

DOI: 10.22144/ctu.jvn.2022.046

## PHÂN LẬP VÀ NHẬN DIỆN VI KHUẨN CỐ ĐỊNH ĐẠM TỪ ĐẤT VÙNG RỄ CÂY BẮP Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Thái Thành Được<sup>1\*</sup> và Nguyễn Hữu Hiệp<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Nghiên cứu sinh ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Thái Thành Được (email: thanhduockg@gmail.com)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 08/11/2021

Ngày nhận bài sửa: 15/12/2021

Ngày duyệt đăng: 22/04/2022

### Title:

Isolation and identification of biologically nitrogen fixing bacteria from rhizosphere soil cultivated with maize in the Mekong Delta of Vietnam

### Từ khóa:

*Bacillus* sp, bắp, *Klebsiella* sp, cố định đạm, vùng rễ

### Keywords:

*Bacillus* sp, *Klebsiella* sp, maize, nitrogen fixing bacteria, rhizosphere

### ABSTRACT

This study is aimed at isolating and identifying some nitrogen fixing bacteria from the rhizosphere of maize roots. Soil samples of vegetative maize plants from the Mekong delta were collected. Nfb N-free, LGI and Burks N-free media were used for the isolation and evaluation bacteria which could synthesize  $NH_4^+$ . From rhizospheric soil of maize collected from several provinces in the Mekong Delta, 120 nitrogen fixing bacteria were isolated. Fifty bacterial strains which grew well in 3 types N-free media after 72 hours of incubation at 30°C were chosen for further studies. These bacteria could synthesize  $NH_4^+$  well in liquid medium after 72 hours. These fifty bacterial strains synthesized  $NH_4^+$  in liquid medium at days 2, 4 and 6 after inoculation with an average ranging from 0.82 mg/L to 4.28 mg/L. Six bacterial strains, which had the best at nitrogen fixing, were sequenced based on 16S rRNA. They belonged to three different genera, *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Klebsiella*.

### TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm phân lập và định danh một số dòng vi khuẩn cố định đạm từ đất vùng rễ cây bắp. Mẫu đất được thu thập tại ruộng trồng bắp giai đoạn sinh trưởng ở Đồng bằng sông Cửu Long. Ba môi trường gồm Nfb không N, môi trường LGI và môi trường Burks không N dùng để phân lập vi khuẩn và đánh giá vi khuẩn khả năng tổng hợp  $NH_4^+$ . Kết quả 120 dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm đã được phân lập từ 38 mẫu đất vùng rễ cây bắp. Năm mươi dòng vi khuẩn có khuẩn lạc phát triển mạnh trên 3 loại môi trường không N sau 72 giờ ủ ở 30°C sau cây đã được tuyển chọn cho các nghiên cứu tiếp theo. Năm mươi dòng vi khuẩn này có khả năng tổng hợp  $NH_4^+$  trong môi trường lỏng tại ngày 2, 4 và 6 nuôi cấy có trung bình dao động từ 0,82 mg/L đến 4,28 mg/L. Sáu dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm tốt nhất được giải trình tự gene 16S rRNA. Chúng thuộc 3 chi khác nhau gồm *Bacillus*, *Pseudomonas* và *Klebsiella*.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bắp (*Zea mays* L) là cây lương thực quan trọng trong nền kinh tế Việt Nam. Bắp có nhu cầu phân bón rất lớn. Tuy nhiên, khi bón phân vô cơ cho bắp quá nhiều sẽ gây ra ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng

đến sức khỏe con người và động vật (Tinh, 2003). Bên cạnh thị trường phân đạm hoá học tại Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) hiện nay, giá cao dẫn đến chi phí sản xuất trong canh tác cây trồng tăng lên. Trong sản xuất nông nghiệp hiện nay, việc

nâng cao độ phì nhiêu của đất, giảm lượng phân hóa học, tăng cường bón phân hữu cơ, vi sinh và sinh học, trong đó có vi khuẩn cố định N nhằm phát triển một nền nông nghiệp sinh thái bền vững là cần thiết và đang được quan tâm. Giải pháp sử dụng vi khuẩn cố định N sống tự do trong môi trường đất để chuyển hóa khí N<sub>2</sub> trong không khí thành thành NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> xảy ra trong điều kiện sinh lý bình thường nhờ năng lượng ATP và sự xúc tác bởi enzyme nitrogenase (John et al., 1995). Cây trồng hấp thu đạm để tổng hợp ra protein thực vật. Nghiên cứu của Puneet (1998) cho thấy việc chủng vi khuẩn thuộc chi *Azotobacter* sp. kích thích nảy mầm của hạt, kích thích ra rễ và sinh trưởng, năng suất bắp tăng 10-15% so với nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn. Theo Shabave et al. (1991), sử dụng chủng *Azospirillum lipoferum* cho bắp giúp làm giảm 50% lượng N khuyến cáo cho cây bắp nhưng năng suất không khác biệt so với nghiệm thức đối chứng dương bón 100% lượng N khuyến cáo. Các dòng vi khuẩn *Klebsiella* sp. Br1, *Klebsiella pneumoniae* Fr1, *Bacillus pumilus* S1r1 và *Bacillus subtilis* UPMB10 có khả năng cố định nitơ trong khí quyển để cung cấp đạm hữu dụng cho đất và cây trồng hấp thu, làm tăng năng suất bắp và giảm lượng phân bón hóa học rất đáng kể (Kuan et al., 2016). Tuy nhiên, các nghiên cứu về phân lập vi khuẩn có chức năng cố định đạm sống tự do trong đất vùng rễ bắp, nhằm áp dụng cho cây bắp vùng ĐBSCL tiết kiệm lượng phân đạm hóa học, giảm chi phí đầu vào trong canh tác bắp. Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập và nhận diện vi khuẩn cố định N sống tự do trong đất vùng rễ cây bắp tại các tỉnh ĐBSCL, để ứng dụng làm phân bón vi sinh giảm lượng phân đạm hoá học cho cây bắp.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Đất vùng rễ cây bắp đá (bắp tẻ), bắp nếp và bắp ngọt ở giai đoạn sinh trưởng từ 30-45 ngày sau khi gieo hạt. Cây bắp sinh trưởng tốt và không sâu bệnh gây hại được thu thập.

### 2.2. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn

Môi trường Nfb không đạm (Kirchhof et al., 1997) gồm 5 g acid malic, 0,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,02 g CaCl<sub>2</sub>, 0,1 g NaCl, 4,5 g KOH, 4 mL FeEDTA (1,64%), 2 mL KOH 0,2N, 2 mL vi lượng (a), 1 mL vitamin (b), 2 mL bromothymol blue 0,5%, thêm nước cất cho đủ 1 L và hiệu chỉnh pH 6,8. Trong đó, dung dịch vi lượng (a) 1 L gồm 0,4 g CuSO<sub>4</sub>, 0,12 g ZnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 1,4 g H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub>, 1,5 g

MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 1 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O. Dung dịch vitamin (b) 1 L gồm 1 mg vitamin H và 2 mg pyridoxine-HCl.

Môi trường LGI (Cavalcante & Döbereiner, 1988) gồm 100 g sucrose, 0,6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,02 g CaCl<sub>2</sub>, 0,01 g FeCl<sub>3</sub>, 0,002 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 5 mL bromothymol blue 0,5% trong KOH (0,2N), thêm nước cất cho đủ 1 L và hiệu chỉnh pH 6,0.

Môi trường Burks không N (Park et al., 2005) gồm 10 g sucrose, 0,41 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,52 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 g NaSO<sub>4</sub>, 0,2 g CaCl<sub>2</sub>, 0,1 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,005 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,0025 g NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, thêm nước cất cho đủ 1 L và hiệu chỉnh pH 7,0.

Môi trường LB dùng nuôi vi khuẩn cho định danh (Bertani, 1951) gồm 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl, hòa tan đều trong 1 L nước cất và hiệu chỉnh pH 7,0. Agar được sử dụng pha trong môi trường Nfb không N, môi trường LGI và môi trường Burks không N đặc là 18 g/L hoặc bán đặc là 1,8 g/L. Tất cả các môi trường được khử trùng 121oC trong 20 phút trước khi sử dụng.

## 2.3. Phương pháp

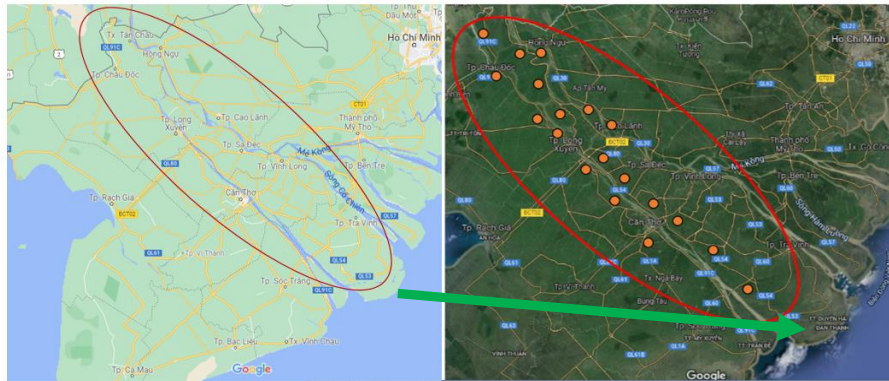
### 2.3.1. Thu mẫu

Thu mẫu ở các ruộng bắp tại 5 tỉnh, thành phố, thuộc ĐBSCL gồm An Giang, Đồng Tháp, Cần Thơ, Vĩnh Long và Trà Vinh có định vị tọa độ bằng Google map, vị trí ruộng bắp xác định dọc theo sông Tiền và sông Hậu thuộc ĐBSCL, nơi có lượng phù sa bồi đắp hằng năm, phù hợp với vi khuẩn phát triển (Hình 1). Mỗi tỉnh chọn 2-7 huyện (hoặc quận) và tại mỗi huyện chọn 1 đến 2 xã tương ứng với 2 ruộng đang canh tác bắp và bắp đang ở giai đoạn sinh trưởng từ 30-45 ngày sau khi gieo hạt. Trong mỗi ruộng bắp, 5 cây bắp theo đường chéo (4 cây ở 4 góc và 1 cây ở giữa ruộng) được thu thập. Xéng sạch được dùng để xắn và thu toàn bộ khối đất bao quanh rễ ở độ sâu từ 0 đến 20 cm từ lớp đất mặt. Phần đất bám quanh rễ của 5 cây bắp ở 5 vị trí trên ruộng bắp được tách nhẹ nhàng bằng tay và trộn đều theo phương pháp của Cự và ctv. (2001). Tổng cộng có 38 mẫu đất vùng rễ được lấy tại 38 ruộng bắp khác nhau ở khu vực ĐBSCL (Bảng 1). Lượng mẫu đất trên mỗi địa điểm là 500 g/mẫu và cho vào túi nylon ghi ký hiệu và dán nhãn lên túi, giữ lạnh 18-25°C (bằng thùng nhựa chứa đá lạnh) và chuyên chở về phòng thí nghiệm trong vòng 24 giờ. Mẫu đất được để ráo tự nhiên, tán nhỏ tiên hành đo PH nước bằng máy đo PH. Các mẫu đất chưa được phân lập sẽ buộc chặt và bảo quản trong tủ lạnh (5°C) tại phòng thí nghiệm Viện Công nghệ sinh học-Trường Đại học Cần Thơ.

**Bảng 1. Vị trí tọa độ thu mẫu, ký hiệu 38 mẫu đất và giống bắp đang sinh trưởng**

| Địa điểm                             | Ký hiệu | Tọa độ       |            | Giống bắp   |
|--------------------------------------|---------|--------------|------------|-------------|
|                                      |         | Kinh độ (0E) | Vĩ độ (0N) |             |
| An Giang, Chợ Mới, Kiến An           | AMDa    | 10.5450      | 105.3604   | Nếp CX 247  |
| An Giang, Chợ Mới, Mỹ Hội Đông       | AMDb    | 10.5360      | 105.3326   | Ngọt B905   |
| An Giang, Phú Tân, Hoà Lạc           | ABDa    | 10.6710      | 105.2213   | Ngọt COB    |
| An Giang, Phú Tân, Long Hòa          | ABDb    | 10.7613      | 105.2824   | Nếp Adi 603 |
| An Giang, Tân Châu, Tân An           | ATDa    | 10.8091      | 105.2080   | Đá LVN10    |
| An Giang, Tân Châu, Long An          | ATDb    | 10.7880      | 105.1794   | Đá NK7328   |
| An Giang, Châu Thành, Bình Hoà       | ACDa    | 10.4508      | 105.3272   | Nếp CX 247  |
| An Giang, Châu Thành, Bình Hoà       | ACDb    | 10.4566      | 105.3283   | Nếp SD268   |
| An Giang, Châu Phú, Vĩnh Thạnh Trung | APDa    | 10.5990      | 105.1958   | Đá DK 9955  |
| An Giang, Châu Phú, Bình Mỹ          | APDb    | 10.5546      | 105.2729   | Đá LVN10    |
| An Giang, Châu Đốc, Vĩnh Ngươn       | ADDa    | 10.7582      | 105.0977   | Đá DK 9955  |
| An Giang, Châu Đốc, Vĩnh Châu        | ADDb    | 10.6443      | 105.1100   | Đá NK7328   |
| An Giang, An Phú, Phú Hội            | AADa    | 10.8573      | 105.0525   | Đá DK 9955  |
| An Giang, An Phú, Phú Hữu            | AADb    | 10.9134      | 105.0909   | Đá NK7328   |
| háp, Cao Lãnh, Tân Thuận Tây         | DLDa    | 10.4825      | 105.5786   | Nếp Wax50   |
| Đồng Tháp, Cao Lãnh, Tịnh Thới       | DLDb    | 10.4218      | 105.6749   | Đá NK7328   |
| Đồng Tháp, Thanh Bình, Tân Huệ       | DBDa    | 10.6244      | 105.3551   | Đá AG59     |
| Đồng Tháp, Thanh Bình, Tân Long      | DBDb    | 10.5702      | 105.4085   | Đá C919     |
| Đồng Tháp, Lấp Vò, Bình Thành        | DVDa    | 10.3417      | 105.5006   | Đá NK4300   |
| Đồng Tháp, Lấp Vò, Bình Thành        | DVDb    | 10.3412      | 105.5167   | Nếp MX-2    |
| háp, Hồng Ngự, Long Khánh A          | DNDa    | 10.8083      | 105.2875   | Đá DK 9955  |
| háp, Hồng Ngự, Long Khánh B          | DNDb    | 10.7930      | 105.3173   | Đá NK7328   |
| Cần Thơ, Thốt Nốt, Thạnh Hoà         | CTDa    | 10.2236      | 105.5325   | Nếp SD268   |
| Cần Thơ, Thốt Nốt, Thuận Hưng        | CTDb    | 10.2190      | 105.5709   | Nếp CX247   |
| Cần Thơ, Ô Môn, Thới An              | CODa    | 10.1524      | 105.6321   | Nếp CX247   |
| Cần Thơ, Ô Môn, Thới Long            | CODb    | 10.1709      | 105.6205   | Nếp Tím 099 |
| Cần Thơ, Phong Điền, Nhơn Nghĩa      | CPDa    | 9.9831       | 105.7092   | Đá LVN10    |
| Cần Thơ, Phong Điền, Nhơn Nghĩa      | CPDb    | 9.9612       | 105.6728   | Đá NK66     |
| Vĩnh Long, Bình Minh, Mỹ Hoà         | VMDa    | 10.0538      | 105.8126   | Nếp Max68   |
| Vĩnh Long, Bình Minh, Mỹ Hoà         | VMDb    | 10.0569      | 105.8178   | Nếp CX247   |
| Vĩnh Long, Trà Ôn, Vĩnh Xuân         | VODa    | 9.9651       | 106.0129   | Nếp Milky36 |
| Vĩnh Long, Trà Ôn, Thuận Thới        | VODb    | 9.9503       | 106.0384   | Nếp CX247   |
| Vĩnh Long, Bình Tân, Mỹ Thuận        | VTDa    | 10.1176      | 105.8341   | Nếp Adi 603 |
| Vĩnh Long, Bình Tân, Tân Quới        | VTDb    | 10.0965      | 105.7540   | Nếp Wax50   |
| Trà Vinh, Cầu Kè, Hoà Tân            | TKDa    | 9.8510       | 106.0323   | Đá SSC557   |
| Trà Vinh, Cầu Kè, Hoà Tân            | TKDb    | 9.8454       | 106.0307   | Nếp MX-2    |
| Trà Vinh, Tiểu Cần, Hiếu Trung       | TCDa    | 9.8725       | 106.1697   | Đá AG69     |
| Trà Vinh, Tiểu Cần, Hiếu Từ          | TCDb    | 9.8564       | 106.2069   | Đá NK7328   |

\*Ghi chú: Chữ in hoa trong cột ký hiệu theo thứ tự: tỉnh, huyện; D là đất, a là vị trí mẫu 1 và b là vị trí mẫu 2 của mỗi huyện.



(A)

(B)

**Hình 1. Bản đồ thể hiện vị trí thu mẫu đất vùng rễ cây bắp ở 5 tỉnh ĐBSCL**

Ghi chú: (A) Vị trí 5 tỉnh theo google map chỉ đường, (B) Vị trí 5 tỉnh google map vệ tinh,

● Ký hiệu các huyện lấy mẫu đất

2.3.2. Xử lý mẫu

Mười g mẫu đất đã xử lý và 90 mL nước cất vô trùng được cho vào bình tam giác 250 mL đã khử trùng khô có nút gòn. Mẫu được đặt trên máy lắc ngang và được lắc với tốc độ 200 vòng/phút trong 2 giờ, sau đó, để yên 1 giờ ở phòng thí nghiệm và tiến hành pha loãng mẫu dịch huyền phù vi sinh vật theo các dãy nồng độ  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ... Micropipet được dùng để hút 50  $\mu$ L mẫu ở mỗi nồng độ nhỏ lên giữa đĩa thạch của 3 loại môi trường khác nhau *Nfb* không N, Burks không N và môi trường LGI. Que thủy tinh vô trùng được trải đều mẫu lên mặt môi trường và ủ trong tủ ủ ở 30°C trong 2- 4 ngày. Các khuẩn vi khuẩn phát triển trên từng loại môi trường có hình thái khuẩn lạc khác nhau được chọn để cấy ria và tách rông liên tục lên các đĩa petri tương ứng với môi trường nuôi cấy (*Nfb*, LGI, Burks) để thu khuẩn lạc thuần. Tiếp tục cấy ria để chọn vi khuẩn rông và giữ giống vi khuẩn trong thạch nghiêng.

2.3.3. Kiểm tra khả năng cố định đạm của các dòng vi khuẩn

\* Nguyên lý hoạt động: Nồng độ  $NH_4^+$  được đo tạo ra từ phản ứng giữa phenol và  $NH_3$  với sự hiện diện của tác nhân oxy hoá là hypochlorite hình thành phức có màu xanh, điều kiện pH kiểm bằng phương pháp Indophenol Blue (Page et al., 1982).

**Bảng 2. Thành phần thuốc thử và nồng độ của đường chuẩn  $NH_4^+$**

| Thành phần                        | Ống nghiệm |   |   |   |   |   |
|-----------------------------------|------------|---|---|---|---|---|
|                                   | 0          | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Nước (mL)                         | 5          | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 |
| $NH_4^+$ chuẩn (mL)               | 0          | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Phenol nitroprusside (mL)         | 5          | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Hypochloride buffer (mL)          | 5          | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Hàm lượng $NH_4^+$ / 1 ống (mg/L) | 0          | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

\* Chuẩn bị nguồn vi khuẩn thí nghiệm: Các dòng vi khuẩn phân lập sau khi làm thuần được nhân nuôi sinh khối trong ống nghiệm 10 mL tiệt trùng chứa 2,5 mL môi trường nuôi cấy lỏng tương ứng với môi trường rắn dùng phân lập chúng (*Nfb*, LGI và Burks). Sau đó, các ống nghiệm chứa mẫu được ủ ở nhiệt độ phòng trên máy lắc ngang với tốc độ 120 vòng/phút trong 3 ngày, khi đó mật số vi khuẩn trong ống nghiệm dao động từ  $10^7$  đến  $10^8$  cfu/mL.

\* Bố trí thí nghiệm: 1 mL vi khuẩn gốc được nuôi ở trên được cho vào các ống Falcon 50 mL tiệt trùng chứa 10 mL môi trường lỏng nuôi cấy tương ứng (không đậm). Các Falcon chứa mẫu được lắc trên máy lắc ngang với tốc độ 120 vòng/phút ở điều kiện phòng thí nghiệm trong 6 ngày. Mỗi nghiệm thức tương ứng với 1 dòng vi khuẩn được thực hiện với 3 lần lặp lại và nghiệm thức đối chứng cho từng loại môi trường nuôi cấy được thực hiện tương tự nhưng không bổ sung vi khuẩn vào.

\* Xây dựng đường chuẩn: Gồm 6 ống nghiệm được đánh số theo thứ tự 0-1-2-3-4-5 với ống 0 là ống đối chứng âm và thêm các thành phần vào mỗi ống nghiệm (Bảng 2). Vortex 6 ống nghiệm để ở nhiệt độ phòng 30 phút và phản ứng tạo màu xảy ra nồng độ  $NH_4^+$  càng cao thì màu xanh càng đậm.

\* *Chỉ tiêu theo dõi:* Lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> được xác định sinh ra bởi vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy lỏng sau 2, 4 và 6 ngày nuôi cấy bằng phương pháp so màu trên quang phổ kế; tiến hành rút 1,5 mL từ ống Falcon 50 mL dịch vi khuẩn trong môi trường tương ứng (không đạm) cho vào Eppendorf (lặp lại 3 lần), ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút, chiết rút phần dịch trong 1 mL đã ly tâm vào 4 mL H<sub>2</sub>O, 5 mL buffer, sau đó cho 5 mL thuốc thử; tiến hành đo OD tại bước sóng 640 nm và số liệu về lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sinh ra từ các dòng vi khuẩn được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion XV.

2.3.4. *Khuếch đại vùng gene 16S rRNA bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự DNA*

Sáu dòng vi khuẩn được chọn có khả năng cố định đạm cao, tiếp tục nuôi trong ống nghiệm 10 mL tiệt trùng chứa 5 mL môi trường LB lỏng. Các ống nghiệm chứa mẫu được ủ ở 30°C trong 24 giờ trên máy lắc ngang với tốc độ 120 vòng/phút ở điều kiện phòng thí nghiệm, sau đó tiến hành ly trích DNA theo quy trình của Santos et al. (2001). Phản ứng khuếch đại vùng gene 16S rRNA của các dòng vi khuẩn vùng rễ được tiếp tục thực hiện theo Lane (1991) với cặp mồi:

27F 5'-AGAGTTTGATCTGGCTC-3'

1492R 5'-TACGGTACCTTGTTACGACT-3'

Phản ứng PCR thực hiện thể tích 50µL, bao gồm: 26,5 µL nước cất hai lần, 5 µL Buffer 10X ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4 µL MgCl<sub>2</sub>, 9 µL dNTP, 1 µL mồi 27F, 1 µL mồi 1492R, 1 µL dimethyl sulfoxide, 0,5 µL Taq DNA polymerase, 2 µL ADN vi khuẩn. Sau đó, các mẫu được thực hiện với 30 chu kỳ nhiệt trên máy PCR Apolo™ ATC401 Thermal Cycler: 1' ở 95°C, 1' ở 53°C và 1,5 phút ở 72°C.

Sản phẩm PCR được tinh sạch, đo nồng độ DNA sau khi tinh sạch, thực hiện phản ứng gắn huỳnh quang và gửi mẫu đến Bộ môn Sinh học Phân tử Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ giải trình tự DNA.

Chương trình BLAST N được sử dụng để so sánh trình tự 16S rRNA của các dòng vi khuẩn chọn lọc với trình tự 16S rRNA các chủng vi khuẩn trong GenBank và xây dựng cây phả hệ gene các dòng vi khuẩn được giải trình tự bằng phần mềm MEGA X (Kumar et al., 2018).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

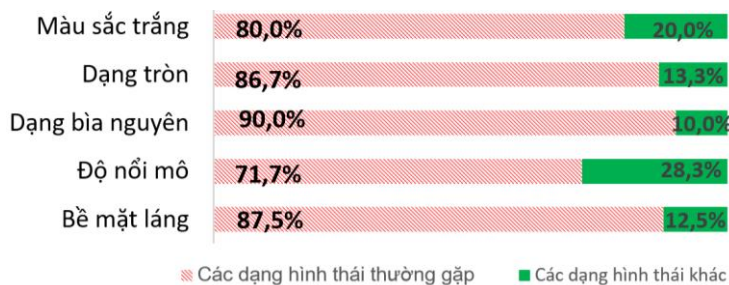
3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn cố định đạm

Từ 38 mẫu đất được thu thập tại các ruộng bắp ở các địa phương khác nhau, có pH dao động từ 4,97 đến 7,04 và có trung bình pH 6,32 phân lập được 120 dòng vi khuẩn cố định đạm. Trong đó, có 60 vi khuẩn phát triển trên môi trường *Nfb* 30 vi khuẩn phát triển trên môi trường LGI và 30 dòng vi khuẩn phát triển trên môi trường Burks. Trong đó, có 40 dòng vi khuẩn được phân lập từ 14 mẫu đất An Giang, 30 dòng vi khuẩn được phân lập từ 8 mẫu đất thu tại Đồng Tháp, 40 dòng vi khuẩn phân lập từ 6 mẫu đất thu tại Cần Thơ, 18 dòng vi khuẩn phân lập từ mẫu đất thu tại Vĩnh Long và 12 dòng vi khuẩn phân lập từ 4 mẫu đất thu tại Trà Vinh. Trung bình từ một mẫu đất thu thập phân lập được từ 1 đến 3 dòng vi khuẩn cố định đạm khác nhau. Các dòng vi khuẩn phân lập được đều sinh trưởng và phát triển trong điều kiện vi hiếu khí. Cuối cùng tuyển chọn được 50 trong tổng số 120 dòng vi khuẩn cố định đạm phân lập dựa vào đặc tính phát triển mạnh sau 24 giờ nuôi cấy và phát triển nhanh sau 48 giờ đến 72 giờ cấy và ủ ở 30°C trên môi trường phân lập.

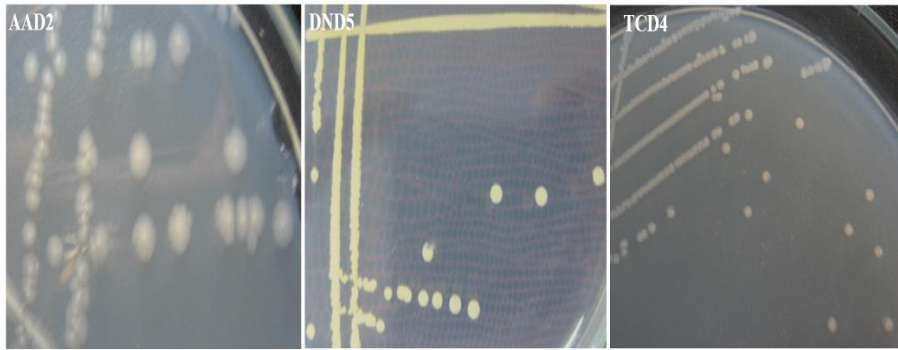
3.2. Hình thái khuẩn lạc và đặc điểm tế bào của vi khuẩn

3.2.1. Hình thái khuẩn lạc

Hình thái khuẩn lạc của 120 dòng vi khuẩn đất vùng rễ bắp chủ yếu là hình tròn đều hoặc không đều, bìa nguyên hoặc răng cưa, độ nổi mô hoặc lồi, có bề mặt trơn láng hoặc lồi tâm hoặc sần, đường kính khuẩn lạc đo được dao động từ 0,4 đến 5,0 mm (Hình 2 và Hình 3).



Hình 2. Các dạng hình thái khuẩn lạc của vi khuẩn



**Hình 3. Đặc điểm khuẩn lạc 03 dòng vi khuẩn**

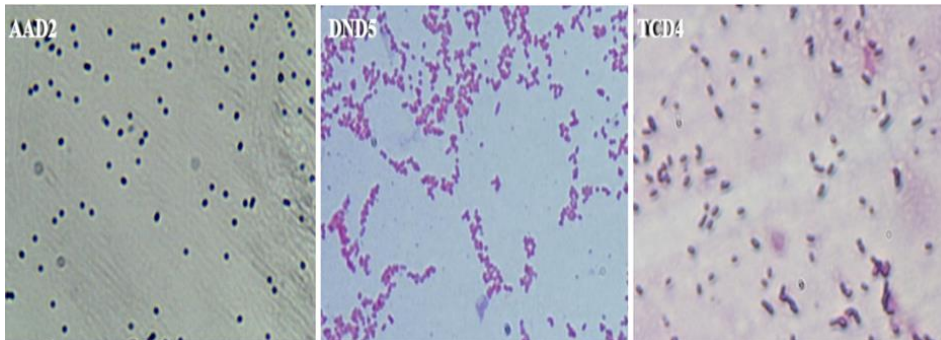
\*Ghi chú: AAD2 trắng đục, dạng tròn, bìa răng cưa, lồi, bề mặt láng; DND5 vàng nhạt, dạng tròn, bìa nguyên, mô, láng; TCD4 trắng trong, dạng tròn, bìa nguyên, mô, bề mặt láng.

3.2.2. Đặc điểm tế bào của các dòng vi khuẩn

Tế bào các dòng vi khuẩn được phân lập được có 2 dạng hình que chiếm tỷ lệ cao nhất 80,8%, còn lại 19,2% hình cầu. Có 6,7% tổng số các dòng vi khuẩn không có khả năng chuyển động và còn lại 93,3% các dòng vi khuẩn chuyển động với tốc độ khác nhau. Tỷ lệ vi khuẩn Gram âm chiếm 67,5%, cao hơn so với Gram dương (32,5%) (Bảng 3 và Hình 4).

**Bảng 3. Đặc điểm tế bào các dòng vi khuẩn**

| STT | Đặc điểm         | Các loại | Tỷ lệ(%) |
|-----|------------------|----------|----------|
| 1   | Hình dạng tế bào | Que      | 80,8     |
|     |                  | Cầu      | 19,2     |
| 2   | Chuyển động      | Nhanh    | 56,7     |
|     |                  | Chậm     | 36,7     |
|     |                  | Không    | 6,7      |
| 3   | Gram             | Dương    | 32,5     |
|     |                  | Âm       | 67,5     |



**Hình 4. Hình dạng tế bào vi khuẩn phân lập sau khi nhuộm Gram**

\*Ghi chú: Gram dương- dòng AAD, Gram âm- dòng DND5 và Gram âm- dòng TCD4 ở độ phóng đại 400X

Các dòng vi khuẩn cố định đạm được phân lập từ đất vùng rẫy trước đây đã được báo cáo công bố bao gồm các chi *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, ... thuộc Gram âm; *Bacillus* thuộc Gram dương. Các vi khuẩn thuộc các chi này thường có dạng que ngắn (trừ *Bacillus* có dạng que dài), một số có tiên mao, có khả năng chuyển động. Các chi *Azospirillum* và *Burkholderia* đã được phân lập ở cây bắp và nhận diện có gene cố định đạm (Hiệp & Khanh, 2010). Các vi khuẩn này cũng đã được khảo sát về khả năng cố định đạm, hòa tan lân khó tan, phân giải kali và một số lợi ích khác mang đến cho thực vật (Trúc, 2011).

**3.3. Kiểm tra khả năng cố định đạm của các dòng vi khuẩn**

Tuyển chọn 50 dòng vi khuẩn phân lập có khả năng cố định đạm dựa vào đặc tính phát triển tốt trên môi trường không đạm bao gồm 25 dòng phân lập trên môi trường *Nfb*, 15 dòng phân lập trên môi trường Burks và 10 dòng phân lập trên môi trường LGI. Năm mươi dòng này tiếp tục được khảo sát khả năng cố định đạm thông qua việc tổng hợp NH<sub>4</sub><sup>+</sup> trong môi trường nuôi cây lông không đạm sau 2, 4 và 6 ngày sau khi chủng.

3.3.1. Khả năng cố định đạm của 25 dòng vi khuẩn phân lập trong môi trường Nfb

Kết quả thống kê (Bảng 4) cho thấy tất cả 25 dòng vi khuẩn phân lập trên môi trường Nfb đều có khả năng tổng hợp NH<sub>4</sub><sup>+</sup> với lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> tạo ra ở ngày thứ 2 dao động từ 0,35-4,33 mg/L. Trong đó, dòng vi khuẩn VMD1 tổng hợp NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cao nhất (4,33 mg/L). Vào ngày thứ 4, các dòng vi khuẩn tổng hợp NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dao động từ 0,85-5,46 mg/L, trong đó, có 13 trong tổng số 25 dòng vi khuẩn thử nghiệm cho hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> tổng hợp cao trên 2 mg/L. Đặc biệt, dòng ADD2 cho lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cao nhất, đạt 5,46 mg/L và khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) khi so sánh với tất cả dòng vi khuẩn thử nghiệm còn lại, kể đến là các dòng vi khuẩn tổng hợp lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cao là VMD1 (4,71 mg/L), DLD1 (4,61 mg/L), VTD1 (3,48 mg/L), VOD1 (3,42 mg/L) và COD2 (3,11 mg/L). Đến ngày thứ 6, hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> của tất cả các dòng vi khuẩn đều giảm xuống rõ rệt và

dao động từ 0,56-3,12 mg/L. Trong đó, có 6 trong tổng số 25 dòng vi khuẩn thử nghiệm có hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> tổng hợp cao trên 2 mg/L gồm các dòng VMD1 (3,12 mg/L), AAD2 (2,90 mg/L), DLD1 (2,79 mg/L), VTD1 (2,77 mg/L), ACD4 (2,68 mg/L) và AMD3 (2,18mg/L). Đặc biệt, dòng VMD1 cho hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cao nhất (3,12 mg/L) và khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) khi so sánh với các dòng vi khuẩn còn lại. Giá trị NH<sub>4</sub><sup>+</sup> tổng hợp qua 2, 4 và 6 ngày nuôi cấy của các dòng vi khuẩn có sự khác biệt ý nghĩa thống kê khi so sánh với nhau (p<0,05). Kết quả cho thấy có 4 trong tổng số 25 dòng vi khuẩn thử nghiệm tổng hợp NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cao trên 3 mg/L gồm các dòng VMD1, AAD2, VTD1 và DLD1, tuy nhiên, giá trị trung bình hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> của 2, 4, và 6 ngày nuôi cấy của hai dòng vi khuẩn VMD1 và AAD2 cao nhất, do vậy, hai dòng vi khuẩn này được chọn để giải trình tự đoạn gene 16S rRNA.

**Bảng 4. Hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mg/L) tổng hợp trong môi trường Nfb lỏng bởi 25 dòng vi khuẩn thử nghiệm**

| STT    | Dòng vi khuẩn | Thời gian khảo sát (ngày nuôi cấy) |          |          | Trung bình |
|--------|---------------|------------------------------------|----------|----------|------------|
|        |               | 2                                  | 4        | 6        |            |
| 1      | AMD1          | 1,19lm                             | 1,18j    | 0,99l    | 1,12fgh    |
| 2      | AMD3          | 1,03n                              | 1,85     | 2,18d    | 1,69c-h    |
| 3      | AMD4          | 0,83op                             | 1,02j    | 1,11kl   | 0,99gh     |
| 4      | ABD1          | 1,35j                              | 1,20j    | 0,77m    | 1,11fgh    |
| 5      | ABD2          | 0,80p                              | 0,97j    | 0,70mn   | 0,82gh     |
| 6      | ABD3          | 0,47q                              | 0,85j    | 1,31j    | 0,88gh     |
| 7      | ACD2          | 0,87o                              | 2,11ghi  | 1,01l    | 1,33d-h    |
| 8      | ACD3          | 1,29k                              | 1,04j    | 1,02l    | 1,12fgh    |
| 9      | ACD4          | 2,12e                              | 2,17ghi  | 2,68c    | 2,33cd     |
| 10     | APD1          | 0,79p                              | 2,30gh   | 1,26jk   | 1,45d-h    |
| 11     | APD2          | 0,35r                              | 1,72i    | 0,56n    | 0,88gh     |
| 12     | APD3          | 1,97f                              | 2,15ghi  | 1,50hi   | 1,87c-g    |
| 13     | ADD1          | 0,52q                              | 1,01j    | 1,65gh   | 1,06gh     |
| 14     | AAD2          | 3,70b                              | 5,46a    | 2,90b    | 4,02a      |
| 15     | AAD4          | 1,16m                              | 1,04j    | 1,51hi   | 1,24e-h    |
| 16     | AAD5          | 0,84op                             | 1,84hi   | 1,73fg   | 1,47d-h    |
| 17     | DLD1          | 3,41c                              | 4,61b    | 2,79bc   | 3,60ab     |
| 18     | DVD1          | 1,82g                              | 2,87def  | 1,82efg  | 2,17cde    |
| 19     | DND1          | 2,02f                              | 2,44fg   | 1,84ef   | 2,10c-f    |
| 20     | COD2          | 1,68h                              | 3,11cd   | 1,97e    | 2,26cde    |
| 21     | VMD1          | 4,32a                              | 4,71b    | 3,12a    | 4,05a      |
| 22     | VOD1          | 2,83d                              | 3,42c    | 1,72fg   | 2,66bc     |
| 23     | VTD1          | 4,33a                              | 3,48c    | 2,77bc   | 3,52ab     |
| 24     | VTD2          | 1,50i                              | 2,57efg  | 1,65gh   | 1,91c-g    |
| 25     | TKD1          | 1,24kl                             | 2,92de   | 1,39ij   | 1,85c-h    |
| F      |               | 5539,42**                          | 106,59** | 241,00** | 7,33*      |
| CV (%) |               | 1,59                               | 9,18     | 4,81     | 33,33      |

\*Ghi chú: Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau khác nhau thì có khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 1% (\*\*) và 5% (\*). Các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Số theo sau cột chữ là thứ tự dòng vi khuẩn.

3.3.2. Khả năng cố định đạm của 10 dòng vi khuẩn trong môi trường LGI

Đối với 10 dòng vi khuẩn phân lập thử nghiệm trong môi trường LGI lỏng (Bảng 5), tất cả các dòng này đều có khả năng cố định đạm của khí trời để tổng hợp NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, với lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> tạo ra vào ngày thứ 2 dao động từ 0,82-2,89 mg/L. Trong đó, dòng vi khuẩn TCD4 tổng hợp NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cao nhất (2,89 mg/L). Kết quả này cho thấy các dòng vi khuẩn cố định đạm phân lập trên môi trường LGI cho kết quả tổng hợp NH<sub>4</sub><sup>+</sup> thấp hơn so với các dòng vi khuẩn cố định đạm được phân lập trên môi trường *Nfb* vào thời điểm 2 ngày thí nghiệm. Vào ngày thứ 4, các dòng vi khuẩn tổng hợp NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dao động từ 1,87-5,62 mg/L. Trong đó, có 8 trong tổng số 10 dòng vi khuẩn thử nghiệm

cho hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> tổng hợp cao trên 2 mg/L. Dòng TCD4 đạt 5,62 mg/L và TCD3 đạt 5,43 mg/L. Hai dòng này cố định đạm cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) khi so sánh với tất cả dòng còn lại. Đến ngày thứ 6, hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> tổng hợp của tất cả các dòng vi khuẩn dao động từ 1,20-4,55 mg/L và có chiều hướng giảm xuống. Dòng vi khuẩn TCD3 tổng hợp NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cao và đạt giá trị 4,55 mg/L. Kết quả cho thấy chỉ có 2 dòng vi khuẩn TCD4 và TCD3 cố định đạm cao với hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> tổng hợp cao trên 4 mg/L, tương ứng 4,28 mg/L và 4,06 mg/L của trung bình các ngày 2, 4, và 6 và khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) khi so sánh với các dòng vi khuẩn còn lại. Do đó, hai dòng vi khuẩn TCD4 và TCD3 được chọn để giải trình tự đoạn gene 16S rRNA.

**Bảng 5. Hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mg/L) tổng hợp trong môi trường LGI bởi 10 dòng vi khuẩn thử nghiệm**

| STT | Dòng vi khuẩn | Thời gian khảo sát (ngày nuôi cấy) |          |           | Trung bình |
|-----|---------------|------------------------------------|----------|-----------|------------|
|     |               | 2                                  | 4        | 6         |            |
| 1   | AMD5          | 0,82d                              | 2,02cd   | 1,39f     | 1,41c      |
| 2   | ATD3          | 1,07cd                             | 1,87d    | 1,45f     | 1,46c      |
| 3   | AAD6          | 2,69a                              | 3,44b    | 3,08c     | 3,07ab     |
| 4   | DND7          | 1,16c                              | 1,91cd   | 1,20g     | 1,42c      |
| 5   | CTD2          | 2,27b                              | 2,09cd   | 2,30d     | 2,22bc     |
| 6   | DVD4          | 0,92cd                             | 2,06cd   | 1,25g     | 1,41c      |
| 7   | VOD2          | 2,81a                              | 2,08cd   | 1,69e     | 2,19bc     |
| 8   | TCD3          | 2,87a                              | 5,43a    | 4,55a     | 4,28a      |
| 9   | TCD4          | 2,89a                              | 5,62a    | 3,67b     | 4,06a      |
| 10  | TKD3          | 2,85a                              | 2,26c    | 1,76e     | 2,29bc     |
|     | F             | 204,48**                           | 244,78** | 1387,22** | 6,47*      |
|     | CV (%)        | 5,47                               | 5,64     | 2,41      | 31,09      |

\*Ghi chú: Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau khác nhau thì có khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 1% (\*\*\*) và 5% (\*). Các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Số theo sau cột chữ là thứ tự dòng vi khuẩn.

3.3.3. Khả năng cố định đạm của 15 dòng vi khuẩn trong môi trường Burks

Kết quả khảo sát khả năng cố định đạm thông qua việc tổng hợp NH<sub>4</sub><sup>+</sup> của 15 dòng vi khuẩn thử nghiệm trong môi trường Burks lỏng (Bảng 6) cho thấy tất cả 15 dòng thử nghiệm đều có khả năng cố định đạm với lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> khác nhau và vào thời điểm 2 ngày thí nghiệm, hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dao động trong khoảng từ 0,76-4,26 mg/L. Có 4 trong tổng số 15 dòng vi khuẩn tổng hợp NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cao hơn 3 mg/L. Vào ngày thứ 4, các dòng vi khuẩn thử nghiệm tổng hợp NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dao động từ 0,93-4,87 mg/L. Ở thời điểm này có 3 trong tổng số 15 dòng vi khuẩn thử nghiệm cho hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> tổng hợp cao trên 3mg/L. Trong đó, DND5 đạt 4,87 mg/L, kế tiếp là COD4 đạt 4,69mg/L và DBD7 đạt 3,85 mg/L. Đến ngày thứ 6, hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> tổng hợp của tất cả các dòng

vi khuẩn dao động từ 0,77-4,12 mg/L. Trong đó, có 3 trong tổng số 15 dòng vi khuẩn tổng hợp hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cao hơn 3 mg/L gồm COD4 (4,12 mg/L), DND5 (3,57 mg/L) và DBD7 (3,04 mg/L). Cả 3 dòng vi khuẩn này cho hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) khi so sánh với các dòng vi khuẩn còn lại. Giá trị trung bình NH<sub>4</sub><sup>+</sup> được tổng hợp qua 2, 4 và 6 ngày thí nghiệm của 2 dòng vi khuẩn COD4 và DND5 lần lượt đạt 4,13 mg/L và 4,02 mg/L, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) khi so sánh với các dòng vi khuẩn còn lại và hai dòng vi khuẩn này được tuyển chọn để giải trình tự đoạn gene 16S rRNA.

Khuynh hướng chung của các dòng vi khuẩn phân lập trên cả 3 môi trường *Nfb*, LGI và Burks là lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> tổng hợp tăng dần từ 0 đến ngày thứ 4 và giảm xuống ở ngày thứ 6. Nguyên nhân do vi



khuẩn phát triển và tăng sinh khối theo thời gian nên lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> tổng hợp tăng dần. Đến ngày thứ 4, lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> tổng hợp tăng cao. Khi lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> trong môi trường tăng cao vượt quá giới hạn sẽ ức chế ngược lại vi khuẩn, vi khuẩn sử dụng lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> có sẵn trong môi trường và không tổng hợp thêm NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nên lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> khảo sát vào ngày thứ 6 giảm xuống rất đáng kể (Van & Sloger, 1981). Nguyên nhân thứ hai là do hàm lượng dinh dưỡng trong môi trường dần cạn kiệt theo thời gian và theo thời gian các vi khuẩn tạo ra các chất ức chế lẫn nhau làm ảnh hưởng đến sự phát triển mật số của các dòng vi khuẩn và ức chế quá trình tổng hợp NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Nghiên cứu của Van and Diep (2016) phân lập vi khuẩn cố định đạm từ đất vùng rẫy và bộ phận cây đậu nành tại tỉnh Daknong cho thấy các vi khuẩn nhân nuôi trên môi trường Burks không đạm và NBRIP lỏng bao gồm các dòng *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter lwoffii*, *Agrobacterium tumefaciens* tổng hợp NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

cao nhất với nồng độ 3,86 mg/L vào ngày thứ 2 sau khi chủng. Nghiên cứu của Oanh và ctv. (2013) phân lập các dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm từ vùng đất rẫy lúa tại Trà Vinh cho thấy các dòng vi khuẩn được nhân nuôi trên môi trường Burks không đạm tổng hợp NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cao nhất ở nồng độ 4,65 mg/L vào ngày thứ 4 sau khi chủng. Tương tự, nghiên cứu của Thavasi et al. (2006) phân lập các dòng vi khuẩn cố định đạm từ đất ô nhiễm dầu cho thấy các dòng vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* có khả năng cố định đạm đạt 4,2 mg/L vào ngày thứ 4 sau khi chủng. Kết quả nghiên cứu Pha và ctv. (2015) đã phân lập các dòng vi khuẩn cố định đạm từ đất vùng rẫy lúa ở ĐBSCL trên môi trường Burks không đạm và kết quả cho thấy vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens*, *Bacillus megaterium* và *Ideonella* sp. tổng hợp NH<sub>4</sub><sup>+</sup> trung bình qua các ngày 2, 4 và 6 lần lượt 1,76 mg/L, 1,87 mg/L, 2,21mg/L và 3,52 mg/L.

**Bảng 6. Hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mg/L) tổng hợp trong môi trường Burks bởi 15 dòng vi khuẩn thử nghiệm**

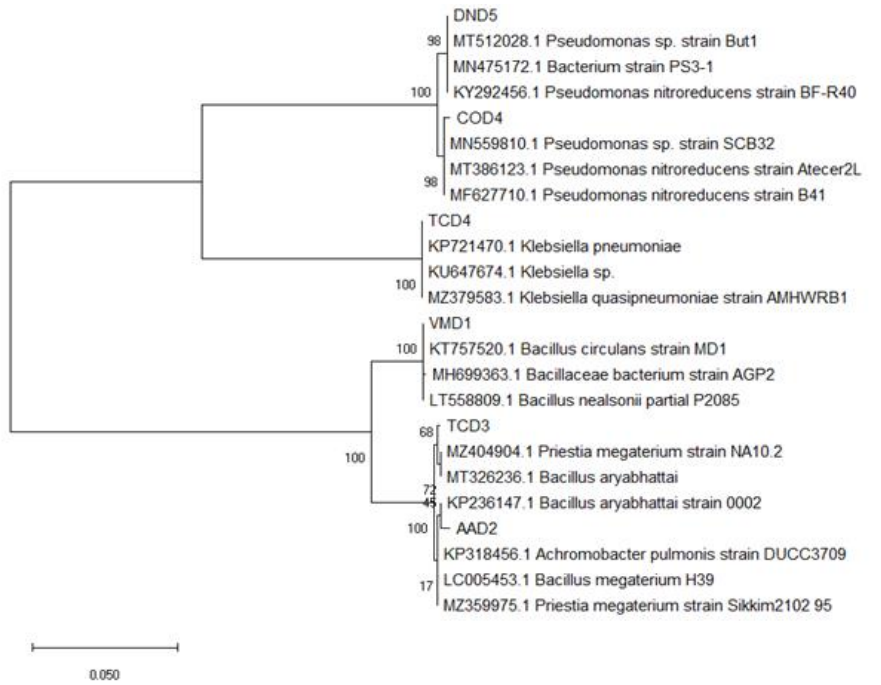
| STT    | Dòng vi khuẩn | Thời gian khảo sát (ngày nuôi cấy) |          |           | Trung bình |
|--------|---------------|------------------------------------|----------|-----------|------------|
|        |               | 2                                  | 4        | 6         |            |
| 1      | ABD5          | 1,16e                              | 1,42f    | 0,80j     | 1,13fg     |
| 2      | ATD4          | 0,76g                              | 0,93g    | 0,77j     | 0,82g      |
| 3      | DBD3          | 1,15e                              | 1,49f    | 1,10i     | 1,25fg     |
| 4      | DBD7          | 1,83c                              | 3,85b    | 3,04c     | 2,91bc     |
| 5      | DBD8          | 1,18e                              | 2,80c    | 1,74g     | 1,91c-g    |
| 6      | DND4          | 1,61d                              | 2,23e    | 2,33e     | 2,06b-f    |
| 7      | DND5          | 3,61b                              | 4,87a    | 3,57b     | 4,02 a     |
| 8      | CTD3          | 4,26a                              | 2,70     | 2,46d     | 3,14ab     |
| 9      | CTD6          | 1,19e                              | 2,18e    | 1,49h     | 1,62dfg    |
| 10     | COD4          | 3,58b                              | 4,69a    | 4,12a     | 4,13 a     |
| 11     | CPD4          | 1,14e                              | 2,52cd   | 1,70g     | 1,79dfg    |
| 12     | VOD6          | 1,11e                              | 2,24e    | 1,59h     | 1,65dfg    |
| 13     | VTD6          | 3,60b                              | 2,20e    | 1,71g     | 2,50bcd    |
| 14     | TKD4          | 1,09e                              | 2,37de   | 2,00f     | 1,82c-g    |
| 15     | TCD6          | 1,15e                              | 2,19e    | 1,39      | 1,58dfg    |
| F      |               | 606,18**                           | 489,31** | 1351,13** | 6,78*      |
| CV (%) |               | 4,54                               | 3,38     | 2,30      | 30,77      |

\*Ghi chú: Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau khác nhau thì có khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 1% (\*\*) và 5% (\*). Các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Số theo sau cột chữ là thứ tự dòng vi khuẩn.

**3.4. Kết quả định danh dựa trên trình tự gene 16S rRNA của 6 dòng vi khuẩn cố định đạm tuyển chọn**

Trình tự 16S rRNA của 6 dòng vi khuẩn đất vùng rẫy bắp được tuyển chọn có chiều dài từ 985 đến 1260 nucleotide, chiều dài trình tự đảm bảo theo yêu cầu và kết quả so sánh với ngân hàng dữ liệu gene NCBI, mức độ tương đồng từ 97-100%. Đối với mỗi dòng, 3 loài trên ngân hàng dữ liệu được chọn để tiến hành xây dựng cây phát sinh loài, từ đó xác định 6 loài đã

được xác định trình tự (Hình 5). Việc phân tích cây phát sinh loài của 6 dòng vi khuẩn cố định đạm sinh học phân lập từ đất vùng rẫy bắp được tuyển chọn cho thấy tổng cộng có 3 nhóm vi khuẩn được phân chia gồm: nhóm (1) có 2 dòng vi khuẩn DND5 và COD4 có quan hệ gần với vi khuẩn *Pseudomonas*, nhóm (2) có 1 dòng vi khuẩn là TCD4 có quan hệ gần với vi khuẩn *Klebsiella* và nhóm (3) có 3 dòng vi khuẩn là VMD1, TCD3, AAD2 có quan hệ di truyền gần với vi khuẩn *Bacillus*.



**Hình 5. Cây phát sinh loài dạng Maximum Likelihood xây dựng dựa trên 16S rRNA của 6 dòng vi khuẩn cố định đạm sinh học phân lập từ đất vùng rễ bắp so với các chủng tương đồng có trong GenBank**

\*Ghi chú: Thang 0,050 chỉ khoảng thay đổi trong 100 nucleotide của trình tự gene 16S rRNA

Có tổng cộng 792 vị trí trong dữ liệu được so sánh và kết quả phân tích tiến hóa được thực hiện trong MEGA X (Kumar et al., 2018). Kết quả xác

định được tên loài 6 dòng phân lập được tuyển chọn được trình bày ở Bảng 7.

**Bảng 7. Kết quả định danh 6 dòng vi khuẩn dựa trên cây phát sinh loài 16S rRNA**

| STT | Ký hiệu | Loài xác định                         |
|-----|---------|---------------------------------------|
| 1   | AAD2    | <i>Bacillus megaterium</i> AAD2       |
| 2   | DND5    | <i>Pseudomonas</i> sp. DND5           |
| 3   | COD4    | <i>Pseudomonas nitroreducens</i> COD4 |
| 4   | VMD1    | <i>Bacillus circulans</i> VMD1        |
| 5   | TCD3    | <i>Bacillus megaterium</i> TCD3       |
| 6   | TCD4    | <i>Klebsiella pneumoniae</i> TCD4     |

Kết quả định danh 6 dòng vi khuẩn cố định đạm phân lập từ đất vùng rễ bắp được tuyển chọn gồm AAD2, DND5, COD4, VMD1, TCD3 và TCD4 cho thấy chúng thuộc 3 chi *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*. Các dòng vi khuẩn này từ đất ruộng bắp ở vị trí địa lý cách xa nhau. Điều đó chứng tỏ có sự đa dạng rất cao của các vi khuẩn cố định đạm sinh học được phân lập từ đất vùng rễ bắp. Kết quả nghiên cứu của Bumunang and Babalota (2014) cho thấy các dòng vi khuẩn phân lập từ đất vùng rễ bắp chuyển gene và bắp không chuyển gene được trồng ở trên cánh đồng ở Nam Phi gồm *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Sphingomonas*,

*Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter* và *Ewingella* và chúng đều có khả năng tổng hợp amoni và sản xuất IAA. Tương tự, Chelius and Triplett (2000) cho thấy hai dòng vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae* 2028 và *Klebsiella pneumoniae* 342 sống nội sinh ở rễ bắp hoặc đất vùng rễ bắp đều tổng hợp  $NH_4^+$  cung cấp cho cây bắp. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy các dòng vi khuẩn cố định đạm sinh học được phân lập từ đất vùng rễ cây bắp tại các tỉnh ĐBSCL tương tự như kết quả nghiên cứu về vi khuẩn cố định đạm từ đất vùng rễ cây trồng trên thế giới.

#### 4. KẾT LUẬN

Mẫu đất được thu thập ruộng bắp tại 5 tỉnh ĐBSCL như An Giang, Đồng Tháp, Cần Thơ, Vĩnh Long, Trà Vinh để phân lập và làm thuần các dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm. Kết quả đã phân lập được 120 dòng vi khuẩn từ đất vùng rễ bắp. Trong đó, 50 trong tổng số 120 dòng vi khuẩn phát triển tốt trên môi trường không đạm và thử nghiệm khả năng tổng hợp  $\text{NH}_4^+$ . Từ các dòng vi khuẩn trên đã chọn được 6 dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm tốt trong môi trường nuôi cây lông không đạm là AAD2, DND5, COD4, VMD1, TCD3 và TCD4. Dòng vi khuẩn AAD2 được thu thập tại An Giang có khả năng tổng hợp  $\text{NH}_4^+$  trung bình sau 6 ngày nuôi cây 4,02 mg/L, dòng vi khuẩn DND5 được thu thập tại Đồng Tháp có khả năng tổng hợp  $\text{NH}_4^+$  trung bình sau 6 ngày nuôi cây 4,02 mg/L, dòng vi khuẩn COD4 được thu thập tại Cần Thơ có khả năng tổng hợp  $\text{NH}_4^+$  trung bình sau 6 ngày nuôi cây 4,13 mg/L,

dòng vi khuẩn VMD1 được thu thập tại Vĩnh Long có khả năng tổng hợp  $\text{NH}_4^+$  trung bình sau 6 ngày nuôi cây 4,05 mg/L, 2 dòng vi khuẩn TCD3 và TCD4 được thu thập tại Trà Vinh có khả năng tổng hợp  $\text{NH}_4^+$  trung bình sau 6 ngày nuôi cây lần lượt 4,28 mg/L và 4,06 mg/L. Kết quả giải mã trình tự đoạn gene 16S rRNA với cơ sở dữ liệu trên ngân hàng gene thế giới bằng chương trình BLAST cho thấy cả 6 dòng vi khuẩn thuộc 3 chi *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* và được định danh *Bacillus megaterium* AAD2, *Pseudomonas* sp. DND5, *Pseudomonas nitroreducens* COD4, *Bacillus circulans* VMD1, *Bacillus megaterium* TCD3, *Klebsiella pneumoniae* TCD4. Các kết quả thu được làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo để đánh giá hiệu quả của một số dòng có khả năng cố định đạm cao đã được định danh lên sự sinh trưởng phát triển của cây bắp ở điều kiện phòng thí nghiệm, điều kiện nhà lưới và ngoài đồng.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. *Journal of Bacteriology*, 62(3), 293-300.
- Bumunang, E. W., & Babalota, O. O. (2014). Characterization of rhizobacteria from field grown genetically modified (GM) and non-GM maize. *Brasilian Archives of Biology and Technology*, 57(1), 1-8.
- Cavalcante, V. A., & Döbereiner, J. (1988). A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, 108, 23-31.
- Chelius, M. K., & Triplett, E. W. (2000). Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. *Appl Environ Microbiol*, 66(2), 783-787.
- John, W., Peters, K., Fisher., & Dean, D. R. (1995). Nitrogenase structure and function: A biochemical-genetic perspective. *Annu Rev. Microbiol*, 49, 335-366.
- Kirchhof, G., Reis, V. M., Baldani, J. I., Eckert, B., Döbereiner, J., & Hartmann, A. (1997). Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. *Plant and Soil*, 194, 45-55.
- Kuan, K. B., Othman, R., Rahim, K. A., & Shamsuddin, Z. H. (2016). Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. *PLoS ONE*, 11(3), 1-19.
- Kumar S., Stecher, G., Knyaz., Li, M., & Tamura, K. (2018). Mega X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549.
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: stackebrandt, E. and M. Goodfellow (editors). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons. Chichester. United Kingdom. 115-175.
- Tình, N. H. (2003). *Cây ngô*. Nhà xuất bản Nghệ An.
- Hiệp, N. H., & Khanh, N. T. M. (2010). Phân lập và nhận diện một số chủng vi khuẩn cố định nitơ trên cây bắp. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 16a, 151-156.
- Trúc, N. T. N. (2011). *Phân lập, tuyển chọn các dòng vi khuẩn cố định đạm, phân giải lân, tổng hợp IAA để làm phân bón cho rau ở Tiền Giang* (Luận án tiến sĩ). Đại học Cần Thơ.
- Pha, N. T., Giỏi T. Đ., & Hiệp, N. H. (2015). Phân lập, tuyển chọn và định danh các dòng vi khuẩn cố định đạm vùng rễ lúa các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 38(2), 38-47.
- Oanh, N. T. P., Minh, T. B., & Pha, N. T. (2013). Phân lập và tuyển chọn một số dòng vi khuẩn đất vùng rễ lúa có khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 26, 82-88.
- Cự, N. X., Dung, B. T. N., Hiệp, L. T. K., & Tranh, C. V. (2001). *Phương pháp phân tích đất nước cây trồng*. Nhà xuất bản Giáo Dục.
- Page, L., Miller, R. H., & Keeney, R. D. (1982). Methods for soils analysis, part 2: chemical and microbial properties, 2 nd edition. *American Society of Agronomy Incorporation*, 9(2), 625-776.

- Park, M., Kim, C., Yang, J., Lee, H., Shin, W., Kim, S., & Sa, T. (2005). Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research*, 160, 127-133.
- Puneet, K., Sohal, R. P., Gupta, R. P., & Pandher, M. S. (1998). Effect of inoculation of *Azotobacter* and PSM on fertilizer economy, plant growth and yield of winter maize. Nitrogen fixation with non-legumes, *Kluwer Academic Publisher*, 79, 271-273.
- Santos, P.E., Cristales, R.B., & Mellado, J. C. (2001). *Burkholderia* sp, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2790-2798.
- Shabave, P., Smolin, Y., & Strekozova, I. (1991). The effects of *Azotobacter brasilense* sp7 and *Azotobacter chroococcum* on nitrogen balance in soil under cropping with oats. *Biology and Fertility of Soils*, 10, 290-292.
- Thavasi, R., Jayalaxmi, S., Balasubramanian, T., & Banat, I. M. (2006). Biodegradation of crude oil by nitrogen fixing marine bacteria *Azotobacter chroococcum*. *Research Journal of Microbial*, 5, 401-440.
- Van, B.P., & Sloger, C. (1981). Ontogenetic variation of nitrogenase, nitrate reductase and glutamin synthetase activities in *Oryza sativa* rice. *Plant Physiol*, 68, 722-726.
- Van, T. P. N., & Diep, C. N. (2016). Isolation and characterization of rhizospheric bacteria in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivated on ferralsols of Cujut district, Daknong province, Vietnam. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(4), 302-317.