhiệt độ và thời gian nuôi cấy. Vì vậy, chúng tôi tiến hành khảo sát hàm lượng IAA sau 3 tuần bảo quản.

Bảng 2. Hàm lượng IAA($\mu\text{g/ml}$) sau thời gian bảo quản

Thời gian nuôi (ngày)	IAA($\mu\text{g/ml}$) sau thời gian bảo quản (tuần)		
	1	2	3
2	17,36	13,8	12,5
4	20,52	16,04	12,8
6	137	134,1	131,2
8	26,3	25,2	24,49

Với dịch thủy phân lông gà bằng chủng ĐHK1 trong thời gian 3 tuần bảo quản thì hàm lượng IAA giảm không đáng kể, ngày nuôi thứ 6 là ngày ổn định nhất trong thời gian bảo quản.

3.3. **Đánh giá khả năng sử dụng dịch thủy phân lông gà của chủng ĐHK1 như là tác nhân kích thích sinh trưởng thực vật**

3.3.1. **Ảnh hưởng của dịch thủy phân lông gà của chủng ĐKH1 lên sự phát triển của chồi cúc nuôi cấy invitro**

Môi trường Murasighe và Skoog (MS) là môi trường cơ bản dùng cho nuôi cấy mô thực vật. Môi trường B là môi trường MS có bổ sung 1-naphthaleneacetic acid (NAA) và benzyl adenine (BA) là môi trường nhân cây hoa cúc đã được nhiều tác giả công bố [10]. Sử dụng 2 môi trường trên làm đối chứng để so sánh khả năng kích thích sinh trưởng thực vật của TP1, kết quả khảo sát cho thấy, TP1 làm tăng sự tạo chồi và chiều cao của chồi. Đặc biệt, TP1 làm gia tăng rõ rệt sự hình thành rễ cũng như chiều dài rễ (Bảng 3). Ngoài ra chúng tôi còn ghi nhận một số trường hợp tạo mô sẹo và tạo rễ trên môi trường F.

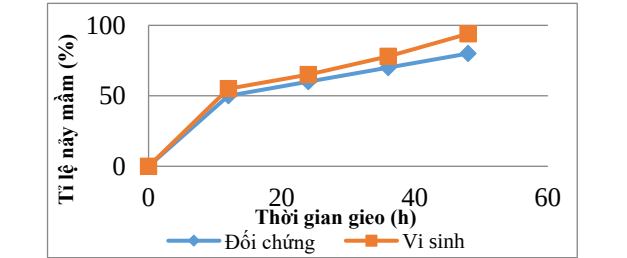
Bảng 3. Ảnh hưởng của dịch thủy phân lông gà của chủng ĐKH1 lên sự phát triển của chồi cúc invitro

Môi trường	A	MS	B	F
Số chồi/ mẫu	1,0	1,0	1,33	1,2
Chiều cao thân/ mẫu (cm)	0,6 $\pm$ 0,18	1,4 $\pm$ 0,45	2,5 $\pm$ 0,25	4,63 $\pm$ 0,4
Số lá/ mẫu	3,25 $\pm$ 0,5	3,5 $\pm$ 0,5	5,4 $\pm$ 0,82	5,67 $\pm$ 0,75
Số rễ/ mẫu (%)	0	0,8 $\pm$ 0,2	0	4,0 $\pm$ 0,84
Chiều dài rễ/ mẫu (cm)	0	1-1,2	0	0,3- 5,0

A: 30 g/l đường + 8 g/l agar; MS: MS+30 g/l đường + 8 g/l agar; B: MS +30 g/l đường +8 g/l agar+ 0,5 mg/ml NAA + 2 mg/ml BA; F: MS +30 g/l đường +8 g/l agar+ 5 mg/ml TP1

Kết quả này cho thấy TP1 tác động như một auxin mạnh, làm tăng sự hình thành rễ và kích thích sự hình thành mô sẹo ở nồng độ cao.

3.3.2. **Ảnh hưởng của dịch thủy phân lông gà bằng chủng ĐHK1 lên tỉ lệ nảy mầm của hạt**



Hình 3. Tỉ lệ nảy mầm của hạt đậu xanh sau 48 giờ

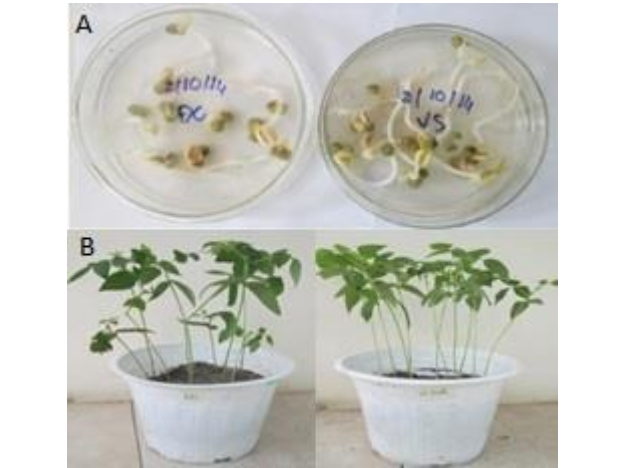
Khảo sát ảnh hưởng của dịch thủy phân lông gà bằng chủng ĐHK1 lên sự nảy mầm của hạt đậu xanh cho thấy, dịch thủy phân lông gà làm tăng tỉ lệ nảy mầm rõ rệt so với mẫu đối chứng là ngâm trong nước.

3.3.3. **Khảo sát ảnh hưởng của dịch thủy phân lông gà bằng chủng ĐHK1 lên sự sinh trưởng của cây đậu xanh qua 4 tuần**

Ảnh hưởng của TP1 lên sự sinh trưởng của cây đậu xanh được theo dõi qua 4 tuần gieo trồng, kết quả cho thấy mẫu cây đậu xanh qua 2 lần tưới TP1 có sự tăng rõ rệt về số lá, trọng lượng tươi và số rễ, nhưng ít ảnh hưởng lên chiều cao của cây (Bảng 4). Kết quả này phù hợp với ảnh hưởng của IAA lên cây trồng, đó là IAA làm tăng sự phát triển của rễ và kích thích sinh trưởng cây trồng đã được khẳng định qua nhiều công bố trước đây [1, 11]. Ngoài ra, theo kết quả của khảo sát trước đây [8] hàm lượng nitơ tổng số và protein hòa tan của dịch thủy phân lông gà bằng chủng HK1 là khá cao, tương ứng 0,18 g/l và 1,26 g/l. Như vậy, ảnh hưởng của TP1 lên cây trồng có thể còn do thành phần dịch thủy phân lông gà chứa một lượng lớn các acid amin tốt cho cây trồng.

Bảng 4. Ảnh hưởng của TP1 lên sự sinh trưởng của cây đậu xanh qua 4 tuần

Chỉ tiêu khảo sát	Đối chứng	Vi sinh
Chiều cao thân(%)	100 $\pm$ 0,65	102,56 $\pm$ 0,7
Số lá(%)	100 $\pm$ 0,6	137,5 $\pm$ 0,9
Trọng lượng tươi(%)	100 $\pm$ 0,4	145,29 $\pm$ 1,2
Trọng lượng rễ(%)	100 $\pm$ 0,7	198,6 $\pm$ 0,8
Chiều dài rễ(%)	100 $\pm$ 0,71	128 $\pm$ 0,5



Hình 4. Cây đậu xanh sau 48h gieo hạt (A) và 4 tuần trồng trong chậu (B)

ĐC: đối chứng (nước); VS: dịch thủy phân lông gà bằng chủng ĐHK1

3.4. **Kết luận**

Ngoài khả năng phân giải lông gà, các chủng VSV phân lập tại khu giết mổ gia cầm chợ Hòa khánh còn cho thấy có khả năng sinh IAA. Chúng tôi đã xác định được một số yếu tố cơ bản ảnh hưởng đến quá trình sinh IAA như thời gian nuôi cấy và lượng lông gà bổ sung. Nghiên cứu này cũng chứng minh khả năng kích thích sinh trưởng thực vật của dịch TP1. Tác động kích thích sinh trưởng thực vật của TP1 được ghi nhận ở cả 2 mức độ invitro và invivo. Những điều

kiện cơ bản để thủy phân lông gà sử dụng chủng ĐHK1 là cơ sở để có thể tiến hành những khảo sát sâu hơn, cũng như triển khai nghiên cứu ở qui mô lớn hơn. Với lượng lông gà thải ra hàng ngày lên đến hàng tấn tiềm ẩn nguy cơ gây ô nhiễm môi trường thì việc tận dụng nguồn lông phế thải này để sản xuất phân bón hữu cơ hoặc dung dịch kích thích sinh trưởng thực vật vừa mang lại hiệu quả kinh tế vừa góp phần giảm thiểu nguy cơ ô nhiễm môi trường. Trong bối cảnh nhu cầu về các sản phẩm xanh, sạch, thân thiện với môi trường ngày càng tăng, việc sử dụng TP1 làm chất kích thích có thể giảm thiểu ảnh hưởng của việc sử dụng chất kích thích trên thực vật mà vẫn giữ được năng suất cao, đáp ứng được yêu cầu của nền nông nghiệp hữu cơ xanh và phát triển bền vững.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Fierro-Coronado, R. A., Quiroz-Figueroa, F. R., Garcia-Perez, L. M., Ramirez-Chavez, E., Molina-Torres, J., and Maldonado-Mendoza, I. E, IAA-producing rhizobacteria from chickpea (*Cicer arietinum* L.) induce changes in root architecture and increase root biomass, *Canadian journal of microbiology*, No 60, 2014, pp. 639-648.
- [2] Ali, S., Hameed, S., Imran, A., Iqbal, M., and Lazarovits, Genetic, physiological and biochemical characterization of *Bacillus* sp. strain RMB7 exhibiting plant growth promoting and broad spectrum antifungal activities, *Microbial cell factories*, No 13, 2014, pp.144.
- [3] Ambardar, S., and Vakhlu, Plant growth promoting bacteria from *Crocus sativus* rhizosphere, *World journal of microbiology & biotechnology*, No 29, 2013, pp. 71-79.
- [4] Ahemad, M., and Khan, M. S, Effect of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonasputida* isolated from mustard (*Brassica compestris*) rhizosphere, *Chemosphere*, No 86, 2013, pp.45-50.
- [5] Bano, N., and Musarrat, Characterization of a novel carbofuran degrading *Pseudomonas* sp. with collateral biocontrol and plant growth promoting potential, *FEMS microbiology letters*, No 231, 2004, pp.13-17.
- [6] Paul, T., Halder, S. K., Das, A., Bera, S., Maity, C., Mandal, A., Das, P. S., Mohapatra, P. K. D., Pati, B. R., and Mondal, Exploitation of chicken feather waste as a plant growth promoting agent using keratinase producing novel isolate *Paenibacillus woosongensis* TKB2, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, No 2, 2013, pp.50-57.
- [7] Anwar, M. S., Siddique, M. T., Verma, A., Rao, Y. R., Nailwal, T., Ansari, M., and Pande, Multitrait plant growth promoting (PGP) rhizobacterial isolates from *Brassica juncea* rhizosphere: Keratin degradation and growth promotion, *Communicative & Integrative Biology*, No 7, 2014, pp.76-83.
- [8] Tạ Ngọc Ly, N. T. B. N, Nghiên cứu tuyển chọn chủng vi sinh vật có khả năng thủy phân keratin của lông vũ gia cầm phân lập từ khu giết mổ gia cầm chợ Hòa Khánh, Đà Nẵng, *Tạp chí KHCN Đà Nẵng*, số 9, 2014, tr. 10-15.
- [9] Gutierrez, C. K., Matsui, G. Y., Lincoln, D. E., and Lovell, C. R, Production of the phytohormone indole-3-acetic acid by estuarine species of the genus *Vibrio*, *Applied and environmental microbiology*, No 75, 2009, pp.53-58.
- [10] Nahid, J. S., Shyamali, S., and Kazumi, H. High frequency shoot regeneration from petal explants of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. in vitro, *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, No 10, 2007, pp.56-61.
- [11] Glick, B. R, Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world, *Microbiological research*, No 169, 2014, pp.30-39.

(BBT nhận bài: 09/04/2015, phản biện xong: 02/06/2015)