

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN CỐ ĐỊNH NITROGEN TỪ ĐẤT TRỒNG LÚA Ở THỪA THIÊN HUẾ

Phạm Thị Ngọc Lan, Hoàng Dương Thu Hương*

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

*Email: thuhuongcnk32@gmail.com

Ngày nhận bài: 18/5/2021; ngày hoàn thành phản biện: 31/5/2021; ngày duyệt đăng: 02/11/2021

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập được 47 chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen (N) từ 5 mẫu đất trồng lúa trên địa bàn xã Hương Toàn, thị xã Hương Trà, tỉnh Thừa Thiên Huế. Từ đó chọn được hai chủng N36 và N37 có khả năng cố định N mạnh với sinh khối khô đạt 7,47-8,82 mg/mL và hàm lượng N-NH₄⁺ đạt 562,72-646,27 mg/L. Kết quả khảo sát về điều kiện nuôi cấy cho thấy hai chủng vi khuẩn này có sự tích lũy sinh khối và khả năng cố định N mạnh nhất trong môi trường có pH 6,5 sau thời gian 4-5 ngày.

Từ khóa: chủng vi khuẩn, cố định nitrogen, điều kiện nuôi cấy.

1. MỞ ĐẦU

Trong quá trình sinh trưởng và phát triển của cây trồng, nitrogen là nguồn dinh dưỡng hàng đầu, do đó nguồn nitrogen sử dụng phổ biến nhất là phân đạm hóa học. Tuy nhiên, lượng phân bón hóa học dư thừa sẽ gây ảnh hưởng xấu đến cây trồng, sức khỏe con người và môi trường sinh thái. Do đó vấn đề đặt ra là cần có biện pháp để bổ sung dinh dưỡng cho cây trồng mà không gây tác hại đến môi trường và con người.

Hiện nay, các loại phân bón vi sinh được nghiên cứu và đưa vào sử dụng thay thế phân hóa học trong sản xuất nông nghiệp đã đạt được nhiều hiệu quả. Một trong những vi sinh vật quan trọng sử dụng trong sản xuất phân bón vi sinh đó là các nhóm vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen.

Vì vậy, trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi tiến hành phân lập tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen mạnh làm cơ sở cho các nghiên cứu tạo chế phẩm vi sinh hữu ích góp phần nâng cao chất lượng phân vi sinh sử dụng trong trồng lúa nước cũng như các loài cây trồng trên đất ướt.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu, địa điểm và thời gian thực hiện

Các chủng vi khuẩn có khả năng cố định N phân lập từ mẫu đất ở vùng rễ cây lúa.

Địa điểm thu mẫu: Xã Hương Toàn, thị xã Hương Trà, tỉnh Thừa Thiên Huế.

Thời gian thực hiện: từ tháng 01/2020 đến tháng 05/2020.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập và đếm số lượng tế bào

Từ 5 mẫu đất ướt thu được ở 5 mẫu ruộng lúa trên địa bàn Xã Hương Toàn, thị xã Hương Trà, tỉnh Thừa Thiên Huế, sử dụng phương pháp Koch để phân lập vi khuẩn có khả năng cố định N trên môi trường Ashby thạch đĩa [2].

Xác định số lượng tế bào vi khuẩn trong mẫu bằng phương pháp đếm gián tiếp thông qua số lượng khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch đĩa [2].

2.2.2. Sơ tuyển vi khuẩn hiếu khí có khả năng cố định N

Nuôi cấy trực tiếp vi khuẩn trên môi trường Ashby thạch đĩa ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 3 ngày sau đó xác định sinh trưởng và phát triển của khuẩn lạc trên thạch đĩa [2].

2.2.3. Tuyển chọn vi khuẩn có khả năng cố định N

Tiến hành nuôi cấy lắc (120 vòng/phút) vi khuẩn trong môi trường Ashby dịch thể có pH 7, lượng giống cấy vào mỗi bình thí nghiệm là 5 mL dịch tế bào/50 mL môi trường, nuôi cấy ở 30°C trong 3 ngày. Ly tâm thu dịch nuôi cấy, xác định hàm lượng N-NH₄⁺ được tạo thành bằng phương pháp so màu với thuốc thử Nessler [1]. Phần cặn được sấy khô tuyệt đối để xác định sinh khối vi khuẩn.

2.2.4. Xác định đặc điểm hình thái

Quan sát đại thể trên môi trường thạch đĩa, sử dụng phương pháp làm tiêu bản nhuộm đơn để quan sát hình thái tế bào [2].

2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến sinh trưởng và phát triển của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Tối ưu hóa một số điều kiện nuôi cấy: Thời gian và độ pH thích hợp cho sinh trưởng, phát triển và khả năng cố định N của vi khuẩn bằng phương pháp “một lúc – một biến” (one – variable – at – a – time – method)

2.2.6. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2016 và phân tích ANOVA (Duncan's test $p < 0,05$) bằng chương trình SPSS 20.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và đánh giá khả năng sinh trưởng phát triển của các chủng vi khuẩn cố định N

Từ 5 mẫu đất trồng lúa ở xã Hương Toàn, thị xã Hương Trà, tỉnh Thừa Thiên Huế, chúng tôi đã tiến hành phân lập và thu được 47 chủng vi khuẩn có khả năng cố định N.



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

Để đánh giá khả năng sinh trưởng, phát triển của các chủng vi khuẩn phân lập, chúng tôi tiến hành nuôi cấy chúng trên môi trường Ashby thạch đĩa pH 7. Sau 3 ngày nuôi cấy, dựa vào kích thước và bề dày của khuẩn lạc để đánh giá sơ bộ khả năng sinh trưởng phát triển của các chủng vi khuẩn. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Khả năng sinh trưởng và phát triển của các chủng phân lập

Khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn	Kích thước khuẩn lạc (mm)	Số chủng	Tỷ lệ (%)
Yếu	< 5	13	27,66
Trung Bình	5-7	24	51,06
Mạnh	8-11	8	17,02
Rất mạnh	> 11	2	4,26

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, khả năng sinh trưởng phát triển của các chủng vi khuẩn trên môi trường là không giống nhau. Số chủng vi khuẩn sinh trưởng phát triển yếu và trung bình chiếm tỷ lệ cao (27,66% - 51,06%), còn các chủng mạnh và rất mạnh chiếm tỷ lệ khá thấp (4,26% - 17,02%).

Theo nghiên cứu của Phạm Thị Ngọc Lan và cộng sự (2016), khi phân lập các chủng vi khuẩn cố định N trên đất rừng ngập mặn ở Thừa Thiên Huế đã tuyển chọn được 9 chủng có khả năng cố định N mạnh (chiếm tỷ lệ 4,17%) [3]. Cũng theo công bố của Phạm Thị Ngọc Lan và cộng sự (2020), trong số 101 chủng vi khuẩn có khả năng cố định N phân lập từ đất trồng rau chỉ có 13 chủng có khả năng cố định N mạnh, chiếm tỷ lệ thấp nhất [4].

Như vậy có thể thấy rằng, tỷ lệ vi khuẩn có khả năng cố định N mạnh trong nghiên cứu này cũng chiếm một tỷ lệ tương đương với các nghiên cứu trước đó của các tác giả khác về khả năng cố định N của vi khuẩn trong đất.

3.2. Tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng cố định N mạnh

Trong số các chủng vi khuẩn phân lập được, 8 chủng có khả năng sinh trưởng và phát triển mạnh nhất được chọn để tiến hành nhân nuôi trong môi trường Ashby dịch thể. Sau 3 ngày nuôi cấy, xác định sinh khối khô và hàm lượng N-NH₄⁺ tích lũy trong môi trường bằng phương pháp so màu với thuốc thử Nessler ở bước sóng 425 nm. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Khả năng sinh trưởng phát triển và cố định N của các chủng vi khuẩn

STT	Chủng	Hàm lượng N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	Sinh khối khô (mg/mL)
1	N27	308,14 ^d	6,80 ^{bc}
2	N30	441,30 ^c	5,96 ^{cd}
3	N33	515,72 ^{bc}	6,19 ^{cd}
4	N34	468,72 ^{bc}	6,11 ^{cd}
5	N35	430,86 ^c	5,79 ^{cd}
6	N36	562,72^{ab}	7,47^b
7	N37	646,27^a	8,82^a
8	N38	501,36 ^{bc}	5,69 ^d

Ghi chú: Sự sai khác giữa các chữ cái trên cùng một cột biểu hiện sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Ducans' test)

Kết quả ở bảng 2 cho thấy rằng trong số 8 chủng vi khuẩn nghiên cứu có hai chủng có khả năng sinh trưởng phát triển mạnh ở môi trường Ashby dịch thể là N36 và N37. Trong đó, chủng N37 có sinh khối tích lũy mạnh nhất (8,82 mg/mL) và hàm lượng N-NH₄⁺ là cao nhất (646,27 mg/L). Chủng N36 cũng có khả năng tạo sinh khối khá lớn (7,47 mg/mL) và hàm lượng N-NH₄⁺ khá cao (562,72 mg/L). Do đó, chúng tôi chọn hai chủng N36 và N37 làm đối tượng cho các nghiên cứu tiếp theo.

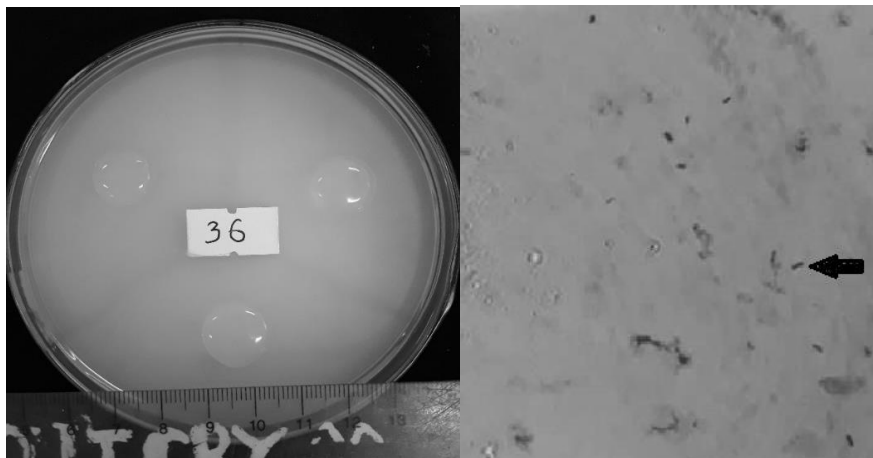
Theo Phạm Thị Ngọc Lan và cộng sự (2016), trong số 137 chủng vi khuẩn cố định N phân lập từ đất rừng ngập mặn ở Thừa Thiên Huế, chủng V94 có khả năng cố định N mạnh nhất với hàm lượng N-NH₄⁺ là 3,566 mg/L sau 4 ngày nuôi cấy [3]. Kết quả này thấp hơn so với nghiên cứu của chúng tôi, điều này có thể là do trong các điều kiện môi trường khác nhau, khả năng sinh trưởng và cố định N của các chủng vi khuẩn sẽ có sự khác biệt.

3.3. Đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn

3.3.1. Chủng N36

- Khuẩn lạc nhầy, trong suốt, tròn, mép tròn đều, dày, không tiết sắc tố ra môi trường. Đường kính khuẩn lạc đạt 13 mm sau 4 ngày nuôi cấy [Hình 2].

- Tiến hành nhuộm đơn chủng N36 và quan sát trên kính hiển vi với độ phóng đại x100, cho thấy tế bào chủng N36 có hình que ngắn, kích thước nhỏ nằm riêng lẻ.

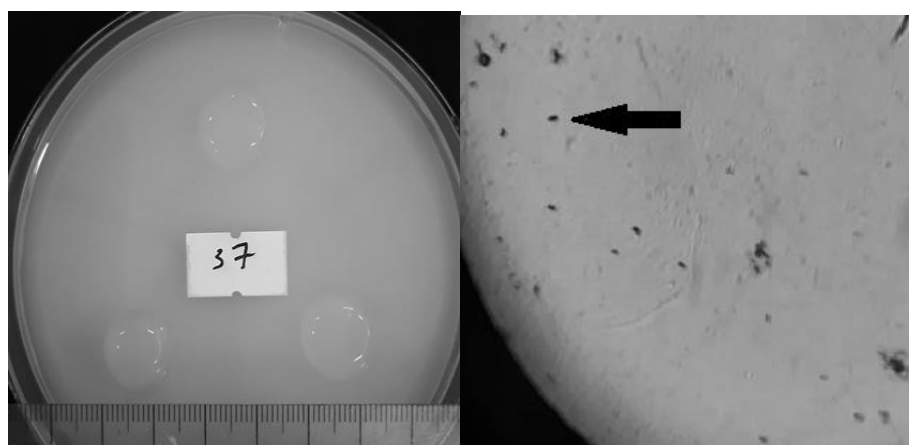


Hình 2. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng N36 (x100).

3.3.2. Chủng N37

- Khuẩn lạc nhầy, trong suốt, tròn, mép không đều, dày, không tiết sắc tố ra môi trường. Đường kính khuẩn lạc đạt 12,5 mm sau 4 ngày nuôi cấy [Hình 3].

- Tiến hành nhuộm đơn chủng N37 và quan sát trên kính hiển vi với độ phóng đại x100, kết quả cho thấy rằng tế bào chủng N37 có hình que ngắn, kích thước nhỏ và nằm riêng lẻ.



Hình 3. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng N37 (x100)

3.4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng, phát triển và cố định N của vi khuẩn

Để thăm dò ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sự sinh trưởng và phát triển của các chủng vi khuẩn, tiến hành nuôi cấy lắc hai chủng N36 và N37 trong môi trường Ashby dịch thể. Sau các mốc thời gian 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ngày xác định hàm lượng N-NH_4^+ và sinh khối khô. Kết quả thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng, phát triển và tích lũy N-NH_4^+ của hai chủng N36 và N37

Thời gian nuôi cấy (ngày)	Chủng N36		Chủng N37	
	Sinh khối khô (mg/mL)	Hàm lượng N-NH_4^+ (mg/L)	Sinh khối khô (mg/mL)	Hàm lượng N-NH_4^+ (mg/L)
1	1,37 ^d	238,73 ^f	1,82 ^f	210,45 ^g
2	7,13 ^{ab}	465,46 ^d	6,80 ^{de}	476,77 ^e
3	7,42 ^{ab}	555,10 ^c	8,07 ^{bc}	541,18 ^d
4	7,82^a	703,49^a	8,81 ^b	659,98 ^b
5	7,34 ^{ab}	640,83 ^b	10,32^a	777,04^a
6	6,48 ^b	586,87 ^c	7,69 ^{cd}	582,95 ^c
7	5,23 ^c	390,61 ^e	5,99 ^e	448,49 ^f

Ghi chú: Sự sai khác giữa các chữ cái trên cùng một cột biểu hiện sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Ducans' test)

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, sau 2 ngày nuôi cấy, sinh khối khô và hàm lượng N-NH₄⁺ bắt đầu tăng mạnh ở cả 2 chủng và đạt cực đại sau 4 ngày nuôi cấy đối với chủng N36 và sau 5 ngày nuôi cấy đối với chủng N37, sau đó cả sinh khối và hàm lượng N-NH₄⁺ đều giảm dần ở các ngày nuôi cấy tiếp theo.

Theo Đỗ Kim Nhung và cộng sự (2011) khi nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng cố định N của 12 chủng vi khuẩn *Azospirillum* spp. cho kết quả thời gian nuôi cấy tối ưu là 4 ngày nuôi cấy [6], kết quả này tương đương với nghiên cứu của chúng tôi.

3.5. Ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng, phát triển và cố định N của vi khuẩn

Độ pH của môi trường được điều chỉnh trong khoảng 5,5 - 8,0; sau thời gian nuôi cấy thích hợp (4 ngày đối với chủng N36 và 5 ngày đối với chủng N37) xác định hàm lượng N-NH₄⁺ và sinh khối khô. Kết quả thể hiện ở bảng 4.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, cả hai chủng vi khuẩn đều có khả năng sinh trưởng và phát triển ở khoảng pH khá rộng trong đó pH 6,5 là thích hợp nhất. Khi pH môi trường tăng lên, sinh khối và khả năng tích lũy N-NH₄⁺ của 2 chủng vi khuẩn đều giảm.

Kết quả nghiên cứu của Đỗ Hoàng Quân (2011) ở hai chủng vi khuẩn có khả năng cố định N Az03 và Az07 thuộc chi *Azotobacter* phân lập từ đất canh tác, xác định được pH thích hợp cho các chủng nghiên cứu là 7,0-7,5 [7].

Theo Trần Hải Minh (2012), pH tối ưu cho sinh trưởng phát triển và cố định N của chủng vi khuẩn *Azotobacter* là 6,8 [5].

Bảng 4. Ảnh hưởng của pH đến sinh trưởng, phát triển và tích lũy N-NH₄⁺ của hai chủng N36 và N37

pH	Chủng N36		Chủng N37	
	Sinh khối khô (mg/mL)	Hàm lượng N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	Sinh khối khô (mg/mL)	Hàm lượng N-NH ₄ ⁺ (mg/L)
5,5	6,31 ^{cd}	583,39 ^d	8,97 ^c	628,21 ^d
6,0	8,57 ^{ab}	726,56 ^b	9,97 ^b	765,29 ^b
6,5	10,20^a	814,03^a	11,60^a	836,65^a
7,0	7,80 ^{bc}	690,44 ^b	11,32 ^a	785,74 ^b
7,5	7,29 ^c	640,83 ^c	9,15 ^c	703,93 ^c

pH	Chủng N36		Chủng N37	
	Sinh khối khô (mg/mL)	Hàm lượng N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	Sinh khối khô (mg/mL)	Hàm lượng N-NH ₄ ⁺ (mg/L)
8,0	5,29 ^d	561,63 ^d	8,02 ^d	560,32 ^e

Ghi chú: Sự sai khác giữa các chữ cái trên cùng một cột biểu hiện sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Ducans' test)

4. KẾT LUẬN

Trong 47 chủng vi khuẩn cố định N phân lập được từ 5 mẫu đất trồng lúa ở Thừa Thiên Huế, đã tuyển chọn được 2 chủng N36 và N37 có khả năng cố định N mạnh nhất với hàm lượng N-NH₄⁺ lần lượt là 562,72 mg/L và 646,27 mg/L.

Điều kiện tối ưu cho sinh trưởng phát triển và cố định N của 2 chủng vi khuẩn:

- Chủng N36: thời gian nuôi cấy là 4 ngày, pH môi trường 6,5.
- Chủng N37: thời gian nuôi cấy là 5 ngày, pH môi trường 6,5.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Đoàn Văn Cung, Phạm Văn Quyến, Trần Thúc Sơn, Nguyễn Văn Sứ, Trần Thị Tâm (1998). *Sổ tay phân tích đất, nước, phân bón cây trồng*, NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
- [2]. Phạm Thị Ngọc Lan (2012). *Giáo trình thực tập vi sinh vật học*, NXB Đại học Huế.
- [3]. Phạm Thị Ngọc Lan, Nguyễn Thị Việt (2016). Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn cố định nitrogen từ đất rừng ngập mặn ở Thừa Thiên Huế, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Trường Đại học Khoa học – Đại học Huế*, Tập 4, Số 1, tr. 63-72.
- [4]. Phạm Thị Ngọc Lan, Lê Thị Thanh Xuân, Ngô Thị Bảo Châu (2020). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cố định nitrogen từ đất trồng rau ở thành phố Pleiku, tỉnh Gia Lai, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Trường Đại học Khoa học – Đại học Huế*, Tập 17, Số 2, tr. 117-126.
- [5]. Trần Hải Minh (2012). “Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn *Azotobacter* có hoạt tính nitrogenase từ đất trồng lúa tại huyện Vạn Ninh, tỉnh Khánh Hòa”, Luận văn Thạc sĩ Khoa học, Đại học Nha Trang.
- [6]. 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, Đại học Cần Thơ*, Số 18a, tr. 161-167.
- [7]. 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 sĩ Sinh học, Trường đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh.

ISOLATION AND SELECTION OF NITROGEN-FIXING BACTERIA FROM SOIL OF RICE FIELDS IN THUA THIEN HUE PROVINCE

Phạm Thị Ngọc Lan, Hoàng Dương Thu Hương*

Faculty of Biology, University of Sciences, Hue University

*Email: thuhuongcnk32@gmail.com

ABSTRACT

In this study, 47 nitrogen-fixing bacteria strains (N) were isolated from five soil samples of rice fields in Huong Toan Commune, Huong Tra District, Thua Thien Hue Province. Two strains of N36 and N37 that show strong nitrogen-fixation capacity (dry biomass at 7,46-8,83 mg/mL and N-NH_4^+ concentration at 562,72-646,27 mg/L) were selected. Our findings in the culture condition optimization indicate that these two nitrogen-fixing bacteria strains have the highest biomass and the strongest nitrogen-fixation ability at pH 6,5, after four to five days of culture.

Keywords: Bacteria strains, culture condition, nitrogen fixation.



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. Hiện 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.



Hoàng Dương Thu Hương sinh ngày 30/04/1990. Bà tốt nghiệp chuyên ngành Công nghệ sinh học năm 2013, tốt nghiệp Thạc sĩ chuyên ngành Công nghệ sinh học năm 2015 tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Hiện nay, bà giảng dạy tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

