

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN CỐ ĐỊNH NITROGEN TỪ ĐẤT TRỒNG RAU Ở THÀNH PHỐ PLEIKU, TỈNH GIA LAI

Phạm Thị Ngọc Lan¹, Lê Thị Thanh Xuân², Ngô Thị Bảo Châu^{1*}

¹ Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

² Trường Trung học phổ thông Pleiku, Gia Lai

* Email: baochau1601@gmail.com

Ngày nhận bài: 24/3/2020; ngày hoàn thành phản biện: 13/4/2020; ngày duyệt đăng: 02/7/2020

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn cố định nitrogen từ đất trồng rau ở thành phố Pleiku, tỉnh Gia Lai. Kết quả cho thấy: số lượng vi khuẩn cố định nitrogen trong các mẫu đất trồng rau đạt từ $3,51 \times 10^4$ đến $17,79 \times 10^4$ CFU/g đất khô. Từ 31 mẫu đất trồng rau đã phân lập được 101 chủng vi khuẩn cố định N, tuyển chọn được 2 chủng vi khuẩn N55 và N96 có khả năng cố định nitrogen mạnh. Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA chủng N55 là *Paenibacillus mucilaginosus* và chủng N96 là *Paenibacillus gorillae*.

Từ khóa: giải trình tự gen, phân lập, vi khuẩn cố định nitrogen, tuyển chọn.

1. MỞ ĐẦU

Tỉnh Gia Lai là tỉnh lớn thứ 3 tại Tây Nguyên, với ưu thế về thổ nhưỡng, thời tiết thuận lợi cho phát triển các loại cây công nghiệp như cao su, cà phê, hồ tiêu, cây lâm sản đa dạng. Bên cạnh đó rau màu đang là những cây trồng cho thu nhập ổn định đối với người nông dân. Tuy nhiên, do tính chất thâm canh, tăng vụ để tăng năng suất phân bón hóa học đã được sử dụng ở mức quá ngưỡng. Ngoài ra việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật với lượng lớn, đa chủng loại cũng góp phần làm xấu đi hóa tính của đất. Do vậy sử dụng chế phẩm sinh học hay các loại phân bón vi sinh sẽ là giải pháp tốt để cải thiện tính chất đất đồng thời đảm bảo an toàn cho người sử dụng sản phẩm rau.

Việc sử dụng hệ vi sinh vật có lợi trong các chế phẩm sinh học đưa vào đất như một tác nhân để thúc đẩy và phát triển của thảm thực vật là một giải pháp hợp lý trong xu thế phát triển của nền nông nghiệp hữu cơ bền vững. Trong hệ vi sinh vật, vi khuẩn cố định nitrogen có vai trò quan trọng nó chuyển hóa nitrogen trong khí quyển thành nguồn nitrogen mà cây có thể hấp thu được. Do đó, việc phân lập và tuyển chọn chủng

vi khuẩn cố định nitrogen từ đất trồng rau ở thành phố Pleiku, tỉnh Gia Lai sẽ cung cấp những số liệu đánh giá ban đầu, làm cơ sở cho các nghiên cứu ứng dụng chế phẩm vi sinh nhằm cải thiện năng suất và chất lượng rau theo hướng an toàn.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen được phân lập từ đất vùng rễ của các loại rau như hành lá, cải, súp lơ, măng tây, đậu bắp, rau muống...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Địa điểm thu mẫu: đất trồng rau tại thành phố Pleiku, tỉnh Gia Lai.
- Thời gian thu mẫu: Tháng 7/2019 đến tháng 9/2019.
- Mẫu được thu tại vùng đất gần rễ cây, gạt bỏ lớp đất bề mặt 2 – 3 cm, thu mẫu đất tại nhiều vị trí theo quy tắc đường chéo [1].
- Mẫu đất được đo pH_{KCl}: Cân 10 g mẫu cho vào bình tam giác 100 mL, thêm 25 mL dung dịch KCl 1 N, khuấy đều, để yên 1 giờ rồi tiến hành đo pH (trước khi đo phải lắc đều) [1].
- Phần đất còn lại được bảo quản lạnh để tiến hành phân lập.
- Phương pháp phân lập và đếm số lượng tế bào: sử dụng phương pháp Koch để phân lập vi khuẩn cố định nitrogen trên môi trường Ashby vô đạm. Đếm số lượng tế bào vi khuẩn bằng phương pháp gián tiếp thông qua số lượng khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch đĩa [2].
- Sàng lọc vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen: 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 mức độ sinh trưởng phát triển của khuẩn lạc [2].
- Phương pháp tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen: cấy chủng vi khuẩn trong 50 mL môi trường dịch thể Ashby ở điều kiện lắc 120 vòng/phút, nhiệt độ 30°C sau thời gian 4 ngày. Thu dịch nuôi cấy, xác định hàm lượng N-NH₄⁺ tạo thành bằng phương pháp so màu với thuốc thử Nessler [1]. Phần cặn được sấy khô để xác định sinh khối vi khuẩn [2].
- 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 [2]. Phân loại chủng vi khuẩn bằng giải trình tự 16S rRNA và tra cứu trên GenBank để định danh loài vi khuẩn [5, 6].

- 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

Từ 31 mẫu đất được lấy từ vùng trồng rau ở vùng ven thành phố Pleiku, tỉnh Gia Lai, chúng tôi đã tiến hành phân lập được 101 chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen. Số lượng vi khuẩn trong các mẫu đất được trình bày ở bảng 3.1.

Bảng 3.1. Số lượng vi khuẩn cố định nitrogen trong các mẫu đất phân lập

Đợt thu mẫu	Đất trồng	pH _{KCl}	CFU/g đất khô ($\times 10^4$)
Đợt 1 (ngày 10/7)	Hành lá	5,5	16,54
	Thì là	7,18	10,95
	Ngò	5,32	17,79
	Bắp xu	7,09	12,76
Đợt 2 (ngày 30/7)	Súp lơ	7,24	3,51
	Măng tây	7,12	4,79
	Rau diếp	7,03	6,95
	Xà lách	7,04	10,66
Đợt 3 (ngày 10/8)	Hành lá	6,56	5,02
	Rau má	6,86	4,85
	Rau cải	6,44	10,09
	Bí xanh	7,07	12,22
Đợt 4 (ngày 30/8)	Đậu bắp	6,76	12,16
	Mồng tơi	7,07	9,23
	Bắp	5,66	10,48
	Rau muống	6,60	11,82
	Cà chua	5,91	13,61
Đợt 5 (ngày 10/9)	Rau muống	6,8	9,55
	Cải củ	7,44	5,77
	Hành lá	5,77	11,12
	Đậu bắp	6,88	9,77
	Xà lách	7,5	4,10
Đợt 6 (ngày 20/9)	Bắp cải	6,84	6,05
	Cải	7,75	7,27
	Thì là	5,97	10,35
	Cà chua	7,02	6,07
	Ngò	6,84	10,26
	Dưa leo	6,86	14,79
Đợt 7 (ngày 30/9)	Cải	6,52	11,28
	Rau lang	6,38	7,17
	Rau muống	6,31	4,82

Từ các mẫu đất chúng tôi đã phân lập được 101 chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen, được ký hiệu là N1, N2, N3,..., N101. Số lượng vi khuẩn cố định nitrogen trong các mẫu đất dao động từ $3,51 \times 10^4$ đến $17,79 \times 10^4$ CFU/g đất khô. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Phạm Thị Ngọc Lan và cộng sự (2018) về số lượng vi khuẩn cố định nitrogen trong đất trồng rau tỉnh Phú Yên, từ $6,02 \times 10^4$ đến $17,73 \times 10^4$ CFU/g đất khô [4].

3.2. Đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn cố định nitrogen

3.2.1. Khả năng sinh trưởng và phát triển của các chủng vi khuẩn

Để đánh giá khả năng sinh trưởng, phát triển cũng như khả năng cố định nitrogen các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường Ashby thạch đĩa vô đạm và sau 4 ngày. Trong điều kiện môi trường nuôi cấy không chứa nitrogen dưới dạng hợp chất có thể hấp thu được, các chủng vi khuẩn muốn tồn tại và phát triển phải đồng hóa được nitrogen phân tử (N_2) để tạo sinh khối. Dựa vào kích thước khuẩn lạc để đánh giá sơ bộ khả năng sinh trưởng phát triển và cố định nitrogen của các chủng vi khuẩn. Kết quả trình bày ở bảng 3.2.

Bảng 3.2. Khả năng sinh trưởng phát triển và cố định nitrogen của các chủng vi khuẩn cố định nitrogen

Khả năng sinh trưởng và phát triển	Kích thước khuẩn lạc (mm)	Số chủng	Tỷ lệ (%)
Rất mạnh	≥ 12	39	38,61
Mạnh	8 – 11	34	33,66
Trung bình	5 – 7	15	14,85
Yếu	≤ 4	13	12,87

Qua bảng 2 cho 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 rất mạnh và mạnh chiếm tỷ lệ cao lần lượt là 38,61% và 33,66%), còn các chủng yếu chiếm tỷ lệ khá thấp(12,87%). Theo nghiên cứu của Phạm Thị Ngọc Lan và cộng sự (2017) đã phân lập được các chủng vi khuẩn cố định nitrogen trên đất trồng rau ở tỉnh Thừa Thiên Huế, với kích thước chủ yếu từ 5 – 11 mm [3]. Cũng theo công bố của Phạm Thị Ngọc Lan và cộng sự (2018), các chủng vi khuẩn cố định nitrogen phân lập từ đất trồng rau ở tỉnh Phú Yên cũng có kích thước chủ yếu từ 6 đến 12 mm [4].

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

Để tuyển chọn chủng vi khuẩn cố định nitrogen mạnh, 8 chủng có đường kính khuẩn lạc lớn được nuôi cấy lắc trong môi trường Ashby dịch thể vô đạm. Sau 4 ngày, xác định sinh khối khô và hàm lượng N - NH_4^+ 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 3.3.

Bảng 3.3. Khả năng sinh trưởng phát triển và cố định nitrogen của các chủng vi khuẩn

STT	Chủng vi khuẩn	Sinh khối khô (mg/mL)	Hàm lượng N - NH ₄ ⁺ (mg/mL)
1	N21	5,16 ^b	10,34 ^f
2	N55	4,47 ^h	21,14 ^b
3	N84	4,85 ^d	7,83 ^h
4	N87	4,61 ^f	14,46 ^c
5	N96	5,83 ^a	59,60 ^a
6	N98	4,52 ^g	11,40 ^e
7	N100	4,73 ^e	8,28 ^g
8	N101	4,92 ^c	12,50 ^d

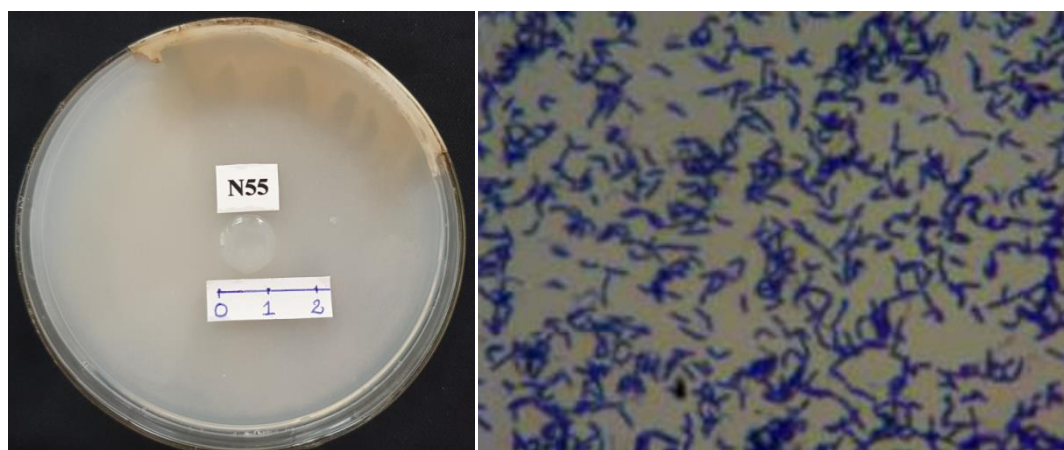
Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test).

Qua kết quả phân tích cho thấy, trong số 8 chủng vi khuẩn nghiên cứu có hai chủng với khả năng sinh trưởng phát triển và cố định nitrogen mạnh ở môi trường Ashby dịch thể là chủng N55 và N96. Hàm lượng N - NH₄⁺ lần lượt là 21,14 mg/mL và 59,60 mg/mL. Tuy nhiên, trong điều kiện chưa được tối ưu hóa sinh khối của 2 chủng N55 và N96 thấp hơn các nghiên cứu khác về vi khuẩn cố định nitrogen. Theo kết quả nghiên cứu của Phạm Thị Ngọc Lan và cộng sự (2017), 2 chủng *Stenotrophomonas maltophilia* N49 và *Paenibacillus mucilaginosus* N161 với khả năng cố định nitrogen 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].

3.3. Đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn

3.3.1. Chủng N55

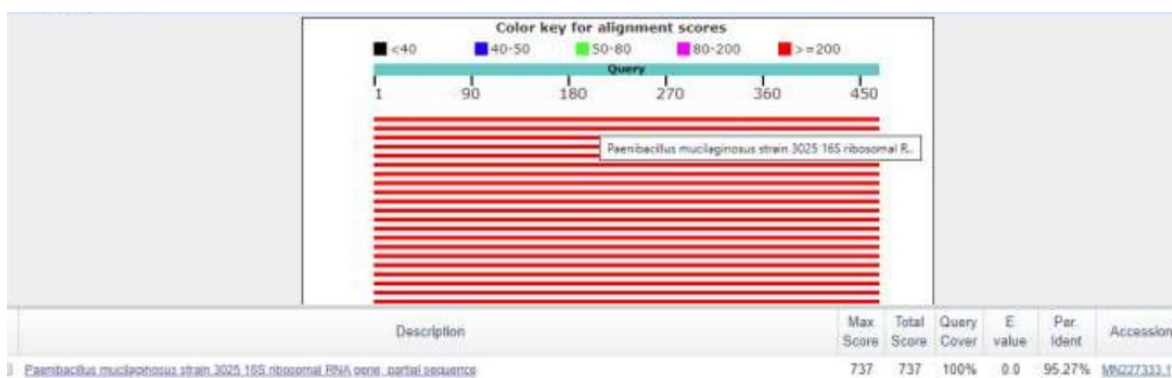
Chủng vi khuẩn N55 được nuôi cấy trên môi trường Ashby thạch đĩa với hình thái khuẩn lạc màu trắng trong đậm, dày, mép đều, không tiết sắc tố ra môi trường. Đường kính khuẩn lạc đạt 18 mm sau 4 ngày nuôi cấy. Với điều kiện nuôi cấy lắc môi trường Ashby dịch thể, chủng N55 phát triển chuyển dịch nuôi cấy từ dạng lỏng sang dạng quánh. Nhuộm tiêu bản chủng N55 tế bào có hình que ngắn (hình 1).



Hình 1. Đặc điểm hình thái và tiêu bản hiển vi ($\times 100$) của chủng vi khuẩn N55

Chủng N55 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 95,27% với trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn *Paenibacillus mucilaginosus* đã được đăng ký trong GenBank và với giá trị E - value bằng 0,0 mã số truy cập là MN227333 (hình 2). Chủng N55 tương đồng với loài *Paenibacillus mucilaginosus*.

```
TCGAGCGGAGCAGTTCCTTGCTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTTGGCAAC
CTGCCGGTCTGATCGGGATACCTACCGGAAACGGTAGCTAAGACCGGATAACTGGA
TTCGGTGCCTGGCGGAATCATGAAACACGGGGCAACCTGTGGCTTACGGATGGGC
CTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGCGGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGACGCGTA
GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAAC
GCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACCTCTGTTGCCAGGGAAGAACG
TCGTGGAGAGTAACTGCTCTGCGAATGACCGTACCTGAAAATAACGCCCCCGCTAA
CAACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
```



Hình 2. Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA của chủng N55 và tra cứu trên Blast search

3.3.2. Chủng N96

Chủng N96 được nuôi cấy trên môi trường Ashby thạch đĩa với hình thái khuẩn lạc màu trắng trong, tròn, mép đều, dày, không tiết sắc tố ra môi trường. Đường kính khuẩn lạc đạt 17 mm sau 4 ngày nuôi cấy. Trong điều kiện nuôi cấy lắc môi

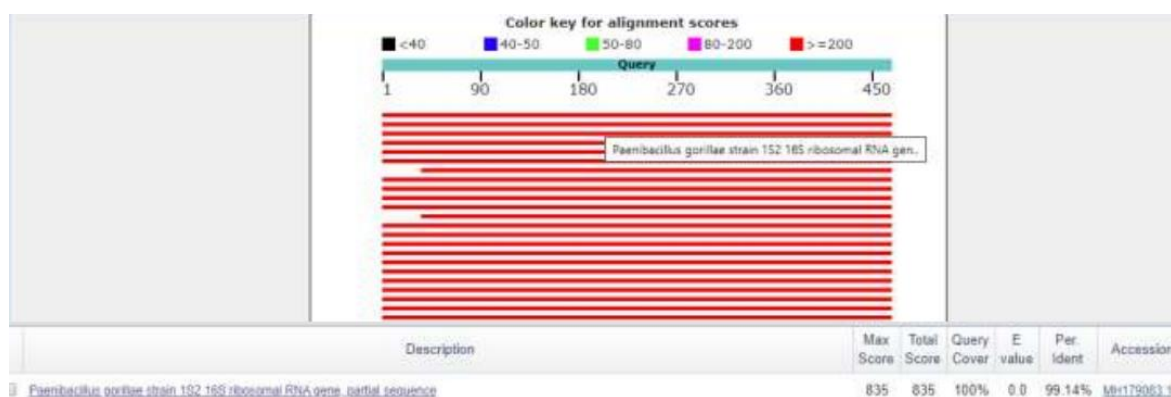
trường Ashby dịch thể, chủng N96 phát triển chuyển dịch nuôi cấy từ dạng lỏng sang dạng quánh. Nhuộm tiêu bản chủng N96 tế bào có hình que ngắn (hình 3).



Hình 3. Đặc điểm hình thái và tiêu bản hiển vi ($\times 100$) của chủng vi khuẩn N96

Tương tự, chủng N96 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 99,14% với trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn *Paenibacillus gorillae* đã được đăng ký trong Genbank và với giá trị E - value bằng 0,0 mã số truy cập là MH179083 (hình 4). Chủng N96 tương đồng với loài *Paenibacillus gorillae*.

TGCAAGTCGAGCGGATCTTATCCTTCGGGGTAAGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTA
ACACGTAGGTAACCTGCCTGTAAGACCGGGATAACATTCGGAAACGAATGCTAATA
CCGGATACGCGAATGGGTGCGATGACCCGTTTCGGGAAAGACGGAGCAATCTGTCTG
CTTACAGATGGACCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG
CGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCC
TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGC
CAGGGAAGAATGCTTGGGAGAGTAAGTCTCCCAAGGTGACGGTACCTGAGAAGAA
AGCCCCGGCTAACTACGTGC



Hình 4. Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA của chủng N96 và tra cứu trên Blast search

4. KẾT LUẬN

- Từ 31 mẫu đất trồng rau tại thành phố Pleiku, tỉnh Gia Lai, đã phân lập được 101 chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen. Số lượng vi khuẩn cố định nitrogen trong các mẫu đất dao động trong khoảng $3,51 \times 10^4$ đến $17,79 \times 10^4$ CFU/g đất khô.

- Tuyển chọn được 02 chủng vi khuẩn cố định nitrogen mạnh là N55, N96:

+ Chủng N55: đường kính khuẩn lạc 16 mm, sinh khối khô 4,47 mg/mL, hàm lượng N - NH_4^+ tích lũy là 21,14 mg/mL.

+ Chủng N96: đường kính khuẩn lạc 14 mm, sinh khối khô 5,38 mg/mL, hàm lượng N - NH_4^+ tích lũy là 59,60 mg/mL.

- Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA: Chủng N55 là *Paenibacillus mucilaginosus* và chủng N96 là *Paenibacillus gorillae*.

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 ở tỉnh Thừa Thiên Huế. *Báo cáo Khoa học về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Hội nghị Khoa học Toàn quốc lần thứ 7*, trang 1296 – 1303.
- [4]. Phạm Thị Ngọc Lan và cộng sự (2018). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cố định nitrogen từ đất trồng rau tỉnh Phú Yên. *Tạp chí Khoa học, trường Đại học Khoa học*, tập 13, số 02, trang 125 – 133.
- [5]. 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.
- [6]. 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 BACTERIAL STRAINS IN SOIL OF VEGETABLES FIELD IN PLEIKU CITY, GIA LAI PROVINCE

Pham Thi Ngoc Lan¹, Le Thi Thanh Xuan², Ngo Thi Bao Chau^{1*}

¹ University of Sciences, Hue University

² Huynh Thuc Khang High school, Gia Lai Province

* Email: baochau1601@gmail.com

ABSTRACT

In this research, nitrogen fixing bacterial strains were isolated and selected from the vegetable fields in Pleiku city, Gia Lai Province. The results revealed that the number of bacteria in soil samples of vegetable field ranged from 3.51×10^4 to 17.79×10^4 CFU/g. From 31 soil samples collected in different locations of intensive vegetable fields, 101 strains of nitrogen fixing bacteria were isolated, of which two strains N55 and N96 with the strongest nitrogen fixation were chosen. The results of 16S rRNA sequencing determined that strain N55 is *Paenibacillus mucilaginosus* and strain N96 is *Paenibacillus gorillae*.

Keywords: isolation, nitrogen fixing bacteria, selection, sequencing determined.



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 tốt nghiệp 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: Vi sinh vật học, Vi sinh môi trường, Ứng dụng vi sinh vật trong sản xuất, Phân bón Vi sinh, Enzyme vi sinh vật.



Lê Thị Thanh Xuân sinh ngày 29/11/1984 tại Gia Lai. Năm 2007, bà tốt nghiệp cử nhân ngành Sinh học – KTNN tại Trường Đại học Quy Nhơn. Hiện nay, bà giảng dạy tại Trường THPT Pleiku, tỉnh Gia Lai. Từ năm 2018, bà là nghiên cứu sinh học thực nghiệm tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: Sinh học, vi sinh học và các lĩnh vực liên quan.



Ngô Thị Bảo Châu sinh ngày 16/01/1987 tại Thừa Thiên 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. Hiện nay, bà làm nghiên cứu viên tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: Hóa sinh, vi sinh.