

# TUYỂN CHỌN VÀ NHẬN DIỆN VI KHUẨN CỐ ĐỊNH ĐẠM (CÓ KHẢ NĂNG HÒA TAN LÂN VÀ KALI) PHÂN LẬP TỪ VẬT LIỆU PHONG HÓA CỦA VÙNG NÚI ĐÁ HOA CƯƠNG TẠI NÚI CẨM, TỈNH AN GIANG

Lai Chí Quốc<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Đơn<sup>2</sup> và Cao Ngọc Diệp<sup>3</sup>

## ABSTRACT

Twenty-eight isolates which were likely to develop on Burk's medium were isolated on Aleksandrov medium in twenty weathering-rock samples from Cam Mountain, An Giang province. Among twenty-eight isolates, five isolates synthesized high ammonium including CA03 (11.459mg/l), CA04 (9.816mg/l), CA10 (6.390mg/l), CA18 (10.973 mg/l) and CA29 (15.398mg/l). Three bacterial isolates were chosen to sequence and compare with GenBank database of NCBI by BLAST N software. The results showed that CA10 isolate was 99% of the identity with AY117623.1 *Rhizobium tropici* PRF34, CA18 isolate was 99% of identity with JF496331.1 *Bacillus subtilis* A2-9 and CA29 isolate was 99% of identity with JN896359.1 *Rhizobium multihospitium* CC-13H. Evaluation of nitrogen fixing ability of mixture of three bacterial isolates on *Allium fistulosum* sp. and *Basella alba* L. The results showed that they supported on plant height, plant weight and biomass.

**Keywords:** Nitrate, nitrogen-fixing, phosphate and potassium solubilizing bacterium, PCR technique, weathering-rock

**Title:** Selection and identification of nitrogen fixing bacteria (phosphorus and potassium – solubilizing) isolated from weathered material of granite rock of Cam mountain – An Giang province

## TÓM TẮT

Hai mươi tám dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường Aleksandrov từ hai mươi mẫu vật liệu phong hóa của đá hoa cương đều có khả năng tổng hợp ammonium trong môi trường Burk 's. Trong đó, có 5/28 dòng tổng hợp  $NH_4^+$  cao. Giải trình tự 3/5 dòng vi khuẩn đã tuyển chọn và sử dụng phân mềm BLAST N để so sánh với trình tự các dòng vi khuẩn có trong GenBank của NCBI. Kết quả cho thấy, dòng vi khuẩn CA10 có tỉ lệ đồng hình cao với dòng AY117623.1 *Rhizobium tropici* PRF34 tỉ lệ 99%, dòng CA18 có tỉ lệ đồng hình cao với dòng JF496331.1 *Bacillus subtilis* A2-9 với tỉ lệ 99%, dòng CA29 có tỉ lệ đồng hình cao với dòng JN896359.1 *Rhizobium multihospitium* CC-13H với tỉ lệ 99%. Đánh giá khả năng cố định đạm của hỗn hợp ba dòng vi khuẩn này trên Hành lá (*Allium fistulosum* sp.) và Mồng tơi (*Basella alba* L.) cho thấy các dòng vi khuẩn này giúp cây phát triển chiều cao, trọng lượng và năng suất.

**Từ khóa:** Cố định đạm, hàm lượng nitrate, kỹ thuật PCR, vật liệu phong hóa, vi khuẩn hòa tan lân và kali

## 1 GIỚI THIỆU

Đối với thực vật nói chung và cây trồng nói riêng, đạm, lân và kali có vai trò sinh lý đặc biệt quan trọng trong quá trình sinh trưởng, phát triển. Vì thế, để nâng cao

<sup>1</sup> Sinh viên ngành Công nghệ sinh học K34

<sup>2</sup> Khoa Khoa học tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>3</sup> Viện NC & PT CNSH, Trường Đại học Cần Thơ

năng suất thu hoạch, nông dân đã không ngừng sử dụng các loại phân bón hóa học và tăng số vụ trồng trong năm nhằm tăng sản lượng. Sự canh tác liên tục và lạm dụng quá mức phân hóa học đã trực tiếp làm cho đất trồng thiếu chất dinh dưỡng nghiêm trọng, đất bị chai cứng, giảm độ phì nhiêu, tính chất vật lý, hóa học và sinh học của đất trồng bị thay đổi. Đồng thời, việc này cũng là nguyên nhân cơ bản làm ô nhiễm môi trường. Để giải quyết vấn đề trên, đã có nhiều nghiên cứu về việc sử dụng phân vi sinh hữu cơ được tiến hành nhằm vào nhóm vi sinh vật có khả năng khử nitơ phân tử thành ammonium nhờ enzyme nitrogenase (Cao Ngọc Diệp, 2008) đồng thời hòa tan những hợp chất phosphate, hydroxyapatite trong đất bằng cách sản xuất acid hữu cơ (Rodriguez và Fraga, 1999). Tại đồng bằng sông Cửu Long, Cao Ngọc Diệp, *et al.* (2007) đã phát hiện vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* nội sinh trong cây lúa mùa đặc sản có cả 3 đặc tính tốt: cố định đạm, hòa tan lân khó tan và tổng hợp IAA (Indole-3-acetic axit). Nguyễn Thị Thu Hà (2009), phân lập được 71 dòng vi khuẩn từ các loài cỏ chăn nuôi tại các tỉnh Vĩnh Long, Đồng Tháp, Cần Thơ. Trong đó, có 32 dòng có khả năng tổng hợp IAA và hòa tan lân rất tốt. Mục tiêu của đề tài là tuyển chọn và định danh được những dòng vi khuẩn có hoạt tính cố định đạm, hòa tan lân và kali mạnh nhất nhằm ứng dụng vào lĩnh vực sản xuất phân vi sinh (một dòng vi khuẩn có cả 3 đặc tính tốt). Đồng thời đánh giá được hiệu quả những dòng vi khuẩn đã tuyển chọn bằng việc thử nghiệm trên rau hành lá (*Allium fistulosum* sp.) và mồng tơi (*Basella alba* L.).

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Xác định khả năng tổng hợp amonium

#### 2.1.1 Xác định khả năng phát triển của vi khuẩn bằng môi trường không đạm

Từ những dòng vi khuẩn được Nguyễn Ngọc Giàu phân lập (2011) (đã có mang khả năng hòa tan lân và kali) tiến hành nuôi cấy trên môi trường Burk's (không nitơ) đặc và ủ ở 30<sup>0</sup>C, theo dõi sự phát triển của chúng từ 1-2 ngày.

#### 2.1.2 Xác định hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> do vi khuẩn tạo ra bằng phương pháp so màu (thuốc thử phenol - nitroprusside)

Đây là phương pháp xác định hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> bằng phương pháp so màu Idophenol trên quang phổ kế (Spectrophotometer) tại bước sóng 636 nm. Khả năng cố định đạm của các dòng vi khuẩn được thể hiện qua mức hấp thụ quang phổ của các mẫu đo. Những mẫu có màu xanh càng đậm thì mức hấp thụ quang phổ càng lớn và khả năng tổng hợp NH<sub>4</sub><sup>+</sup> càng cao.

#### 2.1.3 Xác định hàm lượng nitrogenase được tạo ra bằng phương pháp khử acetylene

Tiến hành bơm acetylene vào các ống nghiệm có chứa vi khuẩn, lấy 1 ml chạy trên sắc ký để xác định lượng khí ethylene sinh ra hoặc acetylene còn lại và quy về hàm lượng nitrogenase (Tilak *et al.*, 2006).

### 2.2 Nhận diện các dòng vi khuẩn

#### 2.2.1 Tách chiết DNA của vi khuẩn theo phương pháp của Neumann, *et al.* (1992)

Nuôi vi khuẩn trong 5 ml dung dịch LB lỏng, lắc trên máy lắc trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng để thu sinh khối, thực hiện các bước trích DNA như sau:

Chuyển 4 ml dịch vi khuẩn nuôi trong LB sang 2 tuýp Eppendorf 2ml → Ly tâm tuýp Eppendorf với tốc độ 13.000 vòng trong 5 phút → Loại bỏ phần nước → Hút 250 µl dung dịch TE cho vào tuýp trên và đánh tan sinh khối, dồn mẫu ở 2 tuýp vào 1 tuýp eppendorf 2 ml → Thêm vào 50 µl SDS 10% để hòa tan DNA → Thêm 5 µl proteinase K sau đó ủ ở nhiệt độ 65<sup>0</sup>C trong 20 phút, 5 phút đảo ngược tuýp một lần → Thêm vào 400 µl CTAB 10% 0,7M NaCl → Ủ ở nhiệt độ 65<sup>0</sup>C trong 20 phút → Thêm vào 600 µl Chloroform: isoamyl alcohol (24:1) để tủa protein và tạo màng ngăn giữa DNA và protein → Ly tâm với tốc độ 12.000 vòng trong 10 phút → Chuyển phần dịch trong trên màng ngăn sang tuýp eppendorf 2 ml mới (thao tác nhẹ nhàng, cẩn thận tránh làm vỡ màng ngăn) → Thêm vào 1ml isopropanol và trộn đều để tủa DNA và thu được sản phẩm ở dạng cô đặc (nhằm bảo vệ DNA tránh sự phân hủy của các enzyme) → Giữ tuýp ở - 20<sup>0</sup>C ít nhất là 30 phút → Lấy mẫu ra và đem ly tâm với tốc độ 13.000 vòng trong 10 phút → Loại bỏ phần nước → Rửa DNA bằng cách thêm 1ml ethanol 70%, sau đó ly tâm 12.000 vòng trong 5 phút. Tiến hành rửa DNA 2 lần → Ly tâm chân không trong 15 – 20 phút để loại bỏ ethanol → Hòa tan mẫu trong 30µl nước cất 2 lần (Bi nước) và trữ ở - 20<sup>0</sup>C.

### 2.2.2 Thực hiện phản ứng PCR và điện di sản phẩm PCR

DNA của các dòng vi khuẩn sau khi trích được tiến hành PCR với cặp mồi 8F và 1492R. Nhận diện các dòng vi khuẩn ở băng (band) 1500 bp theo thang chuẩn 100bp.

### 2.2.3 Giải trình tự một số dòng vi khuẩn

Sử dụng sản phẩm PCR để giải trình tự bằng máy giải trình tự tự động ABI3130 thông qua công ty MACROGEN, Hàn Quốc. Sử dụng chương trình BLAST N (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) để so sánh trình tự đoạn gen 16s-rDNA của các dòng vi khuẩn với trình tự gen 16s-rDNA của các loài vi khuẩn có trong ngân hàng dữ liệu của NCBI (National Center for Biotechnology Information).

## 2.3 Thí nghiệm đánh giá hiệu quả của vi khuẩn trên rau xanh

### 2.3.1 Đánh giá năng suất thu được

Tiến hành thí nghiệm với hai loại rau ăn lá là hành lá và mồng tơi nhằm đánh giá hiệu quả các dòng vi khuẩn đã tuyển chọn. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 nghiệm thức và 4 lần lặp lại, số khay được bố trí là 16 khay. Diện tích mỗi khay là 25cm x 40cm = 1000 cm<sup>2</sup>, chiều cao mỗi khay là 4cm. Các nghiệm thức sử dụng trong thí nghiệm như sau: Nghiệm thức 1 (đối chứng, không bón phân), Nghiệm thức 2 (sử dụng hỗn hợp các dòng vi khuẩn có hoạt tính cố định đạm, hòa tan lân và kali tốt với tỉ lệ 1lít/m<sup>2</sup>), Nghiệm thức 3 (bón phân N-P-K với tỉ lệ 4g/m<sup>2</sup>), Nghiệm thức 4 (kết hợp bón phân N-P-K với hỗn hợp các dòng vi khuẩn có hoạt tính cố định đạm, hòa tan lân và kali tốt với tỉ lệ 1g/m<sup>2</sup> N-P-K + 750ml/m<sup>2</sup> dung dịch hỗn hợp các dòng vi khuẩn).

### 2.3.2 Phân tích mẫu đất

Mẫu đất được lấy ở 2 thời điểm, trước khi thí nghiệm và sau khi kết thúc thí nghiệm. Đất được để khô tự nhiên rồi nghiền mịn, tiến hành phân tích các chỉ tiêu: pH, đạm tổng số, lân dễ tiêu, kali hữu hiệu và hàm lượng chất hữu cơ.

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

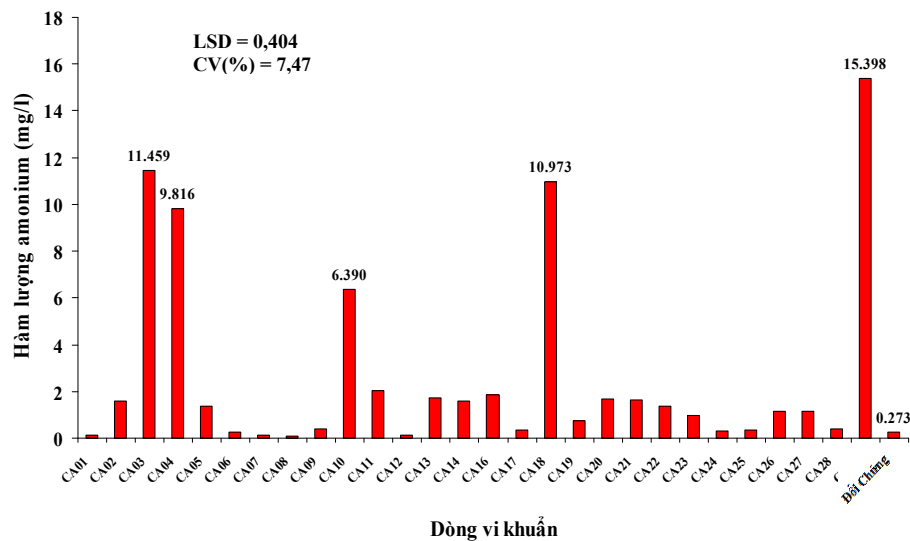
#### 3.1 Kết quả xác định khả năng tổng hợp amonium của các dòng vi khuẩn

Từ những dòng vi khuẩn được Nguyễn Ngọc Giàu (2011) phân lập (đã có mang khả năng hòa tan lân và kali), tiến hành cấy lên môi trường Burk's (không nitơ) đặc và ủ ở 30°C. Kết quả quan sát sau 3 ngày cho thấy: tất cả các đĩa petri đều xuất hiện khuẩn lạc.



Hình 1: Khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường Burk's sau 72 giờ cấy

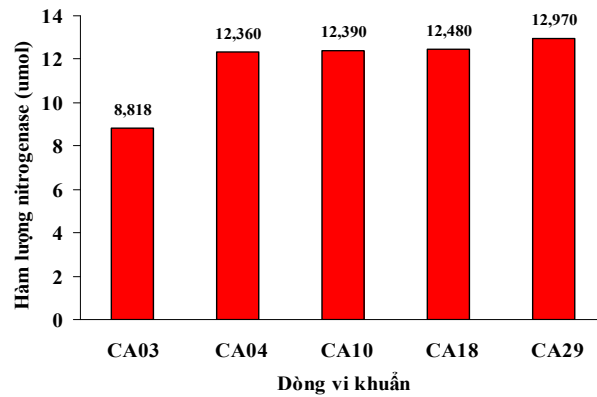
Chuyển những dòng vi khuẩn trên vào môi trường Burk's lỏng để đo sự hình thành amonium bằng phương pháp so màu (Phenol-Nitroprusside). Kết quả cho thấy cả 28 dòng vi khuẩn đều có khả năng cố định đạm (so với kết quả của mẫu đối chứng không chủng vi khuẩn ở mức ý nghĩa 1%). Khả năng tổng hợp NH<sub>4</sub><sup>+</sup> có sự biến động theo thời gian, hầu hết các dòng vi khuẩn tổng hợp đạm đạt mức cao nhất ở ngày nuôi thứ 4 rồi giảm dần ở những ngày nuôi tiếp theo.



Hình 2: Khả năng tổng hợp NH<sub>4</sub><sup>+</sup>(mg/l) của các dòng vi khuẩn sau 4 ngày chủng

Đa số các dòng vi khuẩn đều có khả năng cố định đạm nhưng hiệu quả không cao (dưới 5mg/l). Tuy nhiên, một vài dòng vi khuẩn lại có khả năng cố định đạm rất tốt, cụ thể là các dòng CA03 (11,459mg/l), CA04 (9,816mg/l), CA10 (6,390mg/l), CA18 (10,973 mg/l), CA29 (15,398mg/l) đều có sự khác biệt ở mức ý nghĩa 1% so với đối chứng (0,273mg/l) (Hình 2). Đây là 5 dòng vi khuẩn được chọn để kiểm

tra khả năng cố định đạm thông qua xác định hàm lượng nitrogenase bằng phương pháp khử acetylene (Hình 3).

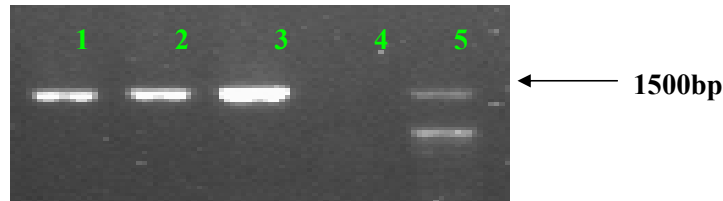


**Hình 3:** Khả năng tổng hợp nitrogenase của 5 dòng vi khuẩn (µmol)

Kết quả trên cho thấy tất cả các dòng vi khuẩn được chọn đều có khả năng tạo nitrogenase. Hàm lượng nitrogenase do các dòng vi khuẩn tạo ra dao động từ 8,818µmol đến 12,970µmol. Tiến hành chọn ra dòng vi khuẩn có cả 3 hoạt tính cố định đạm, hòa tan lân và kali tốt là CA10, CA18 và CA29 để nhận diện bằng kỹ thuật PCR.

**3.2 Kết quả nhận diện các dòng vi khuẩn**

Phổ điện di trên gel agarose cho thấy cả 3 dòng vi khuẩn đều có băng (band) ở vị trí 1500bp so với thang chuẩn (Hình 4).



**Hình 4:** Phổ điện di của sản phẩm PCR được nhận lên từ đoạn 16S rRNA của 3 dòng vi khuẩn

Chú thích: (1) CA10; (2) CA18; (3) CA29; (4) đối chứng âm; (5) thang chuẩn.

Tiến hành giải trình tự các dòng vi khuẩn, sử dụng chương trình BLAST N để so sánh mức độ đồng hình của trình tự các dòng vi khuẩn được tuyển chọn với trình tự của các dòng vi khuẩn trong ngân hàng gen trên trang wed: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

Trình tự nucleotid của dòng CA10:

```
CGAAACACATGCAAGTCGAGCGCCCTTTAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGAATCTACCTTTTGCTACG
GAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAAGATTTATCGGCAAGAGATGAGCCCGGTT
GGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGG
ACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGC
CGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCG
GCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGG
CGGATCGATCAGTCAGGGGTGAAATCCAGGGCTCAACCCTGGAAGTGCCTTTGATACTGTGATCTGGAGTATGGAAGA
GGTGAGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCC
ATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATG
```

TTAGCCGTCGGGAGTATACTGTTCCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCGCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTA  
 AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCA  
 GCCCTTGACATCCTGTGTTACTCTAGAGATAGGGGGTCCACTTCGGTGGCGCAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTC  
 AGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCCTTAGTTGGCCAGCATTAAGTTGGGCAC  
 TCTAAGGGGACTGCCGGTGATAACCCAAAGGAAAGGTGGGGATGACGCTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGTAC  
 ACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGCACGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAGCCATCTCAGTTCCGGAT  
 TGCACCTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTAGAATACGTTCCCGG  
 GCCTTGACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGTTT

Dòng CA10 có tổng số nucleotid được giải là 1320 nucleotid, cho kết quả đồng hình với dòng AY117623.1 *Rhizobium tropici* PRF34 với tỉ lệ 99% (hình 5). *Rhizobium tropici* là một loài vi khuẩn mới lạ sống phổ biến trong đất, có khả năng tạo nốt sần trên cây đậu Cô Ve (một loại cây được trồng nhiều tại vùng núi An Giang) và các cây thuộc chi keo đậu (*Leucaena*) (<http://ijs.sgmjournals.org/content/41/3/417.abstract>).

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">FJ593647.1</a>	Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone JAB4 16S ribosomal RNA gene, partial	2403	2403	99%	0.0	99%
<a href="#">FJ593641.1</a>	Uncultured bacterium clone JAB A1 16S ribosomal RNA gene, partial s	2403	2403	99%	0.0	99%
<a href="#">DQ507206.1</a>	<i>Rhizobium</i> sp. MTR17A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2403	2403	99%	0.0	99%
<a href="#">JN896359.1</a>	<i>Rhizobium multihospitium</i> strain CC-13H 16S ribosomal RNA gene, par	2398	2398	99%	0.0	99%
<a href="#">AY117623.1</a>	<i>Rhizobium tropici</i> strain PRF34 16S ribosomal RNA gene, complete sec	2398	2398	99%	0.0	99%

Hình 5: Mức độ tương đồng của dòng CA10 so với các dòng khác trên cơ sở dữ liệu NCBI

Trình tự nucleotid của dòng CA18:

AGTCCGAGCTATACTGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGT  
 GGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCCGATGGTTCAA  
 GCATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCCTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGCTCACC  
 AAGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGG  
 CAGAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACCGCGGTGAGTGTGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCT  
 CTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAAC  
 TACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAATGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTT  
 AAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAAGGAGAGTGG  
 AATTCACGCTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAC  
 TACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGTAA  
 GTGTTAGGGGTTTTCCGCCCCCTTAGTGTCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCCGCTGGGGAGTACGGTCCGAAG  
 AACTCAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTAC  
 CAGGCTCTTGACATCCTAGAGATAGGACGTCCCCCTTCGGGGGGCAGAGTACAGGTGGGTGCATGGGTTTTGTCCG  
 TCCAGTCTGTCGGTGTGAGATG

Dòng CA18 có tổng số nucleotid được giải là 1060 nucleotid, cho kết quả đồng hình với dòng JF496331.1 *Bacillus subtilis* A2-9 với tỉ lệ 99% (Hình 6).

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">FJ863110.1</a>	Uncultured bacterium clone L2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1884	1884	99%	0.0	99%
<a href="#">DQ990038.1</a>	Bacterium 8-gw1-10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1884	1884	99%	0.0	99%
<a href="#">GQ280027.1</a>	<i>Bacillus subtilis</i> strain BJ-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1882	1882	99%	0.0	99%
<a href="#">JN244978.1</a>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain DHXJ08 16S ribosomal RNA gene, par	1881	1881	99%	0.0	99%
<a href="#">JF496331.1</a>	<i>Bacillus subtilis</i> strain A2-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1881	1881	99%	0.0	99%

Hình 6: Mức độ tương đồng của dòng CA18 so với các dòng khác trên cơ sở dữ liệu NCBI

Trình tự nucleotid của dòng CA29:

TCAGCTTCTGCAAGTCGAGCGCCCTTACGGGAGCGGACAGCGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCTTTTGCTACGG  
 AATAACGCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGTATGTCTCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGCAAGAGATGAGCCCGGTTG  
 GATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGA  
 CTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCGAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCC  
 CCGTGAAGTGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCGG  
 CTAACCTCTGTCAGCAGCCCGGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGG

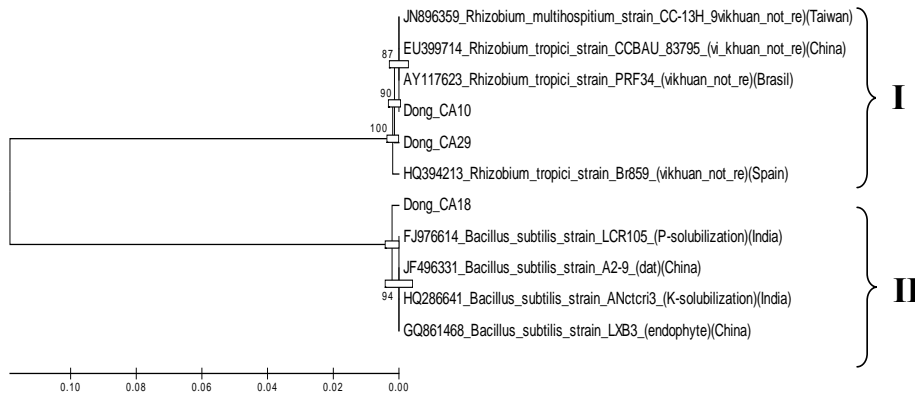
GGATCGATCAGTCAGGGGTGAAATCCAGGGCTCAACCCTGGAAGTGCCTTTGATACTGTCGATCTGGAGTATGGAAGAG  
 GTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGGCTCACTGGTCCA  
 TTAAGTACCGCTGAGTGGCGAAAGCGTGGGGAGCAACACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGT  
 TAGCCGTCGGGCAGTATACTGTTCCGTTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCGCCCTGGGGAGTACGGTCCGCAAGATTAA  
 AACTCAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGTGGAGCATGTGGGTTTAAATTCGAAGCAACGCCGAGAACCTTACCA  
 GCCCTTGACATCCTGTGTTACCTCTAGAGGATAGGGGGTCCACTTCGGTGGCGCAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGT  
 CAGCTCGTGTCTGAGAATGTTTGGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTGGGTGG  
 GCACCTTAAGGGACTGCGGTGATAGCCGAGAGGAAAGGG

Dòng CA29 có tổng số nucleotid được giải là 1081 nucleotid, cho kết quả đồng hình với dòng JN896359.1 *Rhizobium multihospitium* CC-13H với tỉ lệ 99% (Hình 7).

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">HM486522.1</a>	Rhizobium sp. ICB503 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1903	1903	98%	0.0	99%
<a href="#">JN896359.1</a>	Rhizobium multihospitium strain CC-13H 16S ribosomal RNA gene, par	1897	1897	98%	0.0	99%
<a href="#">AF286362.1</a>	Rhizobium sp. PRY71 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1897	1897	98%	0.0	99%

Hình 7: Mức độ tương đồng của dòng CA29 so với các dòng khác trên cơ sở dữ liệu NCBI



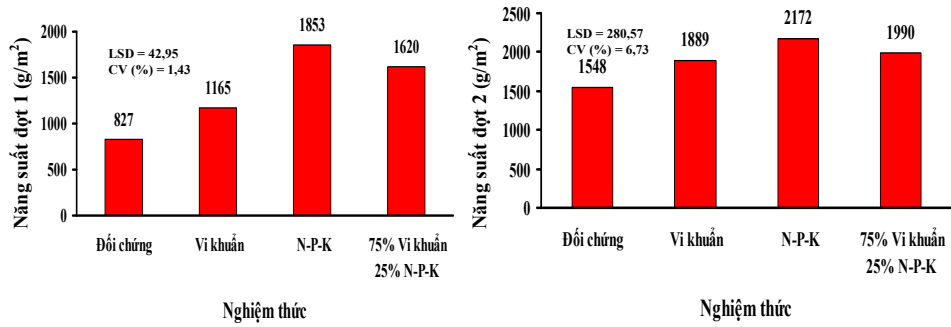
Hình 8: Cây phả hệ thể hiện mối quan hệ di truyền giữa 3 dòng vi khuẩn so với các dòng vi khuẩn khác trên CSDL NCBI (Maximum-Likelihood tree)

Theo phân tích mối quan hệ di truyền của 3 dòng vi khuẩn này (hình 8) cho thấy cây phả hệ chia ra 2 nhánh (cluster) lớn có khoảng cách tương đương nhau. Dòng CA10 và CA29 ở nhánh I có mối quan hệ rất gần gũi với các dòng vi khuẩn nốt rề thuộc chi *Rhizobium* mà cụ thể là *Rhizobium multihospitium* và *Rhizobium tropici*. Đây là nhóm vi khuẩn cố định đạm, gram âm, có khả năng khoáng hóa đồng thời hòa tan lân hữu cơ và vô cơ thành lân hữu dụng (Khan, *et al.*, 2009). Trong khi đó, dòng CA18 ở nhánh II có mối quan hệ gần gũi với các dòng vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus subtilis*. Đây là nhóm vi khuẩn hình que, gram dương, hiếu khí, có khả năng sản sinh acid hữu cơ hòa tan lân khó tan (Rodriguez và Fraga., 1999).

### 3.3 Kết quả thử nghiệm trên rau xanh

#### 3.3.1 Kết quả thử nghiệm trên hành lá (*Allium fistulosum* sp.)

Tiến hành trồng hành lá 2 đợt, thời gian thu hoạch mỗi đợt khoảng 30 ngày. Năng suất trung bình sau 2 đợt được trình bày ở hình 9.



**Hình 9: Hiệu quả của hỗn hợp các dòng vi khuẩn được tuyển chọn và phân vô cơ (N-P-K) trên năng suất hành lá sau 2 đợt (g/m<sup>2</sup>)**

Năng suất hành lá sau 2 vụ dao động từ 827g đến 2172g. Khi sử dụng hỗn hợp các dòng vi khuẩn năng suất trung bình tăng 1,29 lần so với đối chứng, việc sử dụng hoàn toàn phân hóa học năng suất trung bình tăng 1,69 lần so với đối chứng và khi kết hợp chủng vi khuẩn với 25% phân hóa học cho năng suất trung bình tăng 1,52 lần so với đối chứng. Năng suất thu được ở nghiệm thức 3 so với nghiệm thức 4 chênh lệch không nhiều chứng minh được rằng việc sử dụng hỗn hợp các dòng vi khuẩn có khả năng thay thế một lượng phân hóa học đáng kể. Tiến hành đo hàm lượng nitrate trong hành lá, kết quả kiểm tra cho thấy hành lá có hàm lượng nitrate thấp nhất khi sử dụng hỗn hợp các dòng vi khuẩn và cao nhất ở nghiệm thức bốn phân hóa học (Bảng 1).

**Bảng 1: Hiệu quả của hỗn hợp các dòng vi khuẩn được tuyển chọn và phân vô cơ (N-P-K) trên hàm lượng nitrate (mg/kg) của hành lá trong 2 đợt**

Nghiệm thức	Đợt 1	Đợt 2
Đối chứng	440,88	236,34
Vi khuẩn	280,54	55,04
N-P-K	855,93	1655,39
75% Vi khuẩn : 25% N-P-K	831,66	177,07

Kết quả phân tích đất trong bảng 2 cho thấy độ chênh lệch pH giữa các nghiệm thức không nhiều và pH đất khá ổn định ở mức trung tính. Hàm lượng đạm tổng, lân dễ tiêu, kali hòa tan và thành phần chất hữu cơ trong đất ở các nghiệm thức có sử dụng vi khuẩn đều tăng so với mẫu đất trước thí nghiệm. Điều này cho thấy các dòng vi khuẩn có hiệu quả tích cực đối với thành phần dinh dưỡng trong đất.

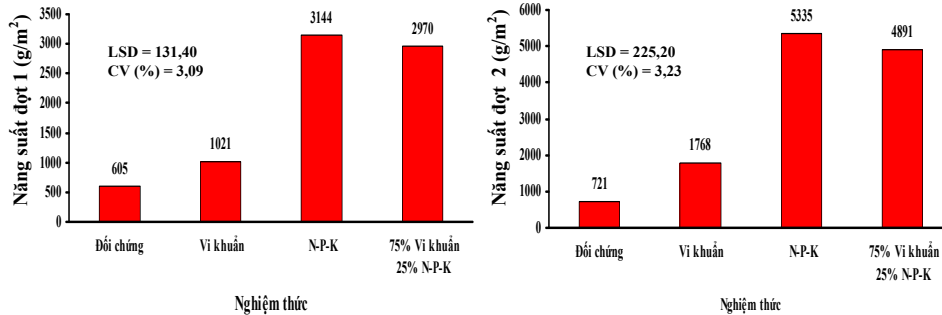
**Bảng 2: Thành phần, tính chất đất trồng hành lá trước và sau thí nghiệm**

Nghiệm thức	pH	N <sub>tổng số</sub> (%)	P <sub>dễ tiêu</sub> (mg/100g đất)	K <sub>hòa tan</sub> (mg/kg)	Chất hữu cơ (%)
Trước thí nghiệm	7,17	0,83	10,81	724,69	5,91
Sau thí nghiệm					
Đối chứng	7,36	0,85	9,79	840,60	5,78
Vi khuẩn	7,32	1,13	18,81	942,19	6,05
N-P-K	7,33	0,94	17,23	767,05	6,02
75% Vi khuẩn : 25% N-P-K	7,34	1,27	15,25	920,51	7,12



3.3.2 Kết quả thử nghiệm trên rau mồng tơi (*Basella alba L.*)

Năng suất sau 2 đợt thử nghiệm mồng tơi (hình 10) dao động từ 605g đến 5335g. Trong đó, nghiệm thức sử dụng hỗn hợp các dòng vi khuẩn với 25% phân hóa học có sự chênh lệch không quá nhiều so với nghiệm thức sử dụng 100% phân hóa học. Vì vậy, việc sử dụng hỗn hợp các dòng vi khuẩn trên rõ ràng là có hiệu quả ở mức ý nghĩa 1% đối với trọng lượng và năng suất mồng tơi.



Hình 10: Hiệu quả của hỗn hợp các dòng vi khuẩn được tuyển chọn và phân vô cơ (N-P-K) trên năng suất mồng tơi sau 2 đợt (g/m²)

Kết quả kiểm tra hàm lượng nitrate ở bảng 3 cho thấy, cây có hàm lượng nitrate thấp nhất khi sử dụng hỗn hợp các dòng vi khuẩn. Trong khi đó, nghiệm thức bón phân hóa học có hàm lượng nitrate ở mức cao nhất. Do thí nghiệm thực hiện trong phạm vi nhỏ, khối lượng mẫu thu được hạn chế nên chỉ tiêu hàm lượng nitrate chỉ được đánh giá ở mức tương đối (không lặp lại).

Bảng 3: Hiệu quả của hỗn hợp các dòng vi khuẩn được tuyển chọn và phân vô cơ (N-P-K) trên hàm lượng nitrate (mg/kg) của mồng tơi trong 2 đợt

Nghiệm thức	Đợt 1	Đợt 2
Đối chứng	27,41	39,54
Vi khuẩn	5,87	38,50
N-P-K	223,05	1339,96
75% Vi khuẩn : 25% N-P-K	215,34	1094,27

Kết quả phân tích đất trồng mồng tơi (Bảng 4) cũng tương tự hành lá, pH đất sau thu hoạch tăng ít, độ chênh lệch pH giữa các nghiệm thức không nhiều cho thấy pH đất khá ổn định ở mức trung tính.

Bảng 4: Thành phần, tính chất đất trồng mồng tơi trước và sau thí nghiệm

Nghiệm thức	pH	N <sub>tổng số</sub> (%)	P <sub>dễ tiêu</sub> (mg/100g đất)	K <sub>hòa tan</sub> (mg/kg)	Chất hữu cơ (%)
Trước thí nghiệm	7,17	0,83	10,81	724,69	5,91
Sau thí nghiệm					
Đối chứng	7,34	0,84	9,86	669,99	5,65
Vi khuẩn	7,37	0,89	12,28	889,83	6,05
N-P-K	7,35	0,85	14,48	804,58	6,13
75% Vi khuẩn : 25% N-P-K	7,38	1,03	11,22	987,08	7,19

Trong khi đó, hàm lượng đạm tổng, lân dễ tiêu, kali hòa tan và thành phần chất hữu cơ trong đất ở các nghiệm thức có sử dụng vi khuẩn đều tăng so với mẫu đất

trước thí nghiệm. Điều này cho thấy các dòng vi khuẩn có hiệu quả tích cực đối với thành phần dinh dưỡng trong đất.

#### 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

##### 4.1 Kết luận

- 28 dòng vi khuẩn được phân lập từ vùng núi Cẩm tỉnh An Giang đều có khả năng cố định đạm.
- Có 5/28 dòng vi khuẩn có khả năng tổng hợp  $\text{NH}_4^+$  rất cao bao gồm: dòng CA03, CA04, CA10, CA18 và CA29.
- Tuyển chọn được 3/5 dòng vi khuẩn có hoạt tính tốt đó là CA10, CA18 và CA29.
- Kết quả đánh giá hiệu quả các dòng vi khuẩn trên rau hành lá (*Allium fistulosum* sp.) và mồng tơi (*Basella alba* L.) cho thấy các dòng vi khuẩn có khả năng làm tăng độ phì nhiêu cho đất, giúp tăng chiều cao cây cũng như trọng lượng và năng suất.

##### 4.2 Đề nghị

- Đối với canh tác trên diện tích rộng, cần nhân giống cấp 3 các dòng vi khuẩn để tiết kiệm chi phí.
- Tiếp tục thí nghiệm, khảo sát hiệu quả các dòng vi khuẩn trên các loại rau khác nhau trên diện tích rộng, điều kiện sinh thái khác nhau đồng thời cần bổ trí thêm nhiều nghiệm thức để từ đó đề xuất công thức bón phân hợp lí cho từng đối tượng cụ thể.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cao Ngọc Diệp, 2008. *Giáo trình vi sinh vật chuyên sâu*, Trường Đại học Cần Thơ.
- Cao Ngọc Diệp, Lăng Ngọc Dậu và Nguyễn Thị Xuân My, 2007. Khả năng cố định đạm, hòa tan lân và sinh tổng hợp IAA của vi khuẩn *Azospirillum lipoferum*. *Tuyển tập báo cáo Khoa học Hội nghị toàn Quốc 2007 Nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống*. Quy Nhơn 10-08-2007. NXB KH-KT. trang 445- 448.
- Khan, A.A., G. Jilani, M.S. Akhtar. 2009. Phosphorus Solubilization Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. *Journal of Agriculture and Biology Science*. 1(1), pp.48-58.
- Neumann, B., A. Pospiech. and H.U. Schairrer, 1992. Rapid isolation of genomic DNA from Gram - negative bacteria. *Trends Gent*. 8, pp. 332-333.
- Nguyễn Ngọc Giàu, 2011. *Phân lập và nhận diện vi khuẩn hòa tan lân và kali trong vật liệu phong hóa từ đá granite núi Cẩm – An Giang*. Luận văn tốt nghiệp thạc sĩ khóa XVI.
- Nguyễn Thị Thu Hà, Hà Thanh Toàn và Cao Ngọc Diệp, 2009. Phân lập và đặc tính các dòng vi khuẩn nội sinh trong một số cây cỏ chăn nuôi. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 7(2), 241-250.
- Rodriguez, H. and R. Fraga, 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*.17, pp.319-339.
- Tilak, K.V.B.R., N. Ranganayaki and C. Manoharachari, 2006. Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*), *Journal of soil science*, 57, pp. 67-71.
- <http://ijs.sgmjournals.org/content/41/3/417.abstract>