

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
VIETNAM ACADEMY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

ISSN 1811-4989

TẠP CHÍ

CÔNG NGHỆ SINH HỌC

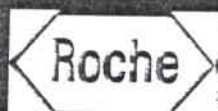
JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY

Tập (Volume) 8    Số đặc biệt (Special Number) 3A    2010

Hội nghị Toàn quốc về Khoa học sự sống



Bio-Hanoi 2010



Thanh Trị).

### Phân lập vi khuẩn cố định N

Môi trường phân lập vi khuẩn là môi trường đặc chủng *Pseudomonas isolation Agar* (Difco) (Mirza *et al.*, 2006).

Đất vùng rẫy sau khi để khô ở nhiệt độ phòng, dùng cối sứ nghiền mịn. Sau đó, cân 1 g mẫu đất cho vào bình tam giác với 99 ml nước cất đã được khử trùng, lắc 12 giờ với tốc độ 200 vòng/phút cho các hạt đất rời ra và vi khuẩn phân tán đều trong nước. Để lắng khoảng 3 giờ, lấy 0,1 ml dung dịch nước (phần trong) trải đều trên đĩa petri có môi trường *Pseudomonas isolation Agar* (2%) đã được chuẩn bị sẵn, để khô, ủ ở 30°C. Sau 24 – 48 h, khuẩn lạc mọc trên bề mặt môi trường được tiếp tục cấy chuyển sang môi trường mới vài lần đến khi các khuẩn lạc xuất hiện trên đường cấy rời nhau và quan sát đặc điểm khuẩn lạc (hình dạng, màu sắc, độ nổi, dạng bìa, kích thước). Kiểm tra độ rỗng bằng cách quan sát dưới kính hiển vi bằng phương pháp giọt ép. Khi thấy vi khuẩn đã rỗng (thuần nhất) thì cấy chuyển sang ống nghiệm chứa môi trường đặc tương ứng để trữ ở 4°C và được xem như một chủng (dòng) riêng biệt.

### Đánh giá khả năng cố định đạm của các dòng vi khuẩn

Vi khuẩn được nhân nuôi trong môi trường Burk lỏng không đạm từ 2 đến 8 ngày. Tiến hành đo lượng  $\text{NH}_4^+$  sinh ra từ các dòng vi khuẩn trên bằng phương pháp Phenol – Nitroprussid.

Chọn một dòng trong các dòng vi khuẩn có khả năng tổng hợp  $\text{NH}_4^+$  cao và đại diện cho những nơi thu mẫu để tiếp tục kiểm tra khả năng cố định đạm thông

qua xác định hoạt tính nitrogenase bằng phương pháp khử acetylene (acetylene reduction assay - ARA) (Dilworth, 1966).

### Tách chiết DNA và khuếch đại 16S-rDNA gen của vi khuẩn

DNA của các dòng vi khuẩn phát triển tốt trong môi trường Burk không N được trích theo quy trình của Neumann và đồng tác giả (1992), thực hiện các phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu PolF và PolR để khuếch đại gen *nif* theo quy trình của Poly và đồng tác giả (2001).

### Giải trình tự DNA

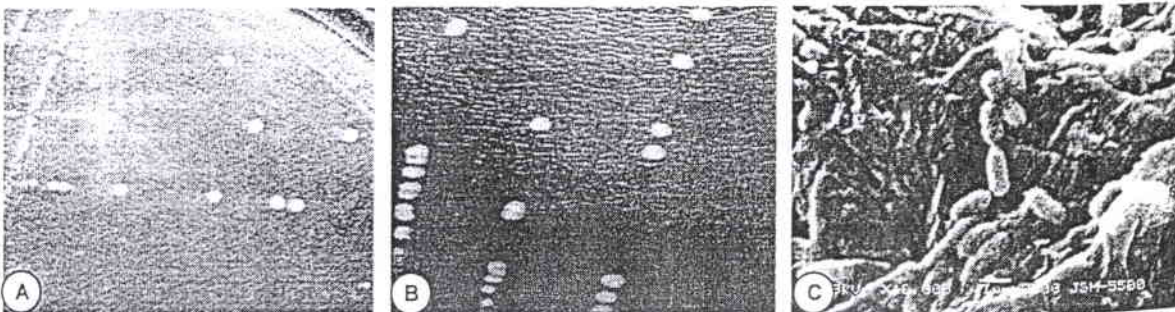
Chọn ngẫu nhiên 3 dòng vi khuẩn có gen *nif* để giải trình tự đoạn DNA bằng máy giải trình tự tự động ABI và sử dụng phần mềm BLAST N để so sánh trình tự ba dòng vi khuẩn này có trong ngân hàng dữ liệu NCBI, sử dụng phần mềm MEGA4.1 để xây dựng cây phả hệ.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Hình thái của vi khuẩn

Từ 27 mẫu đất vùng rẫy lúa tại 9 xã trong 3 huyện thuộc tỉnh Kiên Giang (huyện Hòn Đất, huyện Giồng Riềng, huyện Tân Hiệp), đã tiến hành phân lập được 74 dòng vi khuẩn trên môi trường đặc chủng *Pseudomonas isolation Agar* (Difco) (Mirza *et al.*, 2006).

Hầu hết các dòng vi khuẩn đều có khuẩn lạc màu trắng đục (một số ít có màu vàng) và có kích thước từ 0,5-1,5mm sau 2 ngày nuôi cấy (Hình 1A, B), tế bào vi khuẩn đều có dạng hình que ngắn (Hình 1C).



Hình 1. Một số khuẩn lạc (A, B) và tế bào vi khuẩn của dòng P11 (C)

### Khả năng tổng

Có 51 dòng phát triển tốt hành đo lượng bằng phương tổng số 51 dòng biệt hàm lượng dòng như dòng P11 (37,65m nghĩa thông k

### Hoạt tính nit

Chọn 10 dòng tổng hợp  $\text{NH}_4^+$  để tiếp tục kiểm định hoạt tính acetylene (ac (Dilworth, 1999 trong 10 dòng – 0,238mM) và có 1/10 dòng (0,195mM) và còn lại (Hình 2

### Nhận diện cá

Kết quả k



Hình 2. Hoạt tính

## PHÂN LẬP VÀ NHẬN DIỆN VI KHUẨN CỐ ĐỊNH ĐẠM TRONG ĐẤT VÙNG RỄ LÚA TRỒNG TRÊN ĐẤT PHỦ SA TỈNH KIÊN GIANG

Ngô Thanh Phong<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Minh Thu<sup>2</sup>, Cao Ngọc Diệp<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Trường THPT Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang

<sup>3</sup>Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

### TÓM TẮT

Năm mươi một dòng vi khuẩn cố định đạm được phân lập từ 27 mẫu đất trồng lúa của 3 huyện (Hòn Đất, Giồng Riềng, Tân Hiệp) của tỉnh Kiên Giang trong đó có 34/51 có khả năng cố định đạm cao [phát triển tốt trên môi trường Burk không N và khử acetylene (ARA)]. Có 22 dòng trong 34 dòng vi khuẩn có băng tương ứng 475 bp trong phổ điện di của các phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu của gen *nif* PolF và PolR; chọn ngẫu nhiên 3/22 dòng vi khuẩn để giải trình tự đoạn DNA bằng máy giải trình tự tự động ABI và sử dụng phần mềm BLAST N để so sánh trình tự ba dòng vi khuẩn này có trong ngân hàng dữ liệu NCBI, kết quả cho thấy dòng P33 có tỉ lệ đồng hình với vi khuẩn *Burkholderia vietnamiensis* AU0829 *nifH* gene và *Burkholderia vietnamiensis* LMG 16232 *nifH* gene là 99%, dòng P26 đồng hình với vi khuẩn *Burkholderia vietnamiensis* AU 0913 *nifH* gene và *Burkholderia vietnamiensis* AU 0749 *nifH* gene với tỉ lệ 98% và dòng P72 có mức đồng hình với vi khuẩn *Burkholderia kururiensis* KP23 *nifH* gene và vi khuẩn *Burkholderia brasiliense* M 130 *nifH* gene với tỉ lệ 97%.

Từ khóa: *Burkholderia*, cây lúa, cố định đạm sinh học, đất vùng rễ, vi khuẩn

### MỞ ĐẦU

Đạm là nguồn dinh dưỡng hàng đầu đối với cây lúa tuy nhiên khi bón phân đạm hóa học, chỉ có khoảng 50-60% lượng đạm bón vào trong đất được cây lúa hấp thu (Võ Minh Kha, 2003). Bón quá nhiều phân đạm hóa học sẽ dẫn đến chi phí cao, không những làm ô nhiễm môi trường mà còn gây tổn hại đến sức khỏe và hệ sinh thái. Hiện nay, các nhà khoa học tập trung nghiên cứu và sử dụng các dòng vi khuẩn cố định đạm sinh học. Do đó, nghiên cứu và tuyển chọn các dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm hữu hiệu bón cho cây lúa là góp phần nghiên cứu nguồn đạm sinh học và cần cho sự phát triển nông nghiệp bền vững.

Ở Việt Nam, có những nghiên cứu rất sớm về vi khuẩn cố định N như vi khuẩn nốt rễ cho cây đậu (Trần Phước Đường *et al.*, 1984) và luân canh đậu - lúa (Trần Phước Đường *et al.*, 1999) nhưng nghiên cứu về vi khuẩn sống trong rễ lúa chỉ có những cứu của Gillis và đồng tác giả (1995) phát hiện vi khuẩn *Burkholderia vietnamiensis* sống trong rễ lúa trồng ở Việt Nam. Sau đó, các nhà khoa học đã xác định được *Burkholderia vietnamiensis* là loài vi khuẩn có khả năng cố định đạm giúp tăng năng suất lúa (Trần Văn Vân *et al.*, 2000), tăng năng suất mía (Baldani *et*

*al.*, 2002). Ngoài ra, các loài *Burkholderia* có khả năng cố định đạm (Yabuuchi *et al.*, 1995) như *Burkholderia brasiliense*, *Burkholderia tropica* ở cây mía (Döbereiner *et al.*, 1993; Baldani, 1996; Baldani *et al.*, 2002), *Burkholderia kururiensis* (Zhang *et al.*, 2000), *Burkholderia brasiliense*, *Burkholderia tropicalis* ở khóm và chuối (Leonardo *et al.*, 2001), *Burkholderia unamae* sống nội sinh trong cây ngô (Caballero-Mellado *et al.*, 2004), *Burkholderia kururiensis* có thể xâm nhiễm rễ nội sinh ở rễ lúa (Mattos *et al.*, 2008) lần lượt được các nhà khoa học phát hiện.

Mục tiêu của đề tài là phân lập, nhận diện những loài vi khuẩn cố định đạm góp phần làm giàu nguồn vi khuẩn có ích để sản xuất phân sinh học cho cây lúa trong tương lai.

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Mẫu đất

Các mẫu đất vùng rễ lúa được thu thập các ruộng lúa tại 9 xã trong 3 huyện thuộc tỉnh Kiên Giang (huyện Hòn Đất: xã Mỹ Thuận, Mỹ Hiệp Sơn, Mỹ Phước; huyện Giồng Riềng: xã Ngọc Chúc, Ngọc Hòa, Ngọc Thành; huyện Tân Hiệp: xã Thạnh Đông, Thạnh An,

hương pháp  
y - ARA)

NA gen của

ốt trong môi  
y trình của  
ện các phân  
để khuếch  
tổng tác giả

gen *nif* để  
trình tự tự  
ST N để so  
trong ngân  
IEGA4.1 để

ong 3 huyện  
huyện Giồng  
lập được 74  
seudomonas

uẩn lạc màu  
kích thước  
1 A, B), tế  
Hình 1C).



### Khả năng tổng hợp $\text{NH}_4^+$ của các dòng vi khuẩn

Có 51 dòng vi khuẩn trong số 74 dòng có khả năng phát triển tốt trong môi trường Burk không nito. Tiến hành đo lượng  $\text{NH}_4^+$  sinh ra từ 51 dòng vi khuẩn trên bằng phương pháp Phenol - Nitroprusside, có 34 trong tổng số 51 dòng có khả năng tổng hợp  $\text{NH}_4^+$  tốt, đặc biệt hàm lượng  $\text{NH}_4^+$  tổng hợp được rất cao từ một số dòng như dòng P51 (62,09mg/l), P3 (42,57mg/l), P11 (37,65mg/l), P33 (29,37mg/l), khác biệt có ý nghĩa thống kê với các dòng vi khuẩn còn lại.

### Hoạt tính nitrogenase của các dòng vi khuẩn

Chọn 10 dòng trong 34 dòng vi khuẩn có khả năng tổng hợp  $\text{NH}_4^+$  cao và đại diện cho những nơi thu mẫu để tiếp tục kiểm tra khả năng cố định đạm thông qua xác định hoạt tính nitrogenase bằng phương pháp khử acetylene (acetylene reduction assay - ARA) (Dilworth, 1966; Hawkes, 2010). Kết quả cho thấy có 9 trong 10 dòng có hoạt tính nitrogenase cao (0,226mM - 0,238mM) và khác biệt không có ý nghĩa thống kê, chỉ có 1/10 dòng (P72) có hoạt tính nitrogenase thấp nhất (0,195mM) và khác biệt có ý nghĩa thống kê với 9 dòng còn lại (Hình 2).

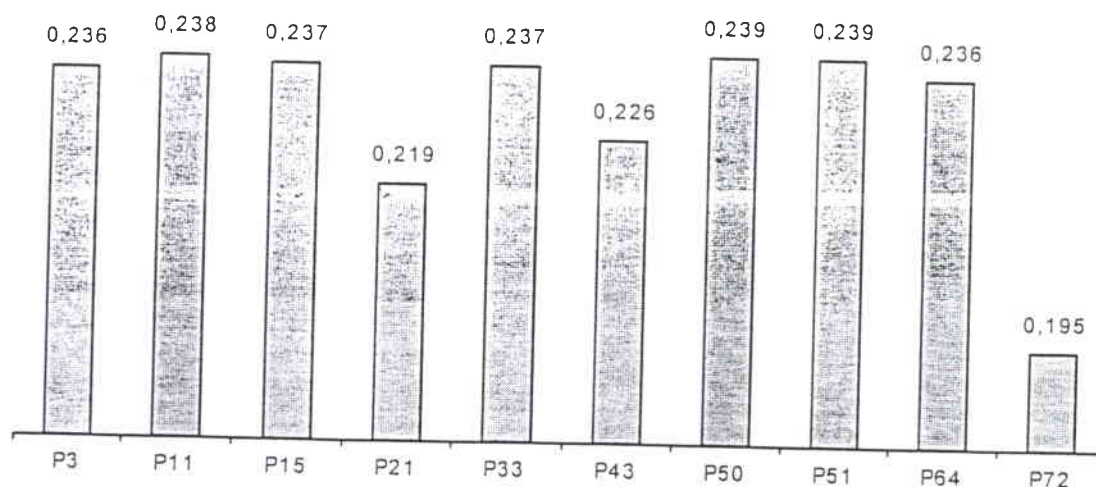
### Nhận diện các dòng vi khuẩn

Kết quả kiểm tra trên gel agarose 1% cho thấy có

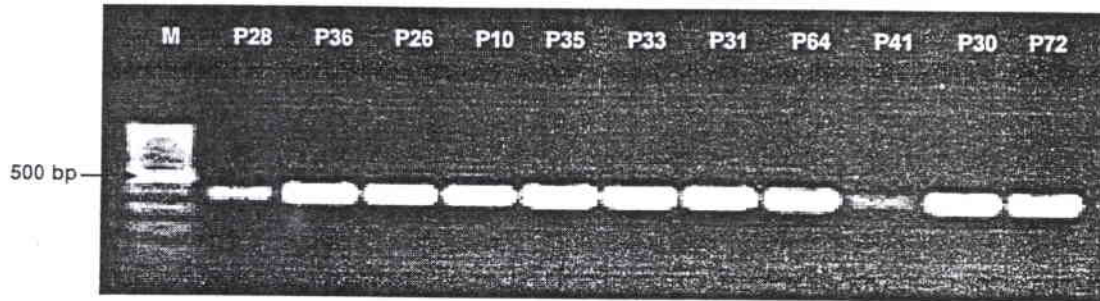
22 dòng có băng (band) tương ứng 475 bp là phù hợp với vị trí của gen *nif* (Poly et al., 2001) (Hình 3).

Chọn ngẫu nhiên 3 trong tổng số 22 dòng vi khuẩn có gen *nif* để giải trình tự đoạn DNA bằng máy giải trình tự tự động ABI và sử dụng phần mềm BLAST N để so sánh trình tự ba dòng vi khuẩn này với các dòng đã công bố trong ngân hàng gen dữ liệu NCBI, kết quả cho thấy dòng P33 có tỉ lệ đồng hình với vi khuẩn *Burkholderia vietnamiensis* AU0829 *nifH* gene và *Burkholderia vietnamiensis* LMG 16232 *nifH* gene là 99%, dòng P26 đồng hình với vi khuẩn *Burkholderia vietnamiensis* AU 0913 *nifH* gene và *Burkholderia vietnamiensis* AU 0749 *nifH* gene với tỉ lệ 98% và dòng P72 có mức đồng hình với vi khuẩn *Burkholderia kururiensis* KP23 *nifH* gene và vi khuẩn *Burkholderia brasiliense* M 130 *nifH* gene với tỉ lệ 97%.

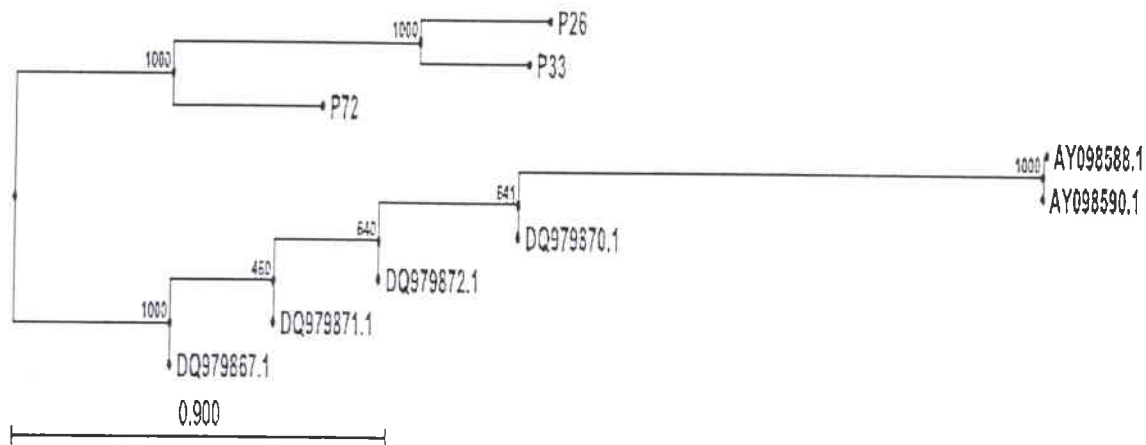
Dòng P26 và P33 có tương quan di truyền gần nhau và cả 2 dòng này cùng với dòng P72 tạo thành một nhóm riêng trên cây phát sinh chủng loại. Tuy nhiên, nhóm này cũng có tương quan di truyền gần với nhóm dòng *Burkholderia* đã công bố (*B. vietnamiensis* DQ979867.1; *B. vietnamiensis* DQ979870.1; *B. vietnamiensis* DQ979871.1; *B. vietnamiensis* DQ979872; *B. brasiliensis* AY098588.1; *B. kururiensis* AY098590.1) (Hình 4).



Hình 2. Hoạt tính nitrogenase (mM) của 10 dòng vi khuẩn.



Hình 3. Phổ điện di sản phẩm PCR được nhân lên từ DNA của các dòng vi khuẩn phân lập trong môi trường Burk không đạm (M: thang chuẩn 100 bp).



Hình 4. Cây phát sinh chủng loại (phylogenetic tree) theo kết quả so sánh trình tự nucleotide đoạn 16S-rDNA của 3 chủng vi khuẩn P26, P33, P72 và các chủng *Burkholderia* đã công bố (*B. vietnamiensis* DQ979867.1; *B. vietnamiensis* DQ979870.1; *B. vietnamiensis* DQ979871.1; *B. vietnamiensis* DQ979872.1; *B. brasiliensis* AY098588.1; *B. kururiensis* AY098590.1) thông qua phần mềm BLAST N và xử lý bằng phần mềm MEGA4.1

## KẾT LUẬN

Từ 27 mẫu đất vùng rễ lúa, phân lập được 74 dòng vi khuẩn và xác định 51 dòng vi khuẩn có khả năng phát triển tốt trên môi trường Burk không N và có khả năng tổng hợp  $\text{NH}_4^+$ , trong đó có 34 dòng tổng hợp  $\text{NH}_4^+$  cao. Nhận diện được 22 dòng có gen *nif* trong tổng số 34 dòng.

Mười trong số 34 dòng vi khuẩn tổng hợp  $\text{NH}_4^+$  cao cũng có khả năng tổng hợp nitrogenase thông qua kết quả thử hoạt tính của enzyme nitrogenase.

Dòng vi khuẩn P33 có tỉ lệ đồng hình với vi khuẩn *Burkholderia vietnamiensis* AU0829 *nifH*

gene và *Burkholderia vietnamiensis* LMG 16232 *nifH* gene là 99%, dòng P26 đồng hình với vi khuẩn *Burkholderia vietnamiensis* AU 0913 *nifH* gene và *Burkholderia vietnamiensis* AU 0749 *nifH* gene với tỉ lệ 98% và dòng P72 có mức đồng hình với vi khuẩn *Burkholderia kururiensis* KP23 *nifH* gene và vi khuẩn *Burkholderia brasiliensis* M 130 *nifH* gene với tỉ lệ 97%.

Lời cảm ơn: Các tác giả chân thành cảm ơn ThS. Quách Ngọc Truyền (Đại học Missouri, Hoa Kỳ) đã giúp phân tích và so sánh trình tự nucleotide xây dựng cây phả hệ (phát sinh) chủng loại (phylogenetic tree).

Caballero-Mella  
G. Santos PE (N<sub>2</sub>-fixing rhizobacteria). *International journal of Microbio*. 54: 11

Baldani VLD (Bacteria diazotrophic). *PhD thesis. Uni*

Baldani JI, Reis (2002) A brief review of reasons for success. 417-423.

Dilworth MJ (1995) N-fixing preparations. *Biochem. Biophys.*

Döbereiner J, R. (1995) Endophytic diazotrophic plants. *The Netherlands* 671-676.

Gillis M, Tran V, William A, Segel (1995) Polyphasic leading to an e-proposition of *B. N<sub>2</sub>-fixing isolate: Bacteriol* 45: 274-

Leonardo MC, Döbereiner J, Peco Characterization of Banana (*Musa spp* Merrill). *Applied* 2001, p. 2375-237

Mattos KA, Pádua Ulisses MU, Bar Mendonca-Previate rice (*Oriza sativa* *Burkholderia kururiensis* growth. *Anais da* 477-493.

# TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Caballero-Mellado J, Martinez-Aguilar L, Paredes-Valdez G, Santos PE (2004) *Burkholderia unamae* sp. var., an N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species. *International journal of Systematic and evolutionary Microbio.* 54: 1165-1172.
- Baldani VLD (1996) Caracterizac parcial de uma nova bacteria diazotrofica e endofitica do genero *Burkholderia*. PhD thesis. Uni. Federal Rual no Rio de Janeiro, Brazil.
- Baldani JI, Reis VM, Baldani VLD, Goi SR, Döbereiner J (2002) A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brasil. *Func. Plant. Biol.* 29: 417-423.
- Dilworth MJ (1966) Acetylene reduction by nitrogen fixing preparation from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Acta* 127:285-294.
- Döbereiner J, Reis VM, Paula MA, Olivares F (1993) Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereal and tuber plants. *The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.* 671-676.
- Gillis M, Tran Van V, Bardin R, Goor M, Hebbar P, William A, Segers P, Kersters, Heulin T, Fernandez MP (1995) Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int J Syst Bacteriol* 45: 274-289.
- Leonardo MC, Souza EM, Weber OB, Baldani JI, Döbereiner J, Pedrosa FO (2001) 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa spp.*) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril). *Applied and Environmental Microbiology*, May 2001, p. 2375-2379.
- Mattos KA, Pádua LM, Romeiro A, Hallack LF, Neves BC, Ulisses MU, Barros CF, Todeschini AR, Previato JO, Mendonca-Previato L (2008) Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the diazotrophic bacterium *Burkholderia kururiensis* and its ability to enhance plant growth. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 80(3): 477-493.
- Mirza S, Mehnaz MS, Normand P, Prigent-Combaret C, Moenne-Loccoz Y, Bally R, Malik KA (2006) Molecular characterization and PCR detection of a nitrogen-fixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth. *Biol Fertil Soils* 43:163-170.
- Neumann P, Pospiech A, Schairrer HU (1992) Rapid isolation of genome DNA from Gram negative bacteria. *Trends Genet* 8: 332-333.
- Poly F, Joteur ML, Bally R (2001) Improvement in RELP procedure to study the community of nitrogen fixers in soil through the diversity of *nifH* gene. *Res Microbiol* 152:95-103.
- Tran Phuoc Duong, Cao Ngoc Diep, Nguyen Tri Khiem, Nguyen Huu Hiep, Nguyen Van Toi, Nguyen Van Lich, Le Thi Kieu Nhan (1984) *Rhizobium* inoculant for soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in Mekong Delta. I. Response of soybean to *Rhizobium* inoculant. *Plant and Soil* 79: 235-240.
- Tran Phuoc Duong, Cao Ngoc Diep, Vo Huy Dang, Nguyen Huu Hiep, Tong Huu Thuan (1999) Evaluation of Nitrogen fixation by soybean-Rhizobium symbiosis on rotation cropping system soybean-rice using <sup>15</sup>N technique. *Proceedings of Applied Nuclear technique conference at Dalat* from 14-15 March, 1999.
- Tran Van V, Berge O, Ngo Ke S, Balandreau J, Heulin T (2000) Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid of Vietnam. *Plant Soil* 218:273-284.
- Võ Minh Kha (2003) Sử dụng phân bón phối hợp cân đối (nguyên lý và giải pháp). *Nhà xuất bản Nghệ An*, Việt nam.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y (1995) Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gene nov. Proposal of *Ralstonia pickettii*. *Microbiol Immunol* 39: 897-904.
- Zhang H, Hanada S, Shigematsu T, Shibuya K, Kamagata Y, Kanagawa T, Kuran R (2000) *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50:743-9.