

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN CỐ ĐỊNH NITROGEN TỪ ĐẤT TRỒNG RAU Ở TỈNH PHÚ YÊN

Phạm Thị Ngọc Lan, Tạ Diệu Đoan, Ngô Thị Bảo Châu*

Khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

*Email: baochau1601@gmail.com

Ngày nhận bài: 23/4/2018; ngày hoàn thành phản biện: 11/6/2018; ngày duyệt đăng: 4/7/2018

TÓM TẮT

Để có cơ sở khoa học cho việc ứng dụng các chế phẩm vi sinh vào nông nghiệp nâng cao năng suất và chất lượng rau theo hướng an toàn, chúng tôi tiến hành nghiên cứu về nhóm vi khuẩn cố định nitrogen rong đất trồng rau ở tỉnh Phú Yên. Kết quả cho thấy: số lượng vi khuẩn cố định nitrogen trong các mẫu đất trồng rau đạt từ $6,03 \times 10^4$ - $17,71 \times 10^4$ CFU/g đất khô. Phân lập được 66 chủng vi khuẩn cố định N, từ đó tuyển chọn được hai chủng V17 và V27 có khả năng cố định nitrogen mạnh. Kết quả giải trình tự gen: chủng V17 là *Microbacterium testaceum* và chủng V27 là *Bacillus arbutinivorans*.

Từ khóa: phân lập, tuyển chọn, vi khuẩn cố định nitrogen.

1. MỞ ĐẦU

Hiện nay, rau không sạch và không an toàn là vấn đề cấp thiết dư lượng phân hóa học, thuốc trừ sâu, chất kích thích trong rau ngày càng tăng. Vì vậy, việc thực hiện sản xuất rau sạch và an toàn sẽ giúp người sản xuất nâng cao chất lượng sản phẩm. Để có được sản phẩm là rau sạch và an toàn thì một nền nông nghiệp hữu cơ là thực sự cần thiết. Chính vì vậy, việc sử dụng hệ vi sinh vật có lợi như một tác nhân để phát triển thảm thực vật, cải tạo và phục hồi hệ sinh thái đất là một giải pháp hợp lý trong xu thế phát triển của nền nông nghiệp hữu cơ bền vững. Phân bón hữu cơ vi sinh là sản phẩm chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật sống được tuyển chọn với mật độ đạt tiêu chuẩn quy định, kết hợp với các nguồn nguyên liệu hữu cơ khác nhau, nhằm tăng khả năng hấp thu và cung cấp chất dinh dưỡng cho cây trồng, góp phần cải tạo đất. Trong khuôn khổ bài báo này chúng tôi đề cập đến các nghiên cứu phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn cố định nitrogen với mong muốn tìm ra được các chủng có hoạt lực cố định N mạnh phù hợp với vùng sinh thái hẹp của địa phương để tạo chế phẩm sinh học và đưa trở lại đất trồng rau.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các chủng vi khuẩn có khả năng cố định N được phân lập từ mẫu đất vùng rễ của các loại rau Cải, Tần ô, Xà lách, Tía tô, Ngò,...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Địa điểm thu mẫu: đất trồng rau ở làng rau Ngọc Phước, thành phố Tuy Hòa, tỉnh Phú Yên.

- Phương pháp phân lập và đếm số lượng tế bào: sử dụng phương pháp Koch để phân lập vi khuẩn cố định N trên môi trường Ashby. Đếm số lượng tế bào vi khuẩn bằng phương pháp đếm gián tiếp thông qua số lượng khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch đĩa [2].

- Sàng lọc vi khuẩn có khả năng cố định N: tiến hành nuôi cấy trực tiếp vi khuẩn trên môi trường Ashby thạch đĩa ở nhiệt độ 30°C trong khoảng thời gian 4-7 ngày, sau đó xác định sinh trưởng phát triển của khuẩn lạc trên thạch đĩa.

- Phương pháp tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng cố định N: nuôi cấy chủng vi khuẩn trong 50 mL môi trường dịch thể Ashby ở điều kiện lắc 120 vòng/phút, nhiệt độ 30°C sau 4 ngày. Thu dịch nuôi cấy, xác định hàm lượng N-NH_4^+ tạo thành bằng phương pháp so màu với thuốc thử Nessler [1]. Phần cặn được sấy khô để xác định sinh khối vi khuẩn.

- Xác định một số đặc điểm hình thái, sinh hóa và phân loại chủng vi khuẩn: quan sát khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường Ashby thạch đĩa. Quan sát hình thái tế bào bằng phương pháp nhuộm Gram [2]. Phân loại chủng vi khuẩn bằng giải trình tự 16S rRNA và tra cứu trên Gen Bank để định danh loài vi khuẩn [6,7].

- Xử lý số liệu: thí nghiệm được lặp lại ba lần, số liệu được tính giá trị trung bình và phân tích ANOVA (Duncan's test $p < 0,05$) bằng chương trình SPSS 20.0.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

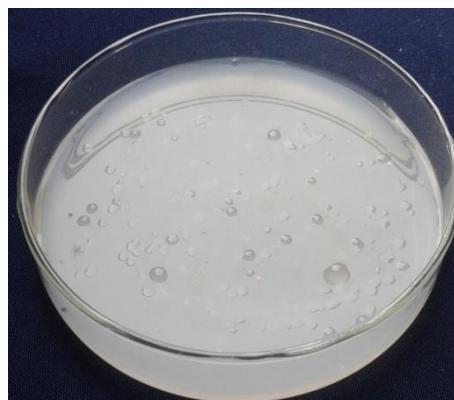
3.1. Phân lập và xác định số lượng vi khuẩn cố định nitrogen

Tiến hành phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng cố định N trên môi trường Ashby thạch đĩa từ 30 mẫu đất trồng rau. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Số lượng vi khuẩn cố định nitrogen trong các mẫu đất trồng rau tỉnh Phú Yên

STT	Đất trồng	pH _{KCl}	CFU/g ($\times 10^4$)	STT	Đất trồng	pH _{KCl}	CFU/g ($\times 10^4$)
1	Ngò – N	4,74	8,81	16	Hành lá – HL	5,63	10,07
2	Ngò – N	4,96	8,34	17	Hành lá – HL	3,76	9,18
3	Ngò – N	4,25	7,92	18	Hành lá – HL	3,98	9,77
4	Ngò – N	4,87	8,22	19	Húng quế – HQ	4,37	7,58
5	Cải ngọt – CN	5,67	7,33	20	Húng quế – HQ	5,29	6,05
6	Cải ngọt – CN	5,88	8,83	21	Húng quế – HQ	4,95	6,59
7	Cải ngọt – CN	5,01	8,66	22	Tía tô – TT	5,91	9,51
8	Cải cay – CC	5,15	14,69	23	Tía tô – TT	4,11	8,93
9	Cải cay – CC	5,70	12,91	24	Tía tô – TT	4,86	7,48
10	Cải cay – CC	5,5	13,43	25	Diếp cá – DC	4,11	6,03
11	Ế trắng – ET	6,12	15,44	26	Diếp cá – DC	4,73	8,15
12	Ế trắng – ET	5,82	17,72	27	Rau muống – RM	4,76	8,65
13	Ế trắng – ET	4,97	15,95	28	Rau muống – RM	5,66	7,79
14	Xà lách – XL	6,03	6,94	29	Mồng tơi – MT	4,92	8,49
15	Xà lách – XL	4,72	8,01	30	Mồng tơi – MT	4,56	8,72

Theo Phạm Thị Ngọc Lan và cộng sự (2017) khi nghiên cứu trên nền đất chuyên canh rau màu số lượng vi khuẩn cố định N cao nhất đạt $22,95 \times 10^6$ CFU/g và thấp nhất là $0,13 \times 10^6$ CFU/g, cao hơn nhiều so với kết quả nghiên cứu của chúng tôi [3]. Nguyên nhân số lượng vi khuẩn cố định N trên đất trồng rau ở làng rau Ngọc Phước, tỉnh Phú Yên giảm có thể là do sử dụng thuốc bảo vệ thực vật quá nhiều, sử dụng nhiều phân bón hóa học,... làm cho hệ vi sinh vật có ích trong đất giảm đáng kể.

**Hình 1.** Vi khuẩn cố định N phân lập trên môi trường Ashby thạch đĩa

Từ các mẫu đất chúng tôi đã phân lập được 66 chủng vi khuẩn hiếu khí có khả năng cố định N, được ký hiệu là V1, V2, V3,..., V66. Khi quan sát các khuẩn lạc vi khuẩn mọc trên môi trường phân lập, chúng tôi nhận thấy có các đặc điểm chung: đa số khuẩn lạc có màu trắng, từ trắng trong tới trắng đục, dạng tròn, mép đều hoặc không đều, bề mặt lồi, nhầy nhót, đường kính khoảng 6 - 9 mm là chủ yếu. Một số khuẩn lạc có đường kính ≥ 13 mm. Chỉ một số ít khuẩn lạc có màu vàng lục, vàng nhạt, hồng, bề mặt hơi dẹt, trơn bóng. Các khuẩn lạc đều không tiết sắc tố ra môi trường.

3.2. Đánh giá năng lực sinh trưởng và phát triển của các chủng vi khuẩn cố định N

Khả năng sinh trưởng và phát triển của các chủng vi khuẩn phân lập được thể hiện trên môi trường Ashby thạch đĩa không bổ sung nguồn nitrogen. Các chủng vi khuẩn muốn sinh trưởng và phát triển được thì bắt buộc phải cố định N từ không khí, đường kính và bề dày khuẩn lạc phản ánh sơ bộ khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn. Kết quả sàng lọc được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Khả năng sinh trưởng và phát triển của các chủng vi khuẩn phân lập

Sinh trưởng và phát triển	Kích thước khuẩn lạc (mm)	Số chủng	Tỷ lệ (%)
Yếu	≤ 5	12	19,41
Trung bình	6 – 9	29	43,28
Mạnh	9 – 12	20	29,85
Rất mạnh	≥ 13	5	7,46

Dựa vào kích thước khuẩn lạc chúng tôi nhận thấy khả năng sinh trưởng phát triển của các chủng vi khuẩn trên môi trường là không đều. Số chủng vi khuẩn có khả năng sinh trưởng phát triển trung bình và mạnh chiếm tỷ lệ cao (trung bình: 43,28%; mạnh: 29,85%), còn các chủng rất mạnh chiếm tỷ lệ khá thấp (7,46%).

Theo Đỗ Kim Nhung và Vũ Thành Công (2011), trong số 16 chủng vi khuẩn cố định N phân lập từ đất trồng mía chỉ có 2 chủng vi khuẩn có khả năng cố định N mạnh [4]. Nghiên cứu của Phạm Thị Ngọc Lan và cộng sự (2017), từ đất chuyên canh rau ở tỉnh Thừa Thiên Huế đã phân lập được 199 chủng vi khuẩn với 2 chủng *Stenotrophomonas maltophilia*N49 và *Paenibacillus mucilaginosus*N161 có khả năng cố định nitrogen mạnh [3].

3.3. Tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen mạnh

Để tuyển chọn chủng vi khuẩn cố định nitrogen mạnh, chúng tôi lựa chọn 5 chủng có đường kính lớn nuôi cấy lắc trong môi trường Ashby dịch thể. Sau 4 ngày, xác định sinh khối khô và hàm lượng N-NH₄⁺ trong môi trường nuôi cấy bằng phương pháp so màu với thuốc thử Nessler ở bước sóng 425 nm. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Khả năng sinh trưởng phát triển và cố định nitrogen của các chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn	Sinh khối khô (mg/mL)	Hàm lượng N-NH ₄ (mg/L)
V14	2,53 ^c	124,84 ^c
V17	3,98 ^a	233,62 ^a
V20	2,33 ^c	124,41 ^c
V22	2,28 ^c	127,83 ^c
V27	3,22 ^b	201,23 ^b

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test)

Qua kết quả phân tích cho thấy, trong số 5 chủng vi khuẩn nghiên cứu có hai chủng với khả năng sinh trưởng phát triển và cố định N mạnh ở môi trường Ashby dịch thể là V17 và V27. Hàm lượng N-NH_4^+ lần lượt là 233,62 mg/L và 201,23 mg/L. Tuy nhiên, sinh khối của 2 chủng V17 và V27 thấp hơn các nghiên cứu khác về vi khuẩn cố định nitrogen. Theo Phạm Thị Ngọc Lan và cộng sự (2017), 2 chủng *Stenotrophomonas maltophilia*N49 và *Paenibacillus mucilaginosus*N161 với khả năng cố định mạnh đồng thời đạt sinh khối khô cao lần lượt là 29,42 mg/mL và 37,45 mg/mL sau khi tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy [3].

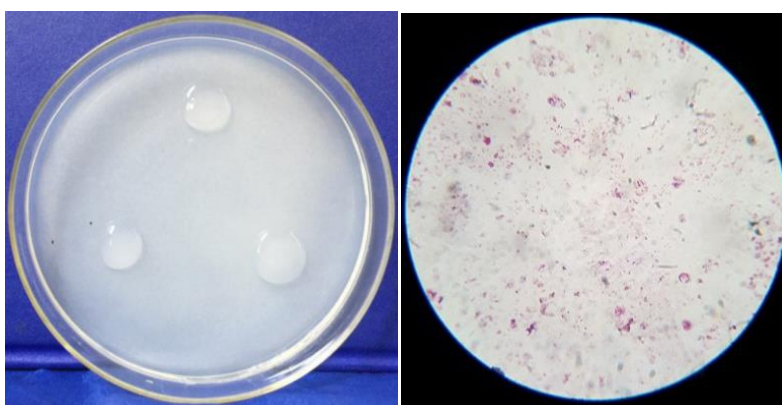
Theo Đỗ Kim Nhung và Vũ Thành Công (2011), trong số 16 chủng vi khuẩn cố định N phân lập từ đất trồng mía, chủng A1 có khả năng cố định N với hàm lượng N-NH_4^+ là 8,09 mg/L sau 4 ngày nuôi cấy [4]. Còn kết quả nghiên cứu của Đỗ Hoàng Quân (2011) thì vi khuẩn *Azotobacter* từ các mẫu đất lấy ở các địa điểm khác nhau (Hà Nội, Lâm Đồng, Đồng Nai, Long An, Tiền Giang, Bến Tre), hàm lượng N-NH_4^+ cố định được của chủng Az 07 trong điều kiện nuôi cấy tối ưu lên tới 164,27 mg/L [5].

3.4. Phân loại

Hai chủng vi khuẩn V17 và V27 được phân loại bằng giải trình tự gen 16S rRNA và tra cứu trên Gen Bank để định danh loài.

3.4.1. Chủng V17

Chủng VK V17 được nuôi cấy trên môi trường Ashby thạch đĩa, hình thái khuẩn lạc có đặc điểm như sau: khuẩn lạc màu trắng trong đậm, dày, mép đều, không tiết sắc tố ra môi trường. Đường kính khuẩn lạc đạt 16 mm sau 4 ngày nuôi cấy. Trong điều kiện nuôi cấy lỏng môi trường Ashby dịch thể, chủng V17 phát triển làm dịch nuôi cấy từ dạng lỏng chuyển sang dạng quánh. Quan sát tiêu bản nhuộm Gram chủng V17: Gram âm, tế bào có hình que ngắn (hình 2).

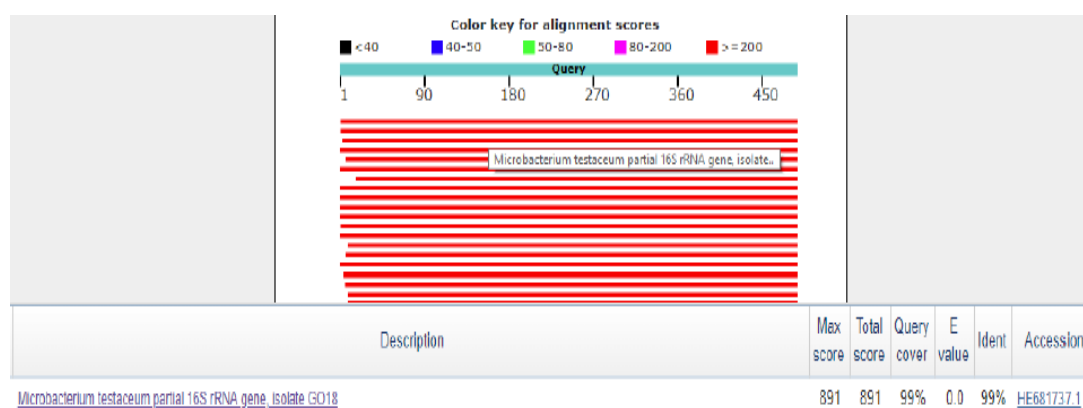


Hình 2. Chủng V17 trên môi trường thạch đĩa và ảnh chụp tiêu bản (x100)

Chủng V17 được giải trình tự gen 16S rRNA và so sánh với dữ liệu Genbank trên trang web NCBI bằng công cụ BLAST SEARCH. Trình tự này tương đồng 99% với

trình tự của loài VK *Microbacterium testaceum* đã được đăng ký trong Genbank và với giá trị E - value bằng 0,0 (hình 3).

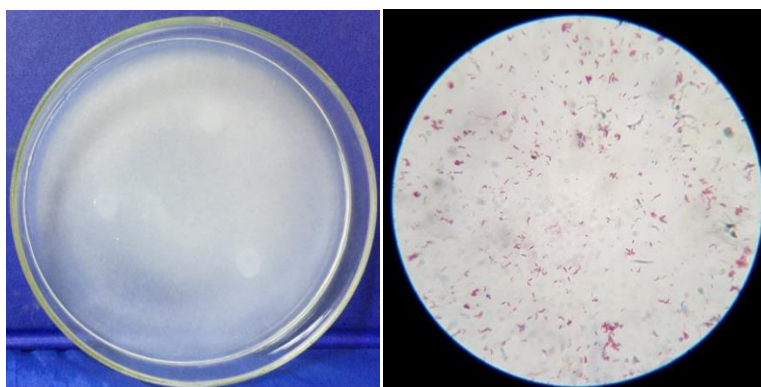
```
CTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGAA
GCCAAGCTTGCTTGGTGGATCAATGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTG
CCCTGGACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGTGTCTAATACTGGATATGAGGCGTG
ATCGCATGGTCATGTTTGGAAAGATTTTTCGGTCTGGGATGGGCTCGCGGCCTATC
ACCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGA
GGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGG
GATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTAGCAGGGAAGAAGCGTGAGTGACGG
TACCTGCAGAAAAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
```



Hình 3. Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA của chủng V17 và tra cứu trên Blast search

3.4.2. Chủng V27

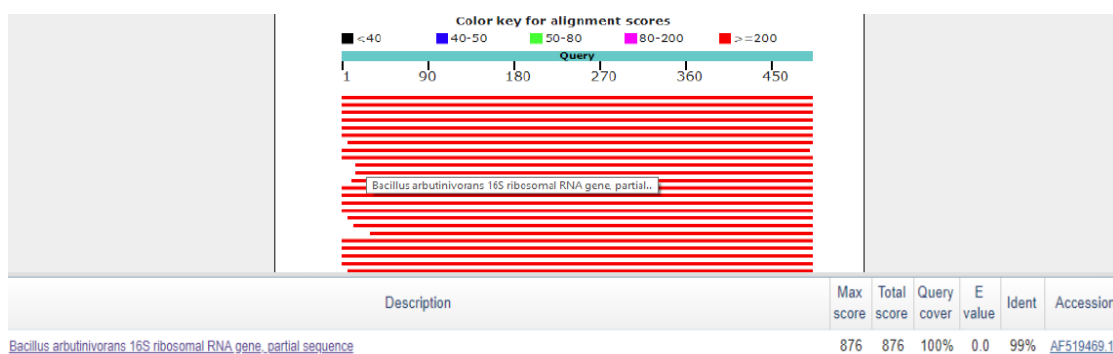
Chủng V27 được nuôi cấy trên môi trường Ashby thạch đĩa, hình thái khuẩn lạc có đặc điểm như sau: khuẩn lạc màu trắng trong, tròn, mép đều, dày, không tiết sắc tố ra môi trường. Đường kính khuẩn lạc đạt 14 mm sau 4 ngày nuôi cấy. Trong điều kiện nuôi cấy lắc môi trường Ashby dịch thể, chủng V27 phát triển làm dịch nuôi cấy từ dạng lỏng chuyển sang dạng quánh. Quan sát tiêu bản nhuộm chủng V27: Gram âm, tế bào có hình que ngắn (hình 4).



Hình 4. Chủng V27 trên môi trường thạch đĩa và ảnh chụp tiêu bản (x100)

Tương tự, chủng V27 được giải trình tự gen 16S rRNA và so sánh với dữ liệu Genebank trên trang web NCBI bằng công cụ BLAST SEARCH. Trình tự này tương đồng 99% với trình tự của loài VK *Bacillus arbutinivorans* đã được đăng ký trong Genebank và với giá trị E - value bằng 0,0 (hình 5).

```
GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACCACCTT
CGGTGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTG
GGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATCCTTTTCCTCACATGAGGAA
AAGCTGAAAGTCGGTTTCGGCTGACACTTACAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTA
GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTG
ATCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG
GGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGCGATGAAG
GCCTTCGGGTCTGTAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGGAGTAACTGCC
GGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG
```



Hình 5. Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA của chủng V27 và tra cứu trên Blast search

4. KẾT LUẬN

- Số lượng vi khuẩn cố định N trong các mẫu đất dao động trong khoảng $6,02 \times 10^4$ – $17,72 \times 10^4$ CFU/g đất khô. Từ 30 mẫu đất ở vùng đất trồng rau tại làng rau Ngọc Phước, tỉnh Phú Yên, đã phân lập được 66 chủng vi khuẩn có khả năng cố định N.
- Tuyển chọn được 02 chủng vi khuẩn cố định N mạnh là V17, V27:
 - Chủng V17: đường kính khuẩn lạc 16 mm, sinh khối khô 3,98 mg/mL, hàm lượng $N-NH_4^+$ tích lũy là 233,62 mg/L.
 - Chủng V27: đường kính khuẩn lạc 14 mm, sinh khối khô 3,22 mg/mL, hàm lượng $N-NH_4^+$ tích lũy là 201,23 mg/L.
- Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA: Chủng V17 là *Microbacterium testaceum* và chủng V27 là *Bacillus arbutinivorans*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Đoàn Văn Cung và cộng sự (1998). *Sổ tay phân tích đất, nước, phân bón cây trồng*. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
- [2]. Phạm Thị Ngọc Lan (2012). *Thực tập Vi sinh vật học*. NXB Đại học Huế.
- [3]. Phạm Thị Ngọc Lan và cộng sự (2017). “Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cố định nitrogen từ đất chuyên canh rau tại phường Hương Hồ, thị xã Hương Trà, tỉnh Thừa Thiên Huế”. Tuyển tập Khoa học Hội nghị Khoa học toàn quốc về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, lần thứ 7, Hà Nội, tr. 1296 – 1303.
- [4]. Đỗ Kim Nhung, Vũ Thành Công (2011). “Khảo sát khả năng sinh tổng hợp IAA và cố định đạm của vi khuẩn *Gluconacetobacter* sp. và *Azospirillum* sp. được phân lập từ cây mía”. Tạp chí khoa học, tr. 161-167.
- [5]. Đỗ Hoàng Quân (2011). *Phân lập, tuyển chọn và nghiên cứu các đặc tính tăng trưởng, cố định đạm của vi khuẩn Azotobacter - thử nghiệm trên cây trồng*, Luận văn Thạc sỹ Sinh học, Trường đại học Khoa học tự nhiên. Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh.
- [6]. Sambrook J. and Russell D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rded. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, pp. 35 - 68.
- [7]. Verschuere L. et al (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, 64, pp. 655 - 671.

ISOLATION AND SELECTION OF NITROGEN FIXING BACTERIA IN SOIL OF VEGETABLES FIELDS IN PHU YEN PROVINCE

Pham Thi Ngoc Lan, Ta Dieu Doan, Ngo Thi Bao Chau*

Faculty of Biology, University of Sciences, Hue University

*Email: baochau1601@gmail.com

ABSTRACT

To contribute the scientific foundation for applying the microbial products to safely improve the vegetation productivity and quality in agriculture, we carried out the research on strains of nitrogen fixing bacteria in soil of vegetable fields in Phu Yen province. The results revealed that the number of bacteria in soil samples of vegetable fields ranged from 6.02×10^4 to 17.72×10^4 CFU/g. 66 strains of nitrogen fixing bacteria were isolated, of which two strains V17 and V27 with the strongest nitrogen fixation were chosen. The results of DNA sequencing determined that strain V17 is *Microbacterium testaceum* and strain V 27 is *Bacillus arbutinivorans*.

Keywords: isolation, nitrogen fixingbacteria, selection...



Phạm Thị Ngọc Lan sinh ngày 01/01/1963 tại Hà Tĩnh. Năm 1984, bà tốt nghiệp cử nhân Sinh học tại Trường Đại học Tổng hợp Huế. Năm 1995, bà tốt nghiệp thạc sĩ chuyên ngành Hóa sinh – Sinh lý thực vật tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Năm 2004, bà nhận học vị tiến sĩ chuyên ngành Sinh lý thực vật tại Đại học Huế. Từ năm 1984 đến nay, bà là giảng viên tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: Sinh học.



Ngô Thị Bảo Châu sinh ngày 16/01/1987 tại Huế. Năm 2009, bà tốt nghiệp cử nhân ngành Sinh học tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Năm 2017, bà tốt nghiệp thạc sĩ chuyên ngành Sinh học thực nghiệm tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Từ năm 2012 đến nay, bà là nghiên cứu viên tại Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.



Tạ Diệu Đoan sinh ngày 17/09/1985 tại Phú Yên. Năm 2007, bà tốt nghiệp cử nhân Sinh học môi trường tại trường Đại học Sư phạm Đà Nẵng. Năm 2018 bà tốt nghiệp Thạc sĩ chuyên ngành Sinh học thực nghiệm tại trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Hiện tại, bà giảng dạy tại Trung tâm Hướng nghiệp thường xuyên huyện Tây Hòa, tỉnh Phú Yên.

