

PHÂN LẬP VÀ NHẬN DIỆN CÁC DÒNG VI KHUẨN CHỊU MẶN CÓ KHẢ NĂNG CỐ ĐỊNH ĐẠM VÀ TỔNG HỢP IAA TỪ ĐẤT SẢN XUẤT LÚA - TÔM Ở BẠC LIÊU, SÓC TRĂNG VÀ KIÊN GIANG

Nguyễn Anh Huy^{1*} và Nguyễn Hữu Hiệp²

¹NCS ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

²Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Anh Huy (huysth@gmail.com)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 17/10/2017

Ngày nhận bài sửa: 08/01/2018

Ngày duyệt đăng: 27/02/2018

Title:

Isolation and identification of salt tolerant bacteria capable in nitrogen fixation and IAA synthesis from rice - shrimp soils in Bac Lieu, Soc Trang and Kien Giang provinces

Từ khóa:

Bacillus megaterium, *Burkholderia cenocepacia*, cố định đạm, định danh, indole acetic acid (IAA), phân lập

Keywords:

Bacillus megaterium, *Burkholderia cenocepacia*, identification, indole acetic acid (IAA), isolation, nitrogen fixing

ABSTRACT

Using bio-fertilizers has recently been noticeable due to their effects on promoting productivity, improving the quality of agricultural products as well as their environmental friendliness. In this study, all of 116 strains of salt tolerant bacteria were isolated in Burk medium added 10% of salt. They were capable of synthesizing ammonium (NH_4^+) and indole acetic acid (IAA). Among them, PL2 and PL9 were able to fix nitrogen (3,73 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 2,71 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and synthesize IAA (45,31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 46,46 $\mu\text{g}/\text{mL}$) relatively. Based on the 16S rDNA identification, PL2 and PL9 were recognized to be *Bacillus megaterium* and *Burkholderia cenocepacia*, respectively.

TÓM TẮT

Việc sử dụng phân bón vi sinh đang được quan tâm vì phân bón vi sinh không những giúp nâng cao năng suất, cải thiện chất lượng nông sản mà còn thân thiện với môi trường, đặc biệt là trong điều kiện hạn mặn. Trong nghiên cứu này, 116 dòng vi khuẩn chịu mặn được phân lập trên môi trường Burk có bổ sung muối 10%. Tất cả 116 dòng vi khuẩn đều có khả năng tổng hợp ammonium (NH_4^+) và tổng hợp indole acetic acid (IAA). Trong đó, 2 dòng PL2 và PL9 vừa có khả năng cố định đạm vừa có khả năng tổng hợp IAA cao: PL2 tổng hợp NH_4^+ đạt 3,73 $\mu\text{g}/\text{mL}$, IAA đạt 45,31 $\mu\text{g}/\text{mL}$; dòng PL9 tổng hợp NH_4^+ đạt 2,71 $\mu\text{g}/\text{mL}$, IAA đạt 46,46 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Hai dòng vi khuẩn được nhận diện bằng phương pháp so sánh trình tự vùng gen 16S rDNA, kết quả dòng PL2 được xác định tương đồng dòng *Bacillus megaterium* và dòng PL9 được xác định tương đồng dòng *Burkholderia cenocepacia*.

Trích dẫn: Nguyễn Anh Huy và Nguyễn Hữu Hiệp, 2018. Phân lập và nhận diện các dòng vi khuẩn chịu mặn có khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA từ đất sản xuất lúa - tôm ở Bạc Liêu, Sóc Trăng và Kiên Giang. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(1B): 7-12.

1 GIỚI THIỆU

Trong điều kiện biến đổi khí hậu và sự nóng lên toàn cầu thì xâm nhập mặn là một trong những vấn đề cấp thiết của ngành nông nghiệp vì nó tác động trực tiếp đến năng suất và chất lượng nông sản.

Trong khi đất nông nghiệp ngày càng bị thu hẹp do nhiễm mặn thì ngược lại dân số thế giới ngày càng tăng, theo dự báo sản xuất lương thực trên toàn thế phải cần tăng tới 38% vào năm 2025 và lên đến 57% vào năm 2050 (Abrol, 2004). Vi khuẩn vùng rễ kích thích sinh trưởng và phát triển ở thực vật có

vai trò quan trọng trong nông nghiệp cả về số lượng, chất lượng và tính thân thiện với môi trường. Về số lượng, phân đạm sinh học được cố định bởi vi khuẩn chiếm tới 70% tổng lượng đạm trên toàn trái đất (Peter *et al.*, 2002). Về chất lượng, phân đạm sinh học không gây hiện tượng dư đạm ở cây trồng, ngăn ngừa tích lũy nitrate, giảm ô nhiễm nguồn nước (Yang *et al.*, 2008). Ngoài ra, vi khuẩn vùng rễ còn có tác dụng giúp tăng sự hấp thu dưỡng chất từ đất, điều này có ý nghĩa cực kỳ quan trọng đối với thực vật trong điều kiện nhiễm mặn bởi vì đất nhiễm mặn là trở ngại hàng đầu trong việc hấp thu dinh dưỡng của thực vật. Vì thế, việc phân lập các dòng vi khuẩn bản địa chịu mặn có khả năng cố định đạm và tổng hợp idole acetic acid có tác dụng kích thích sinh trưởng và phát triển ở cây lúa có vai trò quan trọng trong sản xuất nông nghiệp trong điều kiện xâm nhập mặn.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện

Vật liệu: Mẫu đất được thu trên nền đất sản xuất lúa theo mô hình lúa – tôm ở Bạc Liêu, Sóc Trăng và Kiên Giang.

Hóa chất: Môi trường Burk không đạm (Park *et al.*, 2005), hóa chất định lượng ammonium (Phenol-C₅H₅OH, KCl, Nitroprusside-Na₂Fe(CN)₅NO(2H₂O), (NH₄)₂SO₄, NaOH, NaClO), hóa chất định lượng IAA (FeCl₃, H₂SO₄, KH₂PO₄, K₂HPO₄, IAA chuẩn), cồn, nước khử khoáng...

2.2 Phương pháp

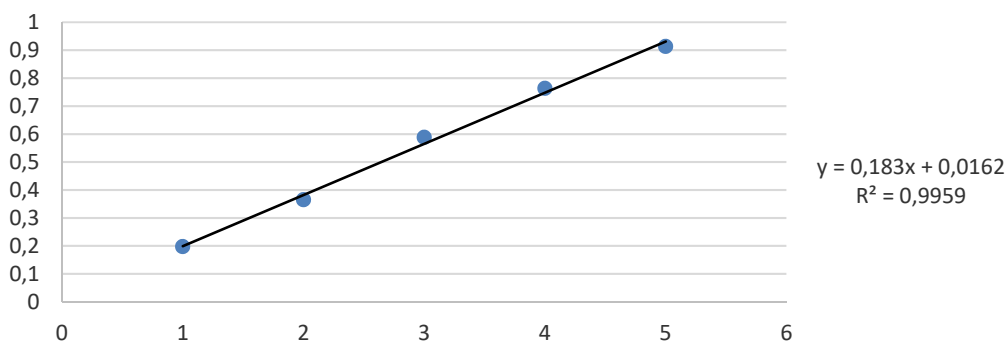
2.2.1 Phân lập các chủng vi khuẩn

Phân lập vi khuẩn từ mẫu đất: Cân 10 g đất vào

bình tam giác, cho thêm 90 mL dung dịch nước muối sinh lý (NaCl 9‰); dùng đĩa thủy tinh khuấy đều, sau đó đặt lên máy lắc ngang ở 150 vòng/phút, trong 1 giờ, để yên khoảng 30 phút, rồi tiến hành pha loãng phần nước trong bên trên ở các tỷ lệ 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³; hút 50 μL mẫu ở các nồng độ pha loãng nhỏ lên đĩa thạch chứa môi trường phân lập có bổ sung muối 10‰ và chất kháng nấm Cycloheximide 50 mg/L (mỗi nồng độ trải 4 đĩa), dùng viên bi thủy tinh vô trùng trải đều mẫu lên mặt môi trường, rồi ủ trong tủ ở nhiệt độ 30°C, từ 4-7 ngày khi khuẩn lạc xuất hiện, chọn các khuẩn lạc rời và khác nhau về màu sắc, hình dạng và kích thước, cấy chuyển nhiều lần (3 – 5 lần) trên môi trường Burk không đạm (Park *et al.*, 2005), bổ sung muối 10‰ với tỷ lệ 7NaCl:3CaCl₂ (Predeepa and Ravindran, 2010) để tách rỗng vi khuẩn. Quan sát hình dạng, khả năng chuyển động và nhuộm Gram các dòng vi khuẩn đã phân lập.

2.2.2 Xác định khả năng cố định đạm của vi khuẩn bằng phương pháp Indolephenol blue (Page *et al.*, 1982)

Nhân nuôi các dòng vi khuẩn trong môi trường Burk lỏng không đạm, trên máy lắc 60 vòng/phút, ở nhiệt độ phòng, 48 giờ, thí nghiệm lặp lại 3 lần. Xác định nồng độ NH₄⁺ nhờ phản ứng giữa phenol và NH₄⁺ tạo thành Indophenol có màu xanh, với sự xúc tác của sodium nitroprusside, trong môi trường kiềm. Định lượng ammonium (NH₄⁺) do vi khuẩn tạo ra trong các ngày 2, 4, 6 sau khi chủng. Hút 1 mL dịch vi khuẩn đã ly tâm và thêm 4 mL H₂O; 5 mL hypochloride buffer, 5 mL thuốc thử phenol nitroprusside. Tiến hành đo độ hấp thu màu (OD) ở bước sóng 636 nm, thế giá trị OD_{636nm} vào phương trình đường chuẩn, suy ra nồng độ NH₄⁺ (Hình 1).

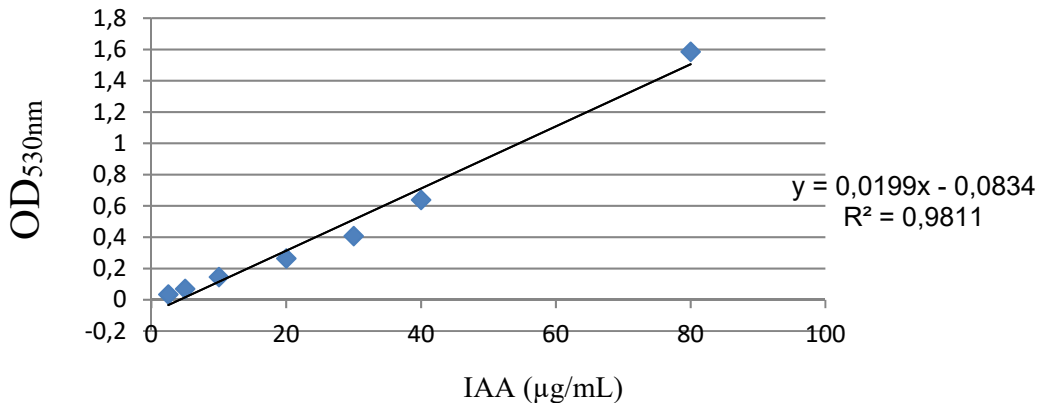


Hình 1: Đường chuẩn đo NH₄⁺ từ 0 đến 5 μg/mL

2.2.3 Xác định khả năng tổng hợp IAA của vi khuẩn bằng phương pháp Salkowski (Glickmann and Dessaux, 1995)

Hút 1 mL phần dịch trong vi khuẩn sau khi ly tâm cho vào các ống Durham. Cho 2 mL thuốc thử Salkowski R2 vào các ống Durham trên. Ủ hỗn

hợp trên trong tối 10 phút để phản ứng xảy ra hoàn toàn sau đó tiến hành đo độ hấp thụ quang phổ (OD) ở bước sóng 530 nm. Kết quả đo OD_{530nm} được thay vào phương trình đồ thị đường chuẩn, từ đó suy ra được nồng độ IAA do các dòng vi khuẩn tạo ra (Hình 2).



Hình 2: Đường chuẩn IAA từ 0 đến 80 µg/mL

2.2.4 Giải trình tự ADN để xác định loài

Nhận diện các dòng vi khuẩn chịu mặn có khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA với hàm lượng cao bằng phương pháp giải trình tự vùng gen 16S rDNA. Sử dụng cặp môi tổng 27F và 1495R có trình tự 27F: 5' GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'; 1495R: 5' CTACGGCTACCTTGTTACGA 3' (Weisburg *et al.*, 1991), để thực hiện phản ứng PCR, giải trình tự sản phẩm PCR, so sánh tương quan di truyền với các dòng vi khuẩn trên cơ sở dữ liệu NCBI bằng chương trình BLASTN. Cây phả hệ được xây dựng bằng phần mềm Mega 6.06.

2.2.5 Phương pháp thống kê

Dùng phần mềm Microsoft Office Excel 2010

để nhập số liệu, vẽ đồ thị, dựng đường chuẩn và sử dụng phần mềm SAS phiên bản 9.1 để thống kê số liệu.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập các chủng vi khuẩn

Từ 24 mẫu đất vùng rẫy lúa nhiễm mặn ở Bạc Liêu, Sóc Trăng và Kiên Giang đã phân lập được 116 dòng vi khuẩn chịu mặn ở nồng độ muối 10‰. Các dòng vi khuẩn được nuôi trên môi trường Burk không đạm có bổ sung muối với nồng độ 10‰, sau 2 - 4 ngày, quan sát và mô tả khuẩn lạc và đặc điểm tế bào vi khuẩn.



Hình 3: Khuẩn lạc của vi khuẩn trên môi trường Burk không đạm bổ sung muối 10‰

Đặc điểm khuẩn lạc: Dạng khuẩn lạc, hình tròn 77/116 (66%), hình không đều 39/116 (34%). Màu sắc, màu trắng 103/116 (89%), màu vàng 13/116 (11,2%). Bìa nguyên chiếm đa số với 93/116 (80%), dạng bìa răng cưa có 23/116 (20%). Độ nổi, dạng mô chiếm đa số 93/116 (79%), dạng lồi 19/116 (16%), dạng cầu chông 5/116 (5%).

Đặc điểm tế bào vi khuẩn: Hình dạng, que ngắn chiếm 69/116 (59%), que dài 25/116 (22%), song cầu khuẩn 22/116 (19%), hình cầu 7/116 (6%). Vi khuẩn có khả năng chuyển động 79/116 (68%), không chuyển động 37/116 (32%). Vi khuẩn Gram dương và Gram âm có số lượng xấp xỉ bằng nhau, Gram âm 59/116 (51%), Gram dương 57/116 (49%).

3.2 Khả năng tổng hợp NH₄⁺ của vi khuẩn

Tất cả 116 dòng vi khuẩn chịu mặn đều có khả năng tổng hợp ammonium (NH₄⁺). Tuyến chọn được 7 dòng có khả năng cố định đạm cao đạt từ 1,45 – 4,37 µg/mL. Dòng NH9 và NH10 cố định đạm cao nhất ở ngày 4 đạt 4,37 µg/mL và 4,34 µg/mL.

Bảng 1: Khả năng cố định đạm của một số dòng vi khuẩn phân lập được

Vi khuẩn	Hàm lượng NH ₄ ⁺ (µg/mL)		
	Ngày 2	Ngày 4	Ngày 6
PL1	2,00 ^d	3,27 ^c	1,74 ^a
PL2	2,03 ^d	3,73 ^b	1,37 ^c
PL9	2,71 ^c	1,51 ^c	1,78 ^d
PL10	3,79 ^b	1,52 ^c	0,88 ^e
NH9	1,92 ^d	4,37 ^a	1,58 ^b
NH10	3,79 ^a	4,34 ^a	1,41 ^c
TS4	1,45 ^c	2,01 ^d	0,92 ^e
Trung bình	2,57	2,83	1,30
CV (%)	4,88	6,35	6,38
F	144,23*	84,89*	34,48*

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có các chữ a, b, c... giống nhau biểu thị khác biệt không có ý nghĩa thống kê

*: không khác biệt ở độ tin cậy 95% theo phép thử Duncan

Kết quả tương tự cũng được tìm thấy ở nghiên cứu của Nguyễn Thị Pha (2014) khi phân lập các dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm ở hệ sinh thái đất mặn ở Đồng bằng sông Cửu Long (4,8 µg/mL NH₄⁺).

3.3 Khả năng tổng hợp IAA của vi khuẩn

Một trăm mười sáu dòng vi khuẩn chịu mặn có khả năng tổng hợp ammonium (NH₄⁺) được tiến hành khảo sát khả năng tổng hợp IAA. Kết quả có 22 dòng vi khuẩn có hoạt tính tổng hợp IAA cao. Dòng PL4 và PL5 tổng hợp IAA cao nhất ở ngày 2

và đạt 53,79 µg/mL và 51,60 µg/mL. Theo Patel and Desai (2015) khi phân lập vi khuẩn từ đất vùng rễ lúa ở Ấn Độ cũng có khả năng tổng hợp IAA từ 5,79 – 43,03 µg/mL.

Bảng 2: Khả năng tổng hợp IAA của một số dòng vi khuẩn phân lập được

Vi khuẩn	Hàm lượng IAA (µg/mL)		
	Ngày 2	Ngày 4	Ngày 6
PL4	53,79 ^a	21,79 ^f	24,33 ^{efg}
PL5	51,60 ^a	29,17 ^d	32,82 ^{cd}
PL9	46,46 ^b	32,83 ^e	35,80 ^b
BS2	45,68 ^{bc}	29,18 ^d	16,26 ^j
PL2	45,31 ^{cb}	36,76 ^{ab}	30,60 ^d
PL15	45,25 ^{bed}	31,97 ^c	31,91 ^d
BS6	44,94 ^{bed}	35,83 ^b	30,51 ^d
BS4	44,70 ^{bed}	30,16 ^d	23,45 ^{ef}
PL16	44,61 ^{bed}	31,77 ^c	25,38 ^{ef}
PL8	44,53 ^{bed}	37,20 ^{ab}	36,06 ^{ab}
BS7	44,20 ^{bed}	20,08 ^g	19,84 ^h
NH1	42,32 ^{bced}	33,18 ^e	36,00 ^b
PL1	42,20 ^{bcedf}	31,90 ^e	39,49 ^a
PL3	41,67 ^{bcedf}	15,16 ⁱ	16,45 ^j
PL14	41,03 ^{def}	22,32 ^f	35,52 ^{bc}
BS3	40,96 ^{def}	37,88 ^a	36,82 ^{ab}
BS5	39,84 ^{ef}	25,43 ^e	18,79 ^{ij}
NH4	38,01 ^f	18,53 ^h	21,85 ^{hg}
NH3	33,74 ^g	22,76 ^f	26,79 ^e
BS8	32,40 ^g	15,54 ⁱ	11,01 ^k
BS9	30,83 ^g	16,14 ⁱ	13,00 ^k
Trung bình	42,58	27,41	26,96
CV (%)	5,30	3,41	6,27
F	16,71*	176,77*	75,95*

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có các chữ a, b, c... giống nhau biểu thị khác biệt không có ý nghĩa thống kê

*: không khác biệt ở độ tin cậy 95% theo phép thử Duncan

3.4 Kết quả định danh vi khuẩn bằng kỹ thuật giải trình tự vùng gen 16S rDNA

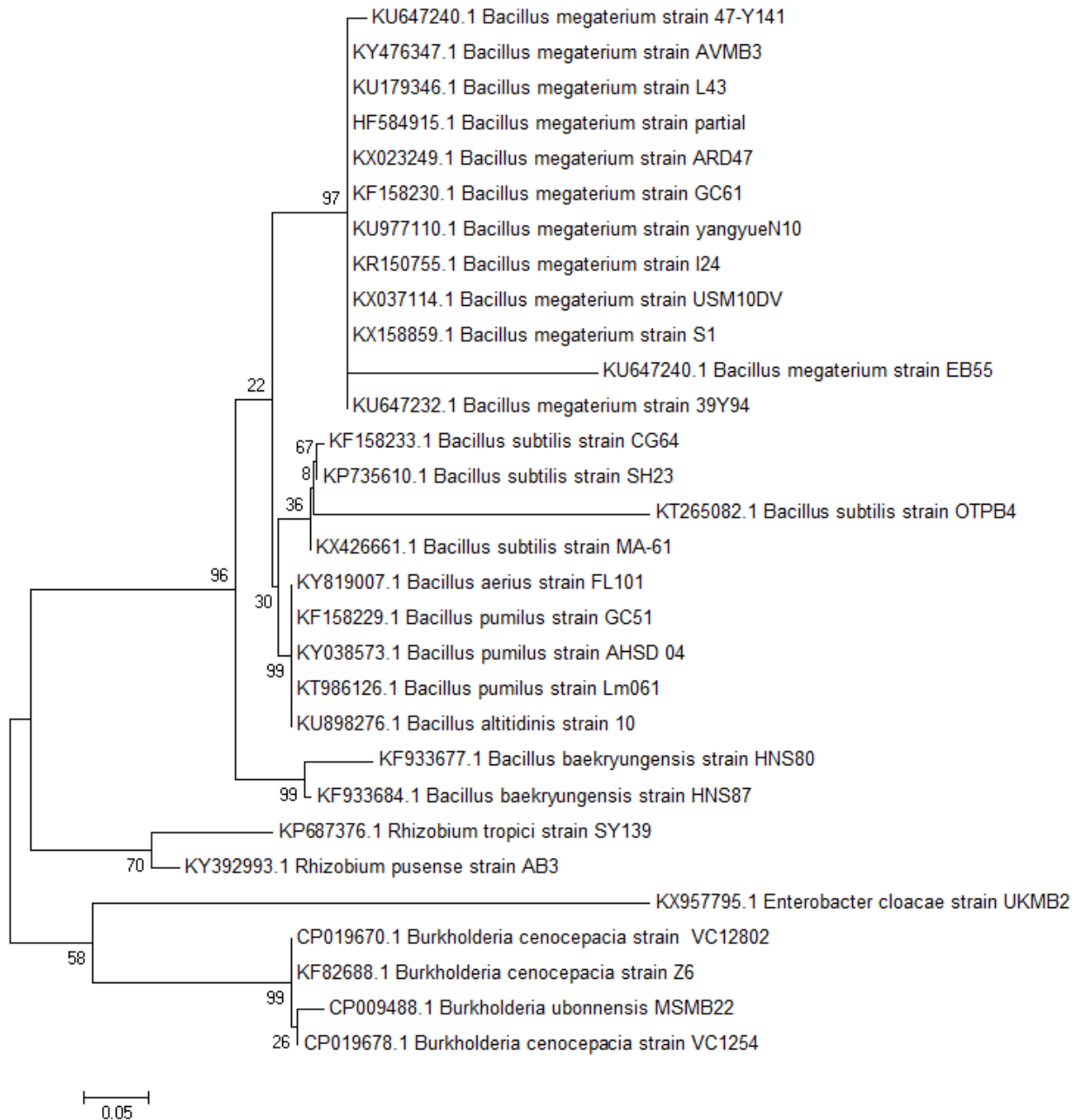
Dựa vào kết quả giải trình tự vùng gen 16S rDNA và so sánh tương quan di truyền trên cơ sở dữ liệu NCBI. Kết quả dòng vi khuẩn PL2 được xác định là dòng vi khuẩn *Bacillus megaterium* USMS10DV, với tổng số nucleotide được giải trình tự là 1498 bp, tỷ lệ tương đồng là 99% với trình tự đã được đăng ký trong ngân hàng gene NCBI có ký hiệu KX037114.1. Theo Liu and Zhao (2006), *Bacillus megaterium* C4 có khả năng cố định đạm sống trong rễ cây lúa, cây bắp, thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương. *Bacillus megaterium* Azw-1, phát triển ở nhiệt độ từ 10 – 40°C (nhiệt độ tối ưu 30°C), pH từ 4,0 – 10 (pH tối ưu 7,0), độ mặn từ 2 – 8%, độ mặn tối ưu 3% (Saini et al., 2016). Dòng PL9 được xác định là dòng vi khuẩn

Burkholderia cenocepacia VC12802, với 1377 nucleotide được giải trình tự, tỷ lệ tương đồng là 97% với trình tự đã được đăng ký trong ngân hàng gene NCBI có ký hiệu CP019670.1. Theo

Widawati and Sudiana (2016), dòng vi khuẩn *Burkholderia cenocepacia* được phân lập từ cây lúa có khả năng cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA.

Bảng 3: Kết quả giải trình tự hai dòng vi khuẩn PL2 và PL9

Dòng vi khuẩn	Kết quả so sánh độ tương đồng trên Ngân hàng dữ liệu NCBI	Đoạn gen giải trình tự (nucleotide)	Mức độ đồng hình (%)	Accession number
PL2	<i>Bacillus megaterium</i> USMS10DV	1498	99	KX037114.1
PL9	<i>Burkholderia cenocepacia</i> VC12802	1377	97	CP019670.1



Hình 4: Cây phả hệ (phylogenetic tree) trình bày mối quan hệ di truyền giữa các dòng vi khuẩn vùng rễ lúa chịu mặn được phân lập và nhận diện (theo Neighbor-joining)

Cây phá hệ (Hình 4) cho thấy các dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA được phân lập từ đất vùng rẫy lúa nhiễm mặn ở Bạc Liêu, Sóc Trăng và Kiên Giang thuộc chi *Bacillus*, chi *Rhizobium*, chi *Burkholderia* và chi *Enterobacter*.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Một trăm mười sáu dòng vi khuẩn chịu mặn ở nồng độ muối 10‰ phân lập được đều có khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA. Dòng PL2 và PL9 vừa có hoạt tính cố định đạm và tổng hợp ở mức cao được nhận diện *Bacillus megaterium* và dòng *Burkholderia cenocepacia*. Dòng PL2 cố định đạm cao nhất ở ngày 4 (3,73 µg/mL), tổng hợp IAA cao nhất ở ngày 2 (45,31 µg/mL); dòng PL9 cố định đạm cao nhất ở ngày 2 (2,71 µg/mL), tổng hợp IAA cao nhất ở ngày 2 (46,46 µg/mL). Hai dòng vi khuẩn này có tiềm năng ứng dụng sản xuất phân bón vi sinh sử dụng cho cây lúa trồng trên đất nhiễm mặn.

4.2 Đề xuất

Tiến hành bố trí thí nghiệm đánh giá khả năng cố định đạm hữu hiệu của hai dòng vi khuẩn trên lên cây lúa trồng trong chậu và ngoài đồng trong điều kiện nhiễm mặn nhằm làm cơ sở cho việc sản xuất phân vi sinh phục vụ cho sản xuất nông nghiệp bền vững, thích ứng với biến đổi khí hậu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abrol, Y. P., 2004. Wild, A. soil, land and food: managing the land during the twenty-first century. *Annals of Botany*, 93(6): 785-786.

Glickmann, E. and Dessaux, Y., 1995. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(2): 793-796.

Liu, X., Zhao, H. and Chen, S., 2006. Colonization of Maize and Rice Plants by Strain *Bacillus*

megaterium C4. *Current Microbiology*. 52(3): 186-190.

Nguyễn Thị Pha, 2014. Đa dạng di truyền tập đoàn vi khuẩn cố định nitơ trong đất vùng rẫy lúa ở Đồng bằng sông Cửu Long và tuyển chọn một số dòng có khả năng cố định đạm cao. Luận án Tiến sĩ vi sinh vật. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.

Page, L., Miller, R. H. and Keeney, R. D., 1982. *Methods for Soils Analysis, Part 2: Chemical and Microbial properties*, 2nd edition. American Society of Agronomy Incorporation. USA.

Park, M., Kim, C., Yang, J., Lee, H., Shin, W., Kim, S. and Sa, T., 2005. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research*, 160(2): 127-133.

Patel P. V. and Desai, P. B., 2015. Isolation of rhizobacteria from paddy field and their traits plant growth promotion. *Research Journal of Recent Sciences*. 4(IVC-2016): 34-41.

Predeepa, R. J. and Ravindran, D. A., 2010. Nodule formation, distribution and symbiotic efficacy of *Vigna unguiculata* L. under different soil salinity regimes. *Emir. J. Food Agric*, 22(4): 275 - 274.

Saini, A., Garg, V. and Saxena, J., 2016. Isolation and characterization of *Bacillus megaterium* Azw-1 for its plant growth promoting attributes. *ISOI Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science*, 2(4): 1-7.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletierand, D. A. and Lane, D. J., 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*, 173(2): 697-703.

Widawati, S. and Sudiana, M., 2016. Potency of Rhizosphere Bacteria to promote rice growth under saline condition. *BIOTROPIA*, 23(2): 116-123.

Yang, J., Kloepper, J. W. and Kyu, C. M., 2008. Rhizosphere bacteria help plant tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14(1): 1-4.