

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH CÁC ĐÒNG VI KHUẨN CÓ ĐỊNH ĐẠM VÙNG RỄ LÚA CÁC TỈNH ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Nguyễn Thị Pha¹, Trần Đình Giỏi² và Nguyễn Hữu Hiệp¹

¹ Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

² Viện Lúa Đồng bằng Sông Cửu Long, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 24/10/2014

Ngày chấp nhận: 09/06/2015

Title:

Isolation, selection and taxonomic identification of Nitrogen-fixing bacteria group in the soil of rice rhizosphere in the Mekong Delta

Từ khóa:

Đất phù sa, đất mặn, điều kiện nhà lưới, vi khuẩn cố định đạm, vi khuẩn vùng rễ lúa

Keywords:

Alluvial soil, nethouse condition, nitrogen-fixing bacteria, rhizospheric bacteria, salinity soil, taxonomic identification

ABSTRACT

The experiment was carried out with the aims of isolation, selection and taxonomic identification of nitrogen-fixing bacteria strains in the rice rhizosphere soil from 02 different categories of land in the Mekong Delta provinces (alluvial soils and salinity soils). Nitrogen-fixing bacteria from rice rhizosphere soil were isolated in the Burk medium without nitrogen mineral supplement. The NH_4^+ synthesis of these bacterial strains after biomass multiplication was determined by Indophenol Blue method. Bacterial strains with high NH_4^+ compounds in the cultural medium were used to select the best strains through the ability to provide nitrogen fertilizer for rice plants cultivated in Yoshida nutrient medium without nitrogen mineral in a laboratory conditions. Bacterial strains with good results in the laboratory condition were tested in pots in a greenhouse conditions. The results showed that 8 bacterial strains help rice seedling grow well in the laboratory condition; 02 bacterial strains on each ecological region could replace 25-50% nitrogen supplied in the greenhouse conditions consisted of AM3, TV2B7 (saline soil), and CTB3 and CTIN2 (alluvial soil). Based on the results of molecular biology technique and biochemical tests, strains AM3, TV2B7, CTIN2 and CTB3 were closest genetic relationship with *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus megaterium*, *Ideonella* sp. and *Serratia marcescens*.

TÓM TẮT

Đề tài đã thực hiện phân lập, tuyển chọn và định danh các dòng vi khuẩn cố định đạm cao từ mẫu đất vùng rễ lúa thu thập ở Đồng bằng sông Cửu Long với 02 sinh thái là đất phù sa và đất mặn. Vi khuẩn được phân lập trên môi trường Burk không đạm, sau đó nhân sinh khối và xác định hàm lượng NH_4^+ bằng phương pháp Indophenol Blue. Các dòng vi khuẩn có hàm lượng đạm cao nhất được sử dụng để tuyển chọn các dòng tốt nhất qua khả năng cung cấp đạm cho cây lúa trong điều kiện phòng thí nghiệm. Các dòng vi khuẩn cho kết quả tốt nhất trong điều kiện phòng thí nghiệm tiếp tục khảo sát khả năng cung cấp đạm cho cây lúa ở điều kiện nhà lưới. Kết quả tuyển chọn xác định được 8 dòng vi khuẩn có tác động tốt đến cây lúa ở điều kiện phòng thí nghiệm và 02 dòng vi khuẩn của mỗi vùng sinh thái có khả năng thay thế từ 25-50% phân đạm cho cây lúa trồng trong chậu ở nhà lưới, gồm AM3, TV2B7 (đất mặn), CTIN2 và CTB3 (đất phù sa). Định danh các dòng vi khuẩn này, xác định được chúng có quan hệ gần nhất theo thứ tự với các loài: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus megaterium*, *Ideonella* sp. và *Serratia marcescens*.

1 GIỚI THIỆU

Sản xuất lúa ở Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) chủ yếu sử dụng phân bón hóa học, làm tăng giá thành sản phẩm, giảm hiệu quả sử dụng

phân bón và gây ô nhiễm môi trường. Theo Võ Minh Kha (2003) cây lúa chỉ sử dụng được từ 50–60% lượng phân bón vào, phần còn lại bị cố định ở trong đất, thất thoát do bị rửa trôi, phân đạm hóa và

bay hơi vì thế gây ô nhiễm môi trường. Phân bón vi sinh là một giải pháp sản xuất nông nghiệp bền vững ngày càng được quan tâm nhiều hơn. Vi khuẩn nội sinh và vi khuẩn vùng rễ lúa có khả năng cố định đạm cũng đã được khá nhiều tác giả công bố (Menard *et al.*, 2007...). Tuy nhiên, ứng dụng vi sinh vật cố định đạm trong canh tác lúa thì còn nhiều hạn chế. Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả cố định đạm của vi sinh vật trên ruộng lúa còn chưa được hiểu rõ. Kết quả thực tế cho thấy tính hiệu quả của vi khuẩn phụ thuộc rất nhiều vào tương tác vi khuẩn - cây chủ cũng như điều kiện sinh thái của môi trường (Rao and Rao, 1985). Nghiên cứu này thực hiện với mục tiêu phân lập, tuyển chọn và định danh các dòng vi khuẩn cố định đạm vùng rễ lúa bằng các đặc trưng hình thái, đặc điểm sinh lý và sinh hóa, kết hợp với giải trình tự vùng gen 16S rDNA so sánh với ngân hàng gen NCBI, làm cơ sở cho sản xuất phân bón vi sinh phục vụ cho canh tác lúa.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nội dung nghiên cứu

Phân lập vi khuẩn vùng rễ lúa trên hai loại đất của vùng ĐBSCL bao gồm đất phù sa và đất nhiễm mặn, trên môi trường phân lập chuyên biệt dành cho vi khuẩn cố định đạm. Khảo sát khả năng cố định đạm bằng phương pháp đo hàm lượng NH_4^+ trong dịch nuôi. Các dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm cao được tuyển chọn trong điều kiện phòng thí nghiệm, nhà lưới thông qua hiệu quả tác động của vi khuẩn trên giống lúa OM 6976 và định danh các dòng vi khuẩn trên vong bằng phương pháp giải trình tự vùng gen 16S rDNA kết hợp khảo sát các đặc tính sinh lý, sinh hóa.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phân lập và kiểm tra khả năng cố định đạm của vi khuẩn vùng rễ lúa

Mẫu đất và môi trường nuôi cấy

Mẫu đất vùng rễ lúa được thu từ 4 tỉnh, thành thuộc ĐBSCL đại diện cho hai vùng sinh thái khác nhau bao gồm: Vĩnh Long và Cần Thơ (đất phù sa), Trà Vinh và Kiên Giang (đất nhiễm mặn). Mỗi tỉnh/thành phố chọn ngẫu nhiên 3-5 huyện (quận) mỗi huyện (quận) chọn 1-3 xã, mỗi xã chọn 1-5 ruộng đang trồng lúa. Nhổ 5 cây lúa (1 đến 2 tháng tuổi) trên mỗi ruộng. Dùng tay tách nhẹ phần đất bám quanh rễ cho vào túi nylon ghi nhãn (khoảng 400 g/mẫu) và mang về phòng thí nghiệm để phân lập. Môi trường phân lập vi khuẩn là Burk không đạm gồm: Sucrose (10 g/l), KH_2PO_4 (0,41 g/l), K_2HPO_4 (0,52 g/l), NaSO_4

(0,05 g/l), CaCl_2 (0,2 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/l), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,005 g/l), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,0025 g/l), Agar (18g/l).

Phân lập vi khuẩn: Cân 10 g mẫu đất, thêm 90 ml nước cất vô trùng, cho vào bình tam giác đã khử trùng, khuấy trộn đều mẫu bằng máy khuấy từ trong 2 giờ, để yên 1 giờ, sau đó pha loãng mẫu theo dãy số thập phân $10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$... Dùng micropipet hút 50 μl mẫu (ở các nồng độ) nhỏ lên đĩa thạch chứa môi trường Burk không đạm đã chuẩn bị (mỗi nồng độ 3 đĩa). Dùng que thủy tinh vô trùng trải đều mẫu lên mặt môi trường, đẩy nắp đĩa lại để trong vài phút sau đó úp ngược đĩa, ủ trong tủ ủ ở 30°C. Chọn ra các khuẩn lạc rời và khác nhau về màu sắc, hình dạng và kích thước, cấy chuyển nhiều lần theo phương pháp cấy ria trên các đĩa có môi trường phân lập và quan sát dưới kính hiển vi để xác định độ rỗng của vi khuẩn.

Kiểm tra khả năng cố định đạm của các dòng vi khuẩn: Vi khuẩn cố định đạm có thể phát triển trên môi trường không đạm do chúng có khả năng tổng hợp đạm từ không khí. Những dòng vi khuẩn có khả năng phát triển tốt được tuyển chọn và nuôi trong môi trường Burk lỏng để đo nồng độ amonium trong dịch nuôi bằng phương pháp Indophenol Blue.

2.2.2 Tuyển chọn các dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm cao

Tuyển chọn các dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm cao cho cây lúa trồng trong dung dịch Yoshida (Yoshida *et al.*, 1976) ở giai đoạn mạ.

Chọn các dòng vi khuẩn phân lập từ mỗi vùng sinh thái có hàm lượng NH_4^+ trong dịch nuôi cao nhất để khảo sát khả năng cung cấp đạm cho cây lúa giai đoạn mạ trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Quy trình thực hiện:

Nuôi sinh khối các dòng vi khuẩn được chọn và chuẩn về mật số 10^7 CFU/ml trước khi chủng vào cây mạ. Chủng vi khuẩn vào cây mạ bằng cách ngâm mạ (5 ngày tuổi) trong dung dịch vi khuẩn (trong 2 giờ). Mẫu đối chứng chỉ xử lý với nước cất đã khử trùng. Sau đó, chuyển cây mạ sang bình thủy tinh chứa 100 g cát sạch làm giá thể (cát được rửa sạch và khử trùng) có bổ sung 50 ml môi trường Yoshida không đạm (loại bỏ NH_4NO_3)/binh. Nghiệm thức ĐC+ sử dụng môi trường Yoshida có đạm. Khi cấy xong, đặt các bình (không đậy nắp) cho phát triển bình thường ở điều kiện phòng thí nghiệm, cường độ ánh sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ sáng 8 giờ tối. Theo dõi và bổ sung môi trường Yoshida tương ứng khi cây hút cạn (bổ sung bằng nhau cho các NT).

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại với 10 nghiệm thức. Giống lúa sử dụng là OM6976 được cung cấp bởi Viện lúa ĐBSCL. Đây là giống lúa có khả năng chống chịu mặn 3-4 ‰, giàu sắt (từ 6-8mg/kg), góp phần giảm bớt tỷ lệ người bị các bệnh liên quan đến thiếu sắt. Sau 20 ngày trồng lúa, ghi nhận 02 chỉ tiêu gồm: Chiều cao cây mạ (cm) và khối lượng chất khô (KLCK): sấy ở 50°C đến khi khối lượng không đổi, cân và ghi nhận kết quả (mg).

Tuyển chọn các dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm cao cho cây lúa trồng trong chậu

Chọn các dòng vi khuẩn có hiệu quả cao nhất ở giai đoạn mạ để khảo sát khả năng thay thế phân đạm hóa học cho cây lúa trồng trong chậu. Đất trồng lúa được thu ở các địa điểm đại diện cho từng vùng sinh thái. Đất được phân tích một số chỉ tiêu như N, P, K, EC, sa cấu... tại bộ môn khoa học đất thuộc khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng và có các đặc tính cơ bản như sau: Đất phù sa thuộc loại đất cát pha thịt có hàm lượng N, P, K nghèo hơn loại đất phù sa khu vực ĐBSCL theo mô tả của Trần Minh Tiến và ctv. (2013) (đất thu ở quốc lộ 91B đường Nguyễn Văn Linh, TP. Cần Thơ). Đất mặn thuộc loại đất sét pha thịt, các thành phần dinh dưỡng như P, K thấp, hàm lượng N khác biệt không có ý nghĩa với đặc tính của đất mặn thuộc vùng ĐBSCL theo mô tả của Trần Minh Tiến và ctv. (2013) và có EC bão hòa là 12,6 (mS/cm) (đất thu ở Ấp Lạc Thanh A, xã Thanh Hòa Sơn, Huyện Cầu Ngang, Tỉnh Trà Vinh). Đất được phơi khô và cho vào chậu, khoảng hơn nửa chậu (diện tích chậu đất là 0,08 m²), cho nước vào ngâm mềm đất. Trước khi trồng lúa 1-2 ngày tiến hành bón lót phân lân (dạng đơn) cho đất. Mạ sau khi chùng với các dòng vi khuẩn được cấy vào chậu theo các nghiệm thức tương ứng, mỗi chậu 2 cây. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại với 18 nghiệm thức gồm 4 dòng vi khuẩn cho mỗi vùng sinh thái kết hợp với các mức phân bón 0%, 25%, 50% và 75% phân đạm hóa học trên nền phân bón theo công thức 100-40-30 kg/ha (N-P₂O₅-K₂O) cho vụ Đông Xuân so sánh với ĐC+ bón đầy đủ phân đạm, không chủng vi khuẩn và ĐC- không bón phân đạm, không chủng vi khuẩn. Các chỉ tiêu theo dõi gồm: Khối lượng khô rơm (gram/bụi); Khối lượng khô hạt/bụi (g/bụi, quy về ẩm độ 14%).

2.2.3 Định danh các dòng vi khuẩn có hiệu quả cung cấp đạm cao cho cây lúa

Các dòng vi khuẩn cho hiệu quả tốt nhất với cây lúa trồng trong chậu được định danh bằng giải

trình tự vùng gen 16S rDNA kết hợp khảo sát một số đặc tính sinh lý, sinh hóa: phản ứng catalase: sử dụng H₂O₂; Khả năng làm đổi màu môi trường NFB; Khả năng sinh trưởng trên các nguồn carbon khác nhau (môi trường Burk không đạm được thay thế các nguồn carbon khác nhau bao gồm sucrose, D- glucose, D- fructose, maltose, mannose, manitol, chitin); Khả năng cố định đạm kháng nấm *Pyricularia oryzae*; Thử hoạt tính nitrogenase bằng phương pháp khử acetylene (ARA) tại phòng thí nghiệm chuyên sâu.

Giải trình tự vùng gen 16S rDNA

Giải trình tự sản phẩm PCR vùng gen 16S rDNA bằng cặp mồi tổng 27F và 1495R có trình tự 27F: 5' GAGAGTTTGTACCTGGCTCAG 3'; 1495R: 5'CTACGGCTACCTTGTACGA 3' (Weisberg *et al.*, 1991) đọc theo chiều mũi xuôi, tại Phòng Sinh học Phân tử, Viện NCPTCNSH, Trường ĐH Cần Thơ và Công ty Macrogen (Hàn Quốc), so sánh trình tự với ngân hàng gen NCBI sử dụng chương trình BLASTN để xác định quan hệ di truyền các dòng vi khuẩn tuyển chọn với các loài vi khuẩn tương ứng trên ngân hàng gen.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập và kiểm tra khả năng cố định đạm của vi khuẩn vùng rễ lúa

Kết quả phân lập vi khuẩn vùng rễ cố định đạm

Từ 114 mẫu đất vùng rễ lúa của 4 tỉnh, thành để tài đã phân lập được tổng cộng là 290 dòng vi khuẩn. Trong đó sinh thái đất phù sa gồm thành phố Cần Thơ và tỉnh Vĩnh Long có 112 dòng. Hai tỉnh Kiên Giang và Trà Vinh với sinh thái đất nhiễm mặn có 178 dòng vi khuẩn. Trung bình từ một mẫu đất/ruộng phân lập được từ 1 đến 3 dòng vi khuẩn khác nhau.

Kiểm tra khả năng tổng hợp NH₄⁺ của các dòng vi khuẩn phân lập

Tất cả 290 dòng vi khuẩn được khảo sát hàm lượng NH₄⁺ trong dịch nuôi bằng phương pháp so màu Indophenol Blue sau khi tiến hành nuôi trong môi trường Burk lỏng không đạm sau 2, 4, và 6 ngày. Nồng độ NH₄⁺ trong dịch nuôi trung bình qua 3 thời điểm khảo sát từ 0,02 – 4,32 mg/l, trong đó 20 dòng có nồng độ NH₄⁺ trong dịch nuôi cao nhất phân lập từ mỗi vùng sinh thái được chọn để phân tích thống kê nhằm tuyển chọn các dòng có khả năng cố định đạm cao cho thực hiện các thí nghiệm tiếp theo. Kết quả thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1: Hàm lượng NH₄⁺ của các dòng vi khuẩn tổng hợp được ở hai vùng sinh thái

Stt	Vi khuẩn vùng phù sa	Hàm lượng NH ₄ ⁺ TB (mg/l) vùng mặn	Vi khuẩn vùng	Hàm lượng NH ₄ ⁺ TB (mg/l)
1	CT1.21c	4,32 ^a	TV2B7	2,21 ^a
2	CT1.N2	3,52 ^b	AM3	1,76 ^b
3	CT1.N3	2,67 ^c	TV1	1,72 ^b
4	CT1.73	2,66 ^d	TV58	1,72 ^b
5	CTB3	2,47 ^e	TV112	1,70 ^b
6	CT1.N1	2,26 ^f	TV92	1,56 ^c
7	VL2.27	2,11 ^g	TV107	1,48 ^d
8	VL1.17b	2,01 ^h	TV109	1,38 ^{de}
9	CT3	1,87 ⁱ	TV53	1,2 ^{ef}
10	VL20	1,86 ^{ij}	TV63	1,16 ^{fg}
11	CT24	1,81 ^{ijk}	TV57	1,11 ^{fgh}
12	CT36	1,80 ^{kl}	TV90	1,09 ^{fgh}
13	CT13	1,78 ^{kl}	TV72	1,08 ^{fgh}
14	VL29	1,74 ^{klm}	TV62	1,06 ^{fgh}
15	VL21	1,73 ^{lm}	TV103	1,01 ^{fghi}
16	CT19	1,68 ^{mn}	TV68	0,99 ^{ghi}
17	VL25	1,62 ^{no}	TV83	0,95 ^{hi}
18	VL2	1,55 ^{op}	TV81	0,94 ^{hi}
19	VL8	1,51 ^p	TV96	0,85 ⁱ
20	VL18	1,48 ^p	TV2	0,84 ⁱ
F		820,36 ^{**}		31,3 ^{**}
CV (%)		2,05		9,06

Ghi chú: ** là có sự khác biệt có ý nghĩa khi phân tích phương sai sự biến động của các chỉ tiêu theo dõi ở mức 1%. Các giá trị trong cùng một cột đi theo cùng một ký tự là khác biệt không có ý nghĩa thống kê

Từ kết quả phân tích thống kê ở Bảng 1 chọn được 08 dòng vi khuẩn từ vùng phù sa gồm

Bảng 2: Ảnh hưởng của các dòng vi khuẩn đến chiều cao cây và khối lượng chất khô của cây lúa OM 6976 giai đoạn 20 ngày tuổi

Stt	Vùng đất phù sa			Vùng đất mặn		
	Dòng VK	Cao cây (cm)	KLCK (mg)	Dòng VK	Cao cây (cm)	KLCK (mg)
1	CT1N1	20,6 ^{bc}	25,97 ^{de}	TV58	22,2 ^a	38,23 ^a
2	CT1N2	21,0 ^{bc}	33,61 ^a	AM3	20,2 ^{ab}	36,50 ^a
3	CT1N3	20,6 ^{bc}	33,60 ^a	TV112	19,2 ^b	33,43 ^b
4	CTB3	21,8 ^b	30,31 ^b	TV2B7	18,4 ^b	25,73 ^c
5	CT1.73	18,0 ^d	26,59 ^{cd}	TV109	20,2 ^{ab}	22,23 ^d
6	CT1.21c	24,2 ^a	26,01 ^{de}	TV107	18,9 ^b	21,73 ^{de}
7	VL1.17b	20,8 ^{bc}	24,33 ^c	TV1	18,0 ^b	20,27 ^{ef}
8	VL2.27	21,1 ^{bc}	28,13 ^c	TV92	18,2 ^b	20,13 ^{ef}
9	ĐC+	19,7 ^{cd}	25,96 ^{de}	ĐC+	21,5 ^a	26,53 ^c
10	ĐC-	15,8 ^e	17,12 ^f	ĐC-	14,8 ^c	19,37 ^f
F		11,32 ^{**}	70,51 ^{**}		7,55 ^{**}	139,77 ^{**}
CV(%)		5,64	3,64		6,82	3,95

Ghi chú: ** là có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Các giá trị trong một cột có ít nhất 1 trong các chữ a, b, c giống nhau là khác biệt không có ý nghĩa thống kê. VK: vi khuẩn, KLCK: khối lượng chất khô

CT1.21c, CT1.N2, CT1.N3, CT1.73, CTB3, CT.N1, VL2.27, VL1.17b; 08 dòng vi khuẩn từ vùng đất mặn là TV2B7, AM3, TV1, TV58, TV112, TV92, TV107, TV109, có hàm lượng NH₄⁺ trung bình cao hơn, khác biệt có ý nghĩa thống kê với các dòng vi khuẩn còn lại.

3.2 Tuyển chọn các dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm cao cho canh tác lúa

Tuyển chọn các dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm cao cho cây lúa trồng trong dung dịch Yoshida ở giai đoạn mạ

Các dòng vi khuẩn chọn được dựa vào nồng độ NH₄⁺ trong dịch nuôi ở Bảng 2 được tiếp tục khảo sát khả năng cung cấp đạm cho cây lúa OM6976 trồng trong dung dịch Yoshida ở giai đoạn mạ. Kết quả được tổng hợp trong Bảng 2.

Kết quả phân tích thống kê các chỉ tiêu sinh trưởng của cây lúa OM6976 ở giai đoạn mạ 20 ngày tuổi (Bảng 2) cho thấy, chiều cao cây và khối lượng chất khô của các nghiệm thức ở cả 2 vùng sinh thái có sự khác biệt có ý nghĩa ở mức 1%.

Chiều cao cây: Chiều cao cây giữa 2 NT đối chứng ở cả 2 vùng sinh thái đều có sự khác biệt có ý nghĩa với nhau, trong đó ĐC- cho chiều cao cây thấp ở vùng đất phù sa (15,8 cm), vùng đất mặn (14,8 cm), khác biệt với các NT ĐC+ tương ứng (19,7 cm và 22,3 cm) và tất cả các NT còn lại. Các NT có chủng các dòng vi khuẩn cho chiều cao cây cao hơn hoặc khác biệt không có ý nghĩa với ĐC+ là tất cả các dòng vi khuẩn ở vùng đất phù sa và các dòng TV58, AM3, TV109 ở vùng đất mặn.

Khối lượng chất khô: Đây là chỉ tiêu quan trọng cho biết khả năng cung cấp đạm của các dòng vi khuẩn giúp cây lúa phát triển vì đạm là thành phần chính cấu tạo nên khối lượng chất khô. Kết quả Bảng 2 cho thấy: khối lượng chất khô của 2 NT đối chứng ở cả 2 vùng sinh thái có sự khác biệt có ý nghĩa với nhau, trong đó các NT ĐC- cũng cho KLCK thấp nhất ở vùng đất phù sa (17,12 mg), đất mặn (19,37 mg) và khác biệt có ý nghĩa với tất cả các NT còn lại ở vùng đất phù sa, vùng mặn. Các NT có KLCK cây mạ cao hơn hoặc khác biệt không ý nghĩa so với ĐC+ ở vùng đất phù sa là các nghiệm thức cùng với các dòng vi khuẩn CT1N2, CT1N3, CTB3 và VL2.27; ở vùng đất mặn là TV58, AM3, TV112 và TV2B7.

Tuyển chọn các dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm cao cho cây lúa trồng trong chậu

Bốn dòng vi khuẩn tuyển chọn ở mỗi vùng sinh thái bao gồm CT1N2, CT1N3, CTB3 và VL2.27 (đất phù sa); TV58, AM3, TV112 và TV2B7 (đất mặn) được sử dụng để khảo sát khả năng thay thế phân đạm hóa học đối với giống lúa OM6976 trồng trong chậu. Kết quả khảo sát các chỉ tiêu khối lượng khô rơm và năng suất hạt/bụi ở cả 2 vùng sinh thái thể hiện ở Bảng 3.

Khối lượng khô rơm/bụi (g): Ở vùng sinh thái đất phù sa, khối lượng khô rơm (KLKR) cao nhất là ở NT bón 75%N cùng dòng CTB3 (53,7 g/bụi) và thấp nhất là ĐC- (11,7 g/bụi). Có 5 NT cho KLKR khác biệt không có ý nghĩa so với ĐC+ (48,6 g/bụi) bao gồm: 75-CTB3 (53,7 g/bụi), 75-CT1N2 (46,8 g), 50-CTB3 (45,8 g/bụi), 75-CT1N3 (44,8 g) và 75-VL2.27 (43,7 g). Ở các NT cùng vi khuẩn và không bón đạm chỉ có dòng vi khuẩn CTB3 là cho KLKR cao hơn (24,7 g) khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với ĐC-. Bốn NT ở vùng đất mặn bao gồm: 50-AM3, 75-AM3, 75-TV2B7, 75-TV58 có KLKR dao động từ 20,4-23,9 g/bụi khác biệt không có ý nghĩa so với ĐC+ (24,1 g). Ở các NT không bón đạm có cùng vi khuẩn, chỉ có 2 NT cùng 2 dòng vi khuẩn là AM3 và TV2B7 là có KLKR cao (12,9 g và 10,9 g), khác biệt có ý nghĩa so với ĐC- (5,8 g).

Khối lượng hạt/bụi (g/bụi): Đây là chỉ tiêu chính đánh giá hiệu quả cung cấp đạm của các dòng vi khuẩn. Ở vùng đất phù sa, có 4 NT đạt khối lượng hạt/bụi (NS bụi) cao hơn hoặc khác biệt không có ý nghĩa với ĐC+ (27,38 g/bụi), gồm CT1N2-75%N (31,29 g/bụi) CT1N2-50%N (29,45 g/bụi), CTB3-75%N (28,48 g/bụi) và CTB3-50%N (25,00 g/bụi). Ở vùng đất mặn có 5/16 NT là 50-AM3, 75-AM3, 50-TV2B7, 75-TV2B7 và 75-

TV112 có NS bụi dao động từ 13,62-14,76 g/bụi, khác biệt không có ý nghĩa so với ĐC+ (14,9 g/bụi). Xét ở từng mức phân bón, khả năng thay thế phân đạm hóa học của các dòng vi khuẩn như sau:

Bảng 3: Hiệu quả cố định đạm của các dòng vi khuẩn tuyển chọn từ các vùng sinh thái đến khối lượng khô rơm và năng suất của giống lúa OM6976 trồng trong chậu

Nghiệm thức (N-VK)	Vùng đất phù sa		Vùng đất mặn	
	KL rơm/bụi (g)	Năng suất (g/bụi)	KL rơm (g/bụi)	Năng suất (g/bụi)
0-VK1	18,1 ^{gh}	13,30 ^{gh}	13,0 ^{e-h}	10,62 ^{efg}
25-VK1	29,8 ^{ef}	24,53 ^d	16,0 ^{e-f}	12,03 ^{cde}
50-VK1	35,5 ^{de}	29,45 ^{ab}	21,7 ^{ab}	13,77 ^{abc}
75-VK1	46,8 ^{ab}	31,29 ^a	21,9 ^{ab}	13,85 ^{abc}
0-VK2	14,3 ^h	5,62 ⁱ	6,8 ^{ij}	6,56 ^j
25-VK2	23,3 ^{fg}	11,55 ^h	13,2 ^{e-h}	8,24 ^{hij}
50-VK2	34,3 ^{de}	19,08 ^f	17,4 ^{b-e}	12,86 ^{bcd}
75-VK2	44,8 ^{bc}	21,94 ^e	18,5 ^{bed}	14,76 ^{ab}
0-VK3	24,7 ^{fg}	15,17 ^g	9,2 ^{hij}	7,07 ^{ij}
25-VK3	28,4 ^{ef}	11,34 ^h	11,1 ^{f-i}	7,47 ^{hij}
50-VK3	45,8 ^b	25,00 ^{cd}	15,2 ^{d-g}	10,98 ^{def}
75-VK3	53,7 ^a	28,48 ^b	23,9 ^a	11,81 ^{cde}
0-VK4	18,8 ^{gh}	5,97 ⁱ	10,9 ^{ghi}	8,73 ^{ghi}
25-VK4	29,8 ^{ef}	17,71 ^f	13,2 ^{e-h}	9,28 ^{fgh}
50-VK4	38,0 ^{cd}	18,16 ^f	17,5 ^{b-e}	13,62 ^{abc}
75-VK4	43,7 ^{bc}	24,37 ^d	20,4 ^{abc}	14,60 ^{ab}
ĐC-	11,7 ^h	4,67 ⁱ	5,8 ^j	2,69 ^k
ĐC+	48,6 ^{ab}	27,38 ^{bc}	24,1 ^a	14,96 ^a
F	25,12 ^{**}	104,74 ^{**}	10,01 ^{**}	23,28 ^{**}
CV (%)	13,40	7,51	19,73	11,49

*Ghi chú: ** là có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Các giá trị trong một cột có ít nhất 1 trong các chữ a, b, c giống nhau là khác biệt không có ý nghĩa thống kê.; Các dòng vi khuẩn vùng phù sa: VK1: CT1N2, VK2:CT1N3, VK3: CTB3 và VK4: VL2.27; Vùng mặn: VK1: AM3, VK2: TV112, VK3: TV58 và VK4: TV2B7*

Ở các NT không bón đạm (0%N) và cùng các dòng vi khuẩn, có 2 dòng vi khuẩn phân lập từ vùng đất phù sa cho NS bụi cao hơn khác biệt có ý nghĩa thống kê với ĐC- (4,67 g/bụi) gồm CT1N2 (13,30 g/bụi) và CTB3 (15,17 g/bụi). Các dòng vi khuẩn của vùng đất mặn lại cho hiệu quả rất tốt khi cả 4 dòng đều cho NS bụi cao hơn (6,56 10,62 g/bụi), khác biệt có ý nghĩa so với ĐC- (2,69 g); ở mức phân bón 25%N, tất cả các NT cùng các dòng vi khuẩn ở cả 2 vùng sinh thái đều cho NS bụi cao hơn ĐC- nhưng không có dòng nào cho năng suất cao hơn hoặc khác biệt không có ý nghĩa với ĐC+; ở mức phân bón 50%N, mỗi vùng sinh thái đều có 2 dòng vi khuẩn cho NS bụi khác biệt không có ý nghĩa

với ĐC+ gồm: CT1N2 (29,45 g/bụi) và CTB3 (25,00 g/bụi) ở vùng đất phù sa, so với ĐC+ (27,38 g); dòng vi khuẩn AM3 (13,77 g/bụi) và TV2B7 (13,62 g/bụi) ở vùng đất mặn, so với ĐC+ (14,96 g/bụi); ở mức phân bón 75%N, mỗi vùng sinh thái đều có 2-3 dòng vi khuẩn cho NS bụi cao hơn hoặc khác biệt không có ý nghĩa với ĐC+ tương ứng bao gồm: ở vùng đất phù sa, dòng vi khuẩn CT1N2 cho năng suất 31,29 g/bụi, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với ĐC+ (27,38 g/bụi), dòng CTB3 cho năng suất 28,48 g/bụi, khác biệt không có ý nghĩa với ĐC+. Ở vùng đất mặn, 3 dòng vi khuẩn cho NS bụi khác biệt không có ý nghĩa với ĐC+ (14,96 g/bụi) là TV112 (14,76 g/bụi), TV2B7 (14,60 g/bụi) và AM3 (13,85 g/bụi). Từ kết quả phân tích cho thấy các dòng vi khuẩn CT1N2, CTB3 (đất phù sa), AM3, TV2B7 (đất mặn), vừa cho KLR cao vừa cho năng suất cao, có khả năng thay thế từ 25-50% phân đạm hóa học trong điều kiện nhà lưới. Ảnh hưởng của các dòng vi khuẩn đến lúa trồng ở điều kiện nhà lưới đã được nhiều nghiên cứu thực hiện. Nghiên cứu của Ngô Thanh Phong và ctv. (2011) khi chủng 2 chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. BT1 hoặc *Pseudomonas* sp. BT2 trên lúa cao sản trồng trong chậu cho thấy 2 dòng vi khuẩn này có thể thay thế 25-50%N khác biệt không có ý nghĩa trong thí nghiệm này. Nghiên cứu của Nguyễn Hữu Hiệp và ctv. (2012) trên chủng *Azospirillum lipoferum* R29b1 cho thấy, chủng vi khuẩn này cũng có khả năng thay thế 50% đạm hóa học cho lúa cao sản trong điều kiện nhà lưới.

3.3 Định danh các dòng vi khuẩn cho hiệu quả cố định đạm cao

Đặc tính sinh lý sinh hóa

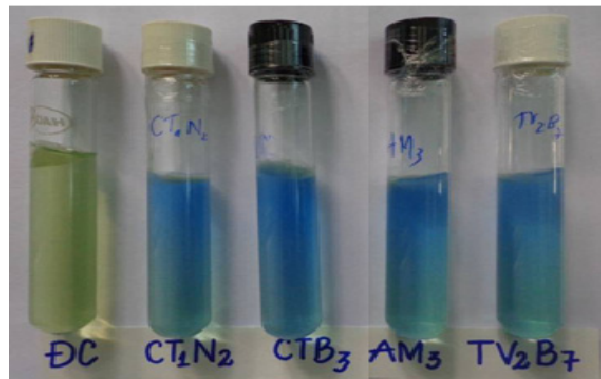
Một số đặc tính sinh lý sinh hóa của 4 dòng vi

khảo sát, chitin là nguồn carbon chỉ có một dòng vi khuẩn là AM3 sử dụng được và dòng vi khuẩn này cũng có khả năng đối kháng với nấm *Pyricularia oryzae* (Nguyễn Thị Pha và ctv. 2014). Các nguồn carbon còn lại các dòng vi khuẩn đều có khả năng sử dụng, ngoại trừ dòng vi khuẩn CT1N2 không sử dụng được nguồn carbon là mannitol. Sucrose là nguồn carbon mà 4 dòng vi khuẩn phát triển tốt nhất. Nguyên nhân có thể do đây là nguồn carbon ban đầu sử dụng trong môi trường Burk để phân lập vi khuẩn. Tất cả các dòng vi khuẩn khảo sát đều cho phản ứng catalase dương tính nhưng ở mức độ nhẹ. Điều này cho thấy cả 4 dòng vi khuẩn thuộc nhóm vi hiếu khí. Vi khuẩn phân lập được trong đề tài là vi khuẩn vùng rễ lúa nên kết quả này là phù hợp. Kết quả thử nghiệm hoạt tính enzyme nitrogenase qua phương pháp ARA bằng kỹ thuật sắc ký khí GC (Gas Chromatography) cho thấy cả 4 dòng vi khuẩn đều có hoạt tính nitrogenase khá cao thể hiện qua hàm lượng C₂H₂ bị khử dao động từ 3412 nM (dòng CTB3) đến 3938,57 nM (dòng AM3). Khả năng làm đổi màu môi trường NFB, NFB là môi trường có bổ sung chất chỉ thị là Bromophenol Blue (Hình 1). Hợp chất này làm thay đổi màu khi pH thay đổi. Các dòng vi khuẩn có khả năng tổng hợp đạm cao làm tăng pH môi trường và làm môi trường chuyển màu xanh dương. Kết quả khảo sát khả năng đổi màu môi trường cho thấy cả 04 dòng vi khuẩn đều có khả năng làm thay đổi màu môi trường sang xanh dương (Hình 1). Điều này cho thấy các dòng vi khuẩn đều có khả năng cố định đạm và làm tăng pH của môi trường. Kết quả nhuộm Gram cho thấy có 3/4 chủng thuộc Gram âm duy nhất dòng TV2B7 cho kết quả Gram dương.

Bảng 4: Đặc tính 04 dòng vi khuẩn tuyển chọn

Đặc tính	Dòng vi khuẩn			
	CT1N2	CTB3	TV2B7	AM3
D-Glucose	+	++	++	++
Maltose	+++	++	+++	++
D-Fructose	++	++	++	+++
Mannitol	-	+++	+++	+++
D-Mannose	++	++	+	++
Acid malic	++	+	++	++
Sucrose	+++	+++	+++	+++
Chitin	-	-	-	+
Đối kháng nấm <i>Pyricularia oryzae</i>	-	-	-	+
Catalase	+	+	+	+
Khả năng làm đổi màu môi trường NFB	+++	+++	+++	+++
Hàm lượng C ₂ H ₂ bị khử (nM)/24 giờ	3805	3412	3633	3938

Ghi chú: (-) không phát triển; (+) phát triển yếu; (++) phát triển mạnh; (+++) phát triển rất mạnh



Hình 1: Khả năng làm đổi màu môi trường NFB của 6 dòng vi khuẩn sau 4 ngày chủng

Ngày chụp 16/4/2014

Giải trình tự vùng gen 16S rDNA

Trình tự vùng gen 16S rDNA của 6 dòng vi khuẩn được khuếch đại bằng cặp mồi tổng 27 F và 1495R, và đọc trình tự tự động trên máy ABI 3130

kết quả thu được trình bày ở Bảng 5. Kết quả giải trình tự cho thấy cả 4 dòng vi khuẩn được tuyển chọn, đều thuộc các chi vi khuẩn có khả năng cố định đạm đã được nhiều tác giả công bố (Gyaneshwar *et al.*, 2001; Xie *et al.* 2006...)

Bảng 5: Kết quả giải trình tự 04 dòng vi khuẩn tuyển chọn

Dòng VK	Số nucleotide giải trình tự	Kết quả blast so sánh trên NCBI	% trình tự so sánh	Độ tương đồng
CTB3	836	1/ <i>Serratia marcescens</i>	99%	99%
		2/ <i>Serratia sp.</i>	99%	99%
		3/ <i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	99%	99%
CT1N2	800	1/ <i>Ideonella sp.</i>	98%	99%
		1/ <i>Bacillus megaterium</i>	97%	98%
TV2B7	933	2/ <i>Bacillus sp.</i>	96%	98%
		3/ <i>Bacillus aryabhatai</i>	97%	98%
		1/ <i>Stenotrophomonas panachumi</i>	98%	99%
AM3	1132	2/ <i>Stenotrophomonas sp.</i>	97%	100%
		3/ <i>S. maltophillica</i>	94%	100%
		4/ <i>S. zhizophila</i>	98%	98%

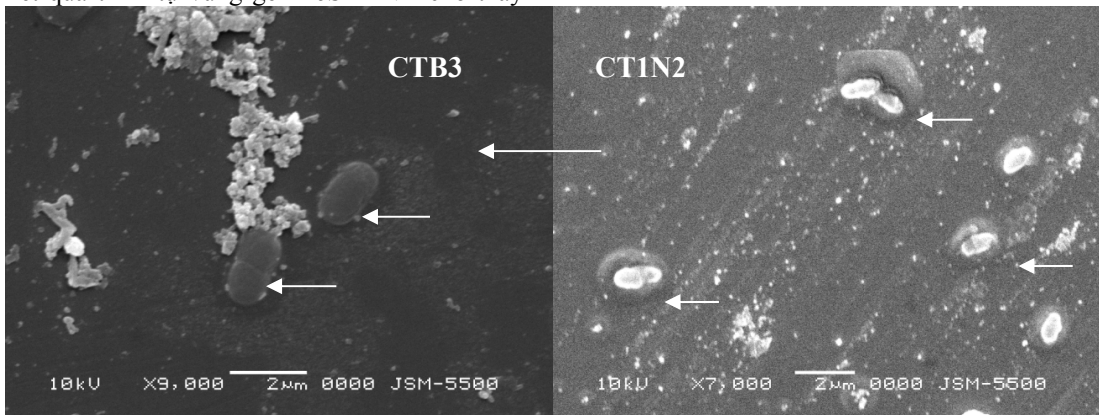
Dòng vi khuẩn CTB3: Kết quả giải trình tự cho thấy dòng vi khuẩn này tương đồng với một số loài thuộc chi *Serratia*. Đây là chi vi khuẩn thuộc nhóm Gram âm, hình que kích thước chiều rộng từ 0,5 đến 0,8 µm và chiều dài từ 0,9 đến 2 µm (Grimont and Grimont, 1984.). Hình chụp dòng CTB3 dưới kính hiển vi điện tử cho kích thước tương tự (Hình 2). Loài *Serratia marcescens* cũng đã được nhiều nghiên cứu cho thấy đây là chi có khả năng cố định đạm cho cây lúa (Gyaneshwar *et al.*, 2001). Trong chi *Serratia* loài *Serratia marcescens* được nghiên cứu khá nhiều, trong nghiên cứu của Eleanor *et al.* (2012) loài *Serratia marcescens* có khả năng sinh trưởng trên nhiều nguồn carbon khác nhau như sucrose, D-glucose, D- mannose, D- fructose, có phản ứng catalase dương tính, kết quả này phù hợp với dòng vi khuẩn CTB3 trong nghiên cứu này. So sánh đặc tính hình thái kết hợp với đặc tính sinh lý

sinh hóa và kết quả trình tự vùng gen 16S rDNA cho thấy dòng CTB3 có quan hệ gần gũi nhất với loài *Serratia marcescens*.

Dòng vi khuẩn CT1N2: Kết quả giải trình tự cho thấy dòng vi khuẩn này tương đồng với dòng *Ideonella sp* thuộc chi *Ideonella*. Đây là chi vi khuẩn thuộc nhóm Gram âm, tế bào có hình que, kích thước 0,5–1,0 µm chiều rộng và 2–6 µm chiều dài có khả năng cố định đạm, chi này phát triển được trên các nguồn carbon: acetate, glucose, mannitol, mannose (Jesse and Daniel, 2009). Hình chụp dòng vi khuẩn CT1N2 (Hình 2) cho thấy tế bào có dạng hình que ngắn, có chiều dài khoảng 2 µm. Từ các mô tả đặc tính về chi *Ideonella* cũng như khả năng cố định đạm của chi này cho thấy các kết quả khảo sát loài CT1N2 là khá phù hợp, dòng CT1N2 có phản ứng catalase dương tính yếu,

Gram âm, có khả năng cố định đạm. So sánh đặc tính hình thái kết hợp với đặc tính sinh lý sinh hóa và kết quả trình tự vùng gen 16S rDNA cho thấy

dòng CT1N2 có quan hệ gần gũi nhất với loài *Ideonella* sp.



Hình 2: Ảnh chụp dòng CTB3 (*Serratia marcescens*) và CT1N2 (*Ideonella* sp.) dưới kính hiển vi điện tử ở độ phóng đại 9000X và 7000X

Ngày chụp 20/5/2014

Dòng AM3: tương đồng với một số loài thuộc chi *Stenotrophomonas* (Bảng 5). Chi *Stenotrophomonas* thuộc nhóm Gram âm, hình que kích thước tế bào chiều rộng từ 0,2-0,4 µm chiều dài từ 1-2 µm. Hình chụp vi khuẩn AM3 dưới kính hiển vi điện tử cho thấy tế bào có dạng hình que, kích thước tế bào phù hợp với mô tả của chi *Stenotrophomonas* (Hình 3). Chi *Stenotrophomonas* được nhiều tác giả báo công bố về khả năng cố định đạm. Kết quả nghiên cứu của Mohammad *et al.* (2013) trên 10 dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm phân lập từ đất vùng Aznava Behnamir, Iran cho thấy dòng *S. maltophilia* có sự hiện diện của gen *nifH*. Ngoài khả năng cố định đạm vi khuẩn *Stenotrophomonas* cũng đã được nhiều tác giả công bố là có khả năng sản xuất chất điều hòa sinh trưởng kích thích sự phát triển của các loài cây trồng trong đó có lúa, đồng thời giúp chúng chống lại các độc tố do ô nhiễm môi trường (Taghavi *et al.*, 2009; Liba *et al.*, 2006; Myoungsu

et al., 2005; Othman *et al.*, 2012). Một số loài thuộc chi *Stenotrophomonas* phân lập từ mía ở Brazil được Patricia *et al.* (2011) mô tả (Bảng 6). So sánh với kết quả trong nghiên cứu này về dòng vi khuẩn AM3 cho thấy khá phù hợp về đặc tính sinh lý sinh hóa với loài *S. maltophilia*. Dòng AM3 được phân lập từ đất nhiễm mặn, có khả năng sử dụng đa dạng các nguồn carbon, trong Bảng 6 dòng AM3 và hai loài *S. maltophilia* LMG 958^T, *S. maltophilia* có khả năng sử dụng tương ứng các nguồn carbon khảo sát. Khả năng thích ứng với muối NaCl cũng được dòng vi khuẩn AM3 thể hiện trong các thí nghiệm trồng lúa để tuyển chọn các dòng vi khuẩn cho sinh thái đất nhiễm mặn trong điều kiện phòng thí nghiệm, nhà lưới (đất trồng lúa ở điều kiện nhà lưới có EC = 12,6 (mS/cm)). So sánh đặc tính hình thái kết hợp với đặc tính sinh lý sinh hóa và kết quả trình tự vùng gen 16S rDNA cho thấy dòng AM3 có quan hệ gần gũi nhất với loài *S. maltophilia*.

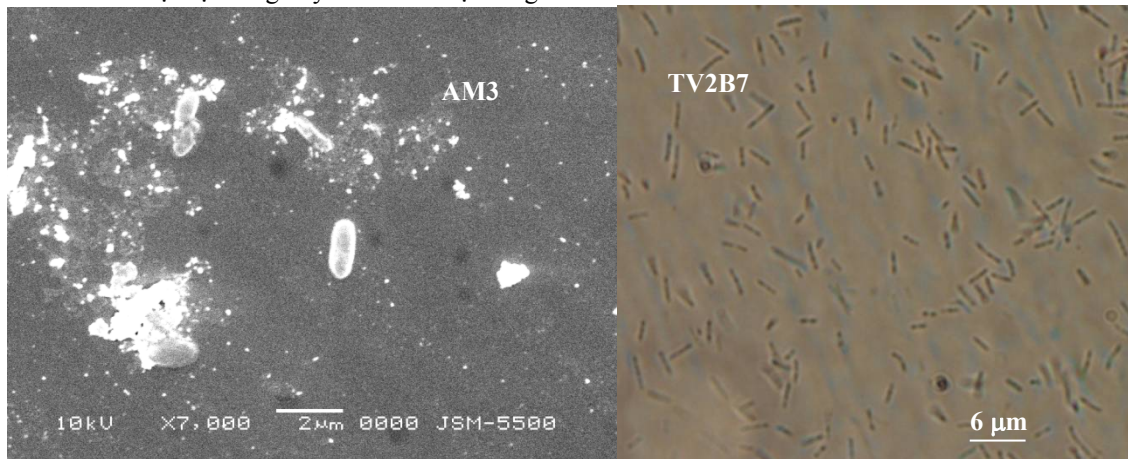
Bảng 6: Đặc tính một số loài thuộc chi *Stenotrophomonas* (Patricia *et al.*, 2011)

Đặc tính	AM3	<i>S. panachumi</i> LMG 23959 ^T	<i>S. maltophilia</i> LMG 958 ^T	<i>S. maltophilia</i> LMG 22072	<i>S. rhizophila</i> LMG 22075 ^T
4,5‰ NaCl	*	—	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	—	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+
Sucrose	+	—	+	+	—

Ghi chú: * chưa khảo sát; +/- là khả năng sử dụng/không sử dụng được nguồn carbon khảo sát

Dòng TV2B7: Kết quả giải trình tự tương đồng với một số loài thuộc chi *Bacillus*. Đây là chi vi khuẩn thuộc nhóm Gram dương, hình que kích thước tế bào có chiều rộng từ 1,1-1,5 μm chiều dài từ 2-6 μm, riêng loài *Bacillus megaterium* tế bào có chiều dài thường lớn hơn 4 μm. Hình chụp tế bào dòng vi khuẩn TV2B7 dưới kính hiển vi có độ phóng đại 1000 lần cho thấy tế bào có dạng hình que có chiều dài tế bào khoảng 4-5 μm (Hình 3), Gram dương phù hợp với miêu tả. Hiện tại, có khá nhiều nghiên cứu về khả năng cố định đạm của chi vi khuẩn này. Xie *et al.* (2006) đã phân lập được vi khuẩn *Bacillus megaterium* có khả năng cố định đạm từ đất của các ruộng lúa ở vùng đồng bằng dọc theo sông Yangtze, Trung Quốc. Barua *et al.* (2011) cũng đã phân lập được vi khuẩn *Bacillus megaterium* cố định đạm sống tự do trong đất canh tác lúa nhiễm mặn tại vùng duyên hải Ấn Độ. Ding

et al. (2005) lần đầu tiên phát hiện được vùng gen *nifH* chịu trách nhiệm mã hóa cho enzyme cần thiết của quá trình cố định đạm trên các chủng *Bacillus megaterium* phân lập từ vùng rẫy lúa mì, bắp, cỏ hoang và cây liễu tại Bắc Kinh. Đặc tính một số loài thuộc chi *Bacillus* được trình bày ở Bảng 7 (Yoon *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2005). So sánh đặc tính của dòng vi khuẩn là TV2B7 và các loài vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus* cho thấy, có sự tương đồng về khả năng sử dụng các nguồn carbon. Trong nghiên cứu này dòng vi khuẩn TV2B7 cũng được khảo sát tương tác với lúa trong nhà lưới có EC = 12,6 (mS/cm) cho tương tác tốt với cây lúa giúp thay thế từ 25-50% đạm hóa học. So sánh đặc tính hình thái kết hợp với đặc tính sinh lý sinh hóa và kết quả trình tự vùng gen 16S rDNA cho thấy dòng TV2B7 có quan hệ gần gũi nhất với loài *B. megaterium*.



Hình 3: Ảnh chụp dòng AM3 (*Stenotrophomonas*) dưới kính hiển vi điện tử ở độ phóng đại 7000X và dòng TV2B7 (*Bacillus megaterium*) dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000X

Ngày chụp 20/5/2014

Bảng 7: Đặc tính một số loài thuộc chi *Bacillus*

Đặc tính	TV2B7	<i>B. cereus</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. marisflavi</i> *
Catalase	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+
Mannitol	+	-	+	+
D-Maltose	+	+	+	+
NaCl tolerance (%)	*	1-7	1-5	16

Ghi chú: * chưa khảo sát; +/- là khả năng sử dụng/không sử dụng được nguồn carbon khảo sát

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Đề tài đã phân lập được 290 dòng vi khuẩn từ 114 mẫu đất vùng rẫy lúa. Tất cả 290 dòng vi khuẩn

đều có khả năng tổng hợp NH₄⁺. Xác định được 16 dòng vi khuẩn có tác động tốt nhất lên sinh trưởng của cây mạ trong điều kiện phòng thí nghiệm. Bốn dòng vi khuẩn có khả năng thay thế từ 25-50% phân đạm hóa học cho cây lúa OM6976 trồng trong

chậu ở điều kiện nhà lưới là CTB3, CT1N2, AM3 và TV2B7 được định danh tương đồng lần lượt với các loài: *Serratia marcescens*, *Ideonella* sp., *Stenotrophomonas maltophilia* và *Bacillus megaterium*.

4.2 Đề xuất

Khảo sát khả năng tồn tại của các dòng vi khuẩn sau khi chủng vào cây lúa (Khả năng nội sinh vào cây lúa hoặc mật số tồn tại trong vùng rễ). Tiếp tục thử nghiệm hiệu quả cố định đạm của 6 dòng vi khuẩn tuyển chọn ở điều kiện ngoài đồng tại các vùng sinh thái tương ứng. Nghiên cứu kết hợp các dòng vi khuẩn nhằm tăng hiệu quả cung cấp đạm cho cây lúa và làm cơ sở cho chiến lược sản xuất chế phẩm phân bón vi sinh đa chủng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ding, Y., J. Wang, Y. Liu and S. Chen, 2005. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 1271–1281.
- Gyaneshwar, P., E.K. James, N. Mathan, P.M. Reddy, B. Reinhold-Hurek and J.K. Ladha, 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 183(8): 2634-2645.
- Jesse, D.N. and H.B. Daniel, 2009. *Ideonella azotifigens* sp. nov., an aerobic diazotroph of the Betaproteobacteria isolated from grass rhizosphere soil, and emended description of the genus *Ideonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(8): 1941-1946.
- Menard, A., C. Monnez, P. Santos, C. Segonds, J. Caballero-Mellado, J.J. Lipuma, G. Chabanon and B. Cournoyer, 2007. Selection of nitrogen-fixing deficient *Burkholderia vietnamiensis* strains by cystic fibrosis patients: involvement of Nif gene deletions and auxotrophic mutations. *Environmental Microbiology*, 9: 1176-1185. Ngô Thanh Phong, Trần Thúy Huỳnh, Phan Kim Định và Cao Ngọc Diệp, 2011. Xác định mức độ thay thế phân đạm của vi khuẩn *Pseudomonas* sp. BT1 và BT2 với cây lúa cao sản trồng trong chậu. *Tạp chí Đại học Cần Thơ* 2011:20a 92-99.
- Nguyễn Hữu Hiệp, Ngô Ngọc Hưng và Lâm Bạch Vân, 2012. Khả năng cố định đạm của chủng vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* R29B1 có kết hợp các liều lượng phân đạm khác nhau lên sự sinh trưởng và năng suất trên cây lúa trong điều kiện nhà lưới. *Tạp chí Đại học Cần Thơ* 2012:21b 171-178.
- Nguyễn Thị Pha, Nguyễn Thị Phương Oanh và Nguyễn Hữu Hiệp. 2014. Khả năng đối kháng nấm *Pyricularia oryzae* của vi khuẩn sinh chitinase phân lập từ đất vùng rễ lúa. *Tạp chí Đại học Cần Thơ*. 31: 7-11. ISSN: 1859-2333.
- Othman, O., U.A. Naher and S.I.A. Hamed, 2012. Effect of Paraquat on growth of diazotrophic strain *Stenotrophomonas maltophilia* in flooded soil. *African Journal of Microbiology Research* 6:4939-4944.
- Patrícia, L.R., A.M. Carlos, V.T. Stefanie, S. Jean, D.V. Paul, R.B. Heloiza, C.T. Cristiane, T.R.V. Ana and L.T. Fabiano, 2011. An MLSA-based online scheme for the rapid identification of *Stenotrophomonas* isolates. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(4): 394-399.
- Trần Minh Tiến, Hồ Quang Đức và Hoàng Trọng Quý, 2013. Biến động một số tính chất đất trồng lúa vùng Đồng bằng sông Hồng và Đồng bằng sông Cửu Long. *Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam*. Báo cáo kết quả đề tài: 141-153.
- Weisberg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697–703.