

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN CỐ ĐỊNH ĐẠM *Burkholderia* sp. TỪ ĐẤT VÙNG RỄ LÚA Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG VÀ ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ TRÊN LÚA CAO SẢN (GIỐNG OM2517) TRỒNG Ở ĐẤT PHÙ SA NÔNG TRƯỜNG SÔNG HẬU - CẦN THƠ

Ngô Thanh Phong¹

TÓM TẮT

Một trăm năm mươi chủng vi khuẩn được phân lập đều có khả năng tổng hợp NH_4^+ . Tiến hành sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng cố định đạm sinh học trên mô hình cây lúa cao sản trồng trong dung dịch khoáng (không sử dụng đạm) và trồng trong chậu đất ở nhà lưới, đã xác định được 3/6 chủng vi khuẩn có khả năng cung cấp 50 – 75% nhu cầu đạm sinh học cho sự phát triển của cây lúa trồng trong chậu. Sử dụng cặp mồi FGPS4-28bis và FGPS1509'-153 để tạo sản phẩm PCR đối với 4 chủng vi khuẩn triển vọng, giải trình tự ADN và so sánh với ngân hàng dữ liệu NCBI cho thấy cả 4 chủng này đều tương đồng di truyền 97 - 100% so với *Burkholderia vietnamiensis* hoặc *Burkholderia kururiensis*. Thí nghiệm ngoài đồng được thực hiện để đánh giá khả năng cố định đạm của 2 dòng vi khuẩn *Burkholderia vietnamiensis* KG1 và *Burkholderia vietnamiensis* CT1 trên cây lúa cao sản (OM2517) trồng trên đất phù sa tại Nông trường Sông Hậu – Cần Thơ vào vụ hè thu 2016. Kết quả cho thấy chủng vi khuẩn KG1 cung cấp đến 50%, trong khi chủng CT1 chỉ cung cấp 25% đạm sinh học cho nhu cầu sinh trưởng và phát triển của cây lúa cao sản OM2517.

Từ khóa: *Burkholderia vietnamiensis*, cố định đạm sinh học, đất phù sa, đất vùng rễ lúa, gien nif, lúa cao sản OM2517.

1. BẬT VẤN ĐỀ

Phân bón nói chung và phân đạm hoá học nói riêng đã góp phần quan trọng trong việc gia tăng năng suất lúa. Tuy nhiên, cây lúa chỉ hấp thu khoảng 50 - 60% lượng đạm được bón vào trong đất (Võ Minh Kha, 2003), số còn lại sẽ được lưu tồn trong đất hoặc bị rửa trôi gây ảnh hưởng đến môi trường nước. Bón quá nhiều phân đạm hóa học cho cây trồng đã không những dẫn đến chi phí sản xuất cao, hiệu quả kinh tế thấp, đồng thời không đảm bảo cho một hệ sinh thái phát triển bền vững.

Để khắc phục những hạn chế do sử dụng quá nhiều phân đạm hóa học thì việc sử dụng phân đạm sinh học có chứa các chủng vi khuẩn có khả năng cố định đạm (BNF: biological nitrogen fixation) là một trong những biện pháp có hiệu quả mà không gây ô nhiễm môi trường, tiết kiệm chi phí sản xuất nhưng vẫn đảm bảo chất lượng, đồng thời vẫn tăng năng suất nông sản. Vi khuẩn *Azospirillum* có khả năng cố định đạm, tổng hợp IAA, hòa tan lân và các chất dinh dưỡng khác

(Cao Ngọc Diệp *et al.*, 2007), vi khuẩn *Burkholderia* có khả năng cố định đạm, cộng sinh với nhiều loại cây trồng giúp cố định đạm và kích thích sự tăng trưởng khi chúng hiện diện ở đất quanh vùng rễ và trong rễ của một số loại cây trồng như lúa, bắp, mía, cà phê (Chen *et al.*, 2006).

Chi *Burkholderia* lần đầu tiên được tìm ra dựa trên cơ sở phân tích di truyền rARN nhóm II đối với hai loài từ chi *Pseudomonas* và nhiều loài cũng được đặt lại tên là *Burkholderia* sp. (Yabuuchi *et al.*, 1995). Trần Văn Văn *et al.* (2000) đã xác định được *Burkholderia vietnamiensis* là loài vi khuẩn có khả năng cố định đạm giúp tăng năng suất lúa. Các chủng *Burkholderia vietnamiensis* được phân lập từ vùng rễ lúa ở Kiên Giang có mức độ biểu hiện hoạt tính của nitrogenaza qua phản ứng khử axetylen cao (0,226 - 0,238 mM) (Ngô Thanh Phong *et al.*, 2011). Việc nghiên cứu ứng dụng các chủng vi khuẩn có khả năng cố định đạm hữu hiệu bón cho cây lúa ở đồng bằng sông Cửu Long mang tính cấp thiết nhằm góp phần giảm sử dụng phân đạm hóa học cho cây lúa, nhưng vẫn giữ vững năng suất, bảo vệ môi

¹ Khoa Khoa học Tự nhiên, Đại học Cần Thơ

trường và góp phần đảm bảo cho sự phát triển nông nghiệp bền vững trong khu vực. Do đó, đề tài “Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cố định đạm *Burkholderia* sp. từ đất vùng rẫy lúa ở đồng bằng sông Cửu Long và đánh giá hiệu quả trên lúa cao sản (giống OM2517) trồng ở đất phù sa Nông trường Sông Hậu – Cần Thơ” được thực hiện nhằm phân lập, chọn lọc và xác định được những dòng *Burkholderia* sp. có khả năng cố định đạm hữu hiệu trên cây lúa cao sản.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Đất vùng rẫy lúa ở 13 tỉnh/thành đồng bằng sông Cửu Long được tiến hành thu mẫu dùng để phân lập vi khuẩn cố định đạm (phần đất bằm sát rẫy lúa sau khi gieo hoặc cấy ít nhất là 20 ngày).

Giống lúa OM2517 có nguồn gốc từ tổ hợp lai OM1325 và OMCS94, được công nhận giống Quốc gia năm 2004 theo Quyết định số 2182 QĐ/BNN-KHCN ngày 29/7/2004. Đây là giống lúa thích nghi rộng, dễ canh tác, phù hợp với vùng Tứ giác Long Xuyên và Tây Sông Hậu. Giống lúa OM2517 có thời gian sinh trưởng ngắn (90 - 95 ngày), đạt năng suất 5 tấn/ha vào vụ hè thu và 8 tấn/ha vào vụ đông xuân (Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu, 2008).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng cố định đạm

Phân lập các chủng vi khuẩn từ đất vùng rẫy lúa trên môi trường Burk không đạm (Park *et al.*, 2005). Nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường Burk lỏng không đạm và xác định khả năng tổng hợp NH_4^+ (mg/l) bằng phương pháp Phenol – Nitroprusside (Park *et al.*, 2005), chọn lọc một số chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp NH_4^+ cao để kiểm tra khả năng cố định đạm thông qua xác định hoạt tính nitrogenaza bằng phương pháp khử axetylen (acetylene reduction assay – ARA) (Dilworth, 1966). Sàng lọc vi khuẩn có khả năng cố định đạm trên mô hình cây lúa trồng trong dung dịch khoáng không đạm (Kronzucker *et al.*, 1999) có bổ sung 0,8% aga (thạch) và tiếp tục sàng lọc với mô hình trồng lúa trong chậu ở nhà lưới (Ngô Thanh Phong, 2012).

2.2.2. Khuếch đại và giải trình tự đoạn gen mã hóa 16S rADN

Vi khuẩn được nhân nuôi trong ống nghiệm chứa môi trường LB (lỏng) để thu sinh khối, ADN vi

khuẩn được tách chiết theo quy trình của Neumann *et al.* (1992). Nhận diện gen 16S rADN của vi khuẩn *Burkholderia* dựa trên cặp mỗi tổng (Mirza *et al.*, 2006). Trình tự cặp mỗi như sau:

Mỗi xuôi FGPS4-281bis (5' – 3'): AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG.

Mỗi ngược FGPS1509'-153 (5' – 3'): AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA.

Phản ứng PCR: 95°C/5'; 35 chu kỳ: (95°C/45", 60°C/45", 72°C/1'30"); 72°C/10'.

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit Invitrogen và giải trình tự bằng hệ thống máy giải trình tự tự động ABI 3130. Sử dụng chương trình BLAST N để so sánh trình tự ADN của các chủng vi khuẩn chọn lọc với trình tự ADN của bộ gen ở các loài vi khuẩn trong GenBank để xác định tương đồng di truyền. Ngoài ra, các chủng vi khuẩn còn được nhận diện đoạn gen *nifH* với cặp mỗi PolF-115 và PolR-476 chuyên biệt nhận diện một đoạn gen *nifH* thuộc nhóm vi khuẩn *Pseudomonas* và *Burkholderia* (Poly *et al.*, 2001).

2.2.3. Ứng dụng hai chủng vi khuẩn tiềm năng chủng cho cây lúa cao sản trồng ngoài đồng

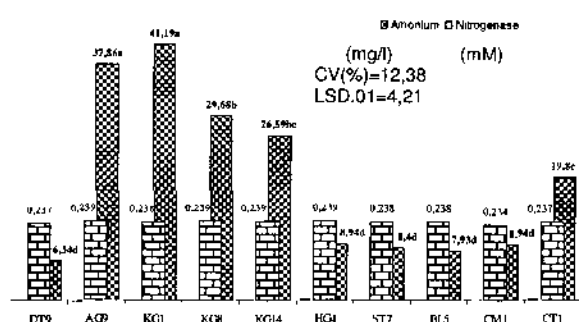
Chọn hai chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp NH_4^+ cao, đồng thời hiệu quả trên cây lúa trồng trong dung dịch khoáng không đạm và trồng trong chậu, tiến hành bố trí thí nghiệm chủng cho cây lúa cao sản OM2517 trồng ngoài đồng. Nhân nuôi hai chủng vi khuẩn trong môi trường Burk lỏng không đạm (Park *et al.*, 2005) đến khi đạt được mật độ vi khuẩn là 10^9 tế bào/ml. Thí nghiệm được tiến hành ở ruộng lúa tại Nông trường Sông Hậu – Cần Thơ với nhiều nghiệm thức (NT0 là nghiệm thức đối chứng âm - không chủng vi khuẩn và không bổ sung phân đạm; NT100 là nghiệm thức đối chứng dương - không chủng vi khuẩn và bón 100% N; các nghiệm thức có chủng riêng lẻ với từng chủng vi khuẩn và lần lượt bón 0% N, 50% N, 75% N) theo thể thức khối hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi nghiệm thức bố trí lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp lại bố trí trên một lô đất có diện tích 24 m² được gieo sạ với mật độ 160 kg/ha, có trộn dịch vi khuẩn (1 lít dịch vi khuẩn đạt mật số 10^9 tế bào/ml trộn với 20 kg lúa giống vừa nảy mầm – hạt lúa giống có rễ mầm 1 - 2 mm). Như vậy, đã phải chủng 8 lít dịch vi khuẩn cho 160 kg lúa giống/ha hoặc không tẩm dịch vi khuẩn tùy theo nghiệm thức. Áp dụng công thức bón phân N, P, K cho cây lúa theo khuyến cáo của Trung tâm Khuyến

nóng Cần Thơ là 90 N- 30 P₂O₅- 30 K₂O kg/ha, chia là 3 đợt (7 - 12, 18 - 22, 38 - 45 ngày sau khi gieo sạ). Từ đó tính toán lượng phân đạm cho những nghiệm thức khác nhau (0% N, 50% N và 75% N), trong khi đó lượng phân lân và kali đều được bón 100% như nhau đối với tất cả các nghiệm thức.

Các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất thực tế được thu và đánh giá theo hướng dẫn của Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long. Phân tích hàm lượng protein trong gạo bằng phương pháp micro-Kjeldahl (Phạm Văn Sổ và Bùi Thị Nhu Thuận, 1991). Số liệu được phân tích thống kê bằng phần mềm EXCEL 2003 hoặc MINITAB, so sánh sự khác biệt ý nghĩa bằng kiểm định LSD để đánh giá hiệu quả cố định đạm của các dòng vi khuẩn.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng cố định đạm



Hình 1. Hoạt tính nitrogenaza (mM) và khả năng tổng hợp NH₄⁺ (mg/l) của một số chủng vi khuẩn

Phân lập được 150 chủng vi khuẩn, số chủng vi khuẩn có khuẩn lạc không bao nhày chiếm tỉ lệ cao nhất là 86,7% (130/150), số chủng vi khuẩn có khuẩn lạc màu trắng (trắc đục và trắng trong) chiếm đến 73,4% (110/150), số chủng vi khuẩn có khuẩn lạc bia nguyên chiếm 98% (147/150), số chủng vi khuẩn có khuẩn lạc dạng nổi chiếm 94,7% (142/150); về đặc điểm tế bào của các chủng vi khuẩn, 100% chủng vi khuẩn có tế bào hình que, trong đó hầu hết tế bào có hình que ngắn (dài 1,5 - 2,4 μm, rộng 0,6 - 0,8 μm), chiếm 96,7% (145/150), hình que dài (dài 2,5 - 3,4 μm, rộng 1,3 - 1,5 μm) chỉ chiếm 3,3% (5/150). Những đặc điểm nổi bật của khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn phù hợp với những đặc điểm của nhóm vi khuẩn *Burkholderia* được phân lập từ Kiên Giang và Vĩnh Long (Ngô Thanh Phong *et al.*, 2010). Khả năng tổng hợp amoni cũng được xác định đối với tất cả các dòng vi khuẩn và hoạt tính nitrogenaza được

xác định đối với một số dòng vi khuẩn tiềm năng (Hình 1).

Kết quả về chiều cao và khối lượng khô cây lúa ở nghiệm thức có chủng vi khuẩn KG1 và CT1 có giá trị cao hơn và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng âm (không chủng vi khuẩn và dung dịch khoáng không bổ sung NH₄NO₃ 100 mM), tương đương và khác biệt không có ý nghĩa so với đối chứng dương (không chủng vi khuẩn nhưng có bổ sung NH₄NO₃ 100 mM). Ngoài ra, khối lượng khô của cây lúa có chủng vi khuẩn KG1, CT1 cao hơn, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng âm và với các nghiệm thức có sử dụng các chủng vi khuẩn VL2, VL8, KG14, KG8, CM1, cao hơn nhưng không khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng dương (Bảng 1).

Bảng 1. Hiệu quả của 3 chủng vi khuẩn *Burkholderia* sp. lên chiều cao và khối lượng khô cây lúa ở giai đoạn 20 ngày tuổi

Chủng vi khuẩn	Cây lúa 20 ngày trong ống nghiệm	
	Chiều cao cây lúa (cm)	Khối lượng khô cây lúa (g/cây)
BV1 (VL2)	13,5 bc	0,15 c
BV2 (VL8)	12,1 de	0,16 bc
BV3 (KG1)	14,8 a	0,18 ab
BK1 (KG8)	10,3 e	0,10 e
BV4 (KG14)	13,9 bc	0,13 d
BK2 (CM1)	10,1 e	0,16 bc
BV5 (CT1)	14,3 ab	0,19 a
ĐC âm	8,1 f	0,08 f
ĐC dương	15,8 a	0,17 ab
CV (%)	5,61	9,16

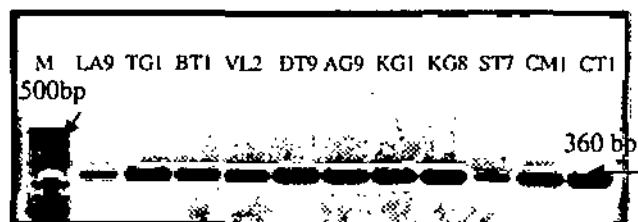
Ghi chú: Các số liệu có cùng mẫu tự theo sau thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 1%

Như vậy, kết hợp các kết quả về khả năng tổng hợp NH₄⁺ (Ngô Thanh Phong, 2012), ảnh hưởng lên chiều cao và khối lượng cây lúa thì các chủng vi khuẩn KG1, CT1 có độ hữu hiệu cao hơn các chủng vi khuẩn khác. Chiều cao và khối lượng cây lúa ở các nghiệm thức có sử dụng lần lượt các chủng đều cao hơn và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng âm (không đạm NH₄NO₃ 100 mM) cho thấy các chủng vi khuẩn này đều có ảnh hưởng lên sự gia tăng chiều cao và khối lượng khô cây lúa 20 ngày tuổi trong thí nghiệm in-vitro. Ngoài ra, một số chủng vi khuẩn như VL2 và KG14 có tác động khá tốt đến sự gia tăng chiều cao cây lúa và khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức có chủng VL8 và CM1 nhưng khối lượng khô cây lúa lại thấp hơn. Điều này cho thấy

một số chủng vi khuẩn như VL2 và KG14 có khả năng giúp tăng chiều cao nhưng chưa tác động tới đến sự tích lũy sinh khối cây lúa.

3.2. Nhân dòng đoạn gen *nifH* và đoạn gen 16S từ một số chủng vi khuẩn

Khuếch đại đoạn từ 115 đến 476 của gen *nifH* ở *Pseudomonas* và *Burkholderia* bằng cặp mồi đặc chủng PolF-115 và PolR-476. Đây là cặp mồi chuyên biệt dùng để nhân dòng một phần của gen *nifH* có khả năng cố định đạm. Kết quả ở hình 2 cho thấy các chủng đại diện có băng ở vị trí khoảng 360 bp theo thang chuẩn, tương ứng với đoạn gen *nifH* thuộc nhóm *Pseudomonas* và *Burkholderia*, phù hợp với kết quả của một số nghiên cứu trước đây (Mirza *et al.*, 2006; Poly *et al.*, 2001) đã báo cáo.

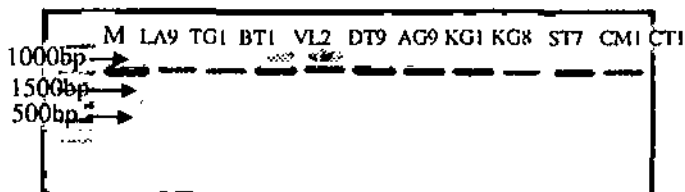


Hình 2. Phổ điện di sản phẩm PCR được nhân lên từ ADN của các chủng vi khuẩn với cặp mồi PolF và PolR xác định đoạn gen *nifH* ở vị trí 115-476 (Thang chuẩn 100 bp)

Ghi chú: Phổ điện di của thang chuẩn M và sản phẩm PCR của các chủng vi khuẩn LA9, TG1, BT1, VL2, DT9, AG9, KG1, KG8, ST7, CM1 và CT1.

Sử dụng sản phẩm PCR từ cặp mồi FGPS4-281bis và FGPS1509'-153 để giải trình tự ADN của 4 chủng vi khuẩn có triển vọng và so sánh với các chủng vi khuẩn có trong GenBank. Kết quả cho thấy cả 4 chủng vi khuẩn này đều tương đồng di truyền 97 - 100% so với các loài thuộc chi *Burkholderia*, trong đó có chủng CT1 và KG1 tương đồng di truyền 98 - 100% với *Burkholderia vietnamiensis*, chủng CM1 và KG8 tương đồng di truyền 97% với *Burkholderia kururiensis*. Ngoài ra, chủng KG8 còn tương đồng di truyền 97% với *Burkholderia brasilensis* có trong ngân hàng dữ liệu NCBI. Kết quả cụ thể như sau: Chủng vi khuẩn KG1 có tổng số nucleotit được giải là 950 nucleotit, tương đồng di truyền với vi khuẩn DQ979872 *Burkholderia vietnamiensis* dòng AU0913 với tỉ lệ 98%; chủng vi khuẩn KG8 có tổng số nucleotit được giải là 718 nucleotit, có mức tương đồng di truyền với vi khuẩn AY098590.1 *Burkholderia kururiensis* dòng KP23 và vi khuẩn

AY098588.1 *Burkholderia brasilensis* dòng M113 với tỉ lệ 97%; chủng vi khuẩn CM1 có tổng số nucleotit được giải là 950 nucleotit có mức tương đồng di truyền 97% với AY098590.1 *Burkholderia kururiensis* dòng KP23; chủng vi khuẩn CT1 có tổng số nucleotit được giải là 950 nucleotit có mức tương đồng di truyền 100% với AB568313.1 *Burkholderia vietnamiensis*.



Hình 3. Phổ điện di sản phẩm PCR được nhân lên từ ADN của các chủng vi khuẩn *Pseudomonas* với cặp mồi tổng FGPS4-281bis và FGPS1509'-153 (M: thang chuẩn 100 bp plus)

Ghi chú: Phổ điện di của thang chuẩn M và sản phẩm PCR của các chủng vi khuẩn LA9, TG1, BT1, VL2, DT9, AG9, KG8, ST7, CM1 và CT1.

3.3. Hiệu quả của 3 chủng *Burkholderia vietnamiensis* trên cây lúa cao sản trồng trong chậu

Đối với kết quả thí nghiệm trồng lúa trong chậu, căn cứ vào khối lượng hạt ở các nghiệm thức cho thấy khi sử dụng chủng vi khuẩn VL2, KG1 hoặc CT1 có kết hợp bổ sung 50% N hoặc 75% N đều cho giá trị khối lượng hạt lúa/chậu tương đương hoặc cao hơn đối chứng dương và khác biệt không có ý nghĩa ở mức 1% hoặc khác biệt có ý nghĩa (KG1-75% N). Như vậy, các chủng vi khuẩn VL2, KG1 hoặc CT1 đều có thể đảm bảo 50% nhu cầu đạm cho cây lúa để tích lũy khối lượng hạt. Nếu xét các nghiệm thức ở mức độ bổ sung 25% N thì các chủng vi khuẩn KG1 và CT1 có triển vọng tích lũy khối lượng hạt lúa tốt hơn VL2. Khối lượng 1000 hạt ít có sự khác biệt giữa các nghiệm thức vì tình trạng này liên quan chặt chẽ với đặc điểm di truyền của giống lúa (Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu, 2008). Ngoài ra, kết quả về chiều cao cây lúa và số bông/chậu không phải lúc nào cũng tương quan thuận với khối lượng hạt/chậu (Bảng 2) mà còn tùy thuộc vào sự tác động của các yếu tố khác đến sự hình thành số lượng hạt chắc/bông (Nguyễn Tiến Huy, 1999). Hai chủng KG1 và CT1 được chọn (dựa trên kết quả thí nghiệm trong chậu) để tiến hành thí nghiệm đánh giá hiệu quả trên cây lúa cao sản OM2517 trồng ngoài đồng ruộng tại Nông trường Sông Hậu.

Bảng 2. Hiệu quả của 3 chủng vi khuẩn *Burkholderia vietnamiensis* và phân đạm hóa học trên chiều cao cây, số bông/chậu, khối lượng 1000 hạt và năng suất lúa cao sản (khối lượng hạt – g/chậu) ở thí nghiệm trong chậu

STT	Nghiệm thức	Chiều cao cây (cm)	Số bông/chậu	Khối lượng 1000 hạt (gam)	Khối lượng hạt (g/chậu)
1	VL2-0% N	68,8 h	11,0 bcd	22,23 b	6,41 f
2	VL2-25% N	69,4 gh	12,0 bcd	22,33 ab	9,36 e
3	VL2-50% N	78,8 ab	10,0 cd	23,23 ab	12,10 c
4	VL2-75% N	81,5 a	13,0 ab	23,37 ab	13,66 ab
5	KG1-0% N	65,0 kl	10,0 cd	23,81 a	6,05 g
6	KG1-25% N	71,1 ef	10,0 cd	23,61 ab	10,29 d
7	KG1-50% N	67,7 i	11,0 bcd	23,64 ab	13,73 ab
8	KG1-75% N	70,9 ef	11,3 abc	23,47 ab	14,06 a
9	CT1-0% N	74,0 bc	10,3 cd	22,23 b	6,12 g
10	CT1-25% N	77,7 ab	12,0 abc	22,33 ab	10,18 d
11	CT1-50% N	75,6 bc	11,0 bcd	23,26 ab	13,16 bc
12	CT1-75% N	73,4 cd	11,3 abc	23,40 ab	13,28 ab
13	ĐC âm	64,2 l	7,3 e	23,08 ab	5,06 h
14	ĐC dương	73,2 cd	13,3 a	23,37 ab	13,17 bc
	CV (%)	2,30	5,76	1,49	6,09

Ghi chú: Các số liệu có cùng mẫu tự theo sau (ở cùng 1 cột) thì không khác biệt nhau ở mức ý nghĩa 1%.

3.4. Hiệu quả của 2 chủng vi khuẩn *Burkholderia vietnamiensis* trên cây lúa cao sản OM2517 trồng ngoài đồng

Kết quả từ bảng 3 cho thấy nghiệm thức chỉ sử dụng vi khuẩn nhưng không kết hợp bổ sung đạm hóa học (KG1-0% N và CT1-0% N) đều có chiều cao cây, số bông/m², số hạt chắc/bông và năng suất lúa cao hơn và khác biệt có ý nghĩa ở mức 1% so với đối chứng âm (không chủng vi khuẩn và không bón phân đạm). Tuy

nhiên, nếu so sánh với đối chứng dương (không chủng vi khuẩn nhưng bón 100% N) thì đa số các giá trị này thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa. Như vậy, các chủng vi khuẩn KG1 hoặc CT1 không thể thay thế hoàn toàn phân đạm hóa học mà chỉ có thể đảm bảo cung cấp một phần đạm sinh học cho nhu cầu sinh trưởng và phát triển của cây lúa trồng ngoài đồng. Do đó, việc sử dụng các chủng vi khuẩn trong quá trình canh tác lúa phải kết hợp bổ sung phân đạm hóa học.

Bảng 3. Hiệu quả của 2 chủng vi khuẩn và phân đạm hóa học trên chiều cao cây và các yếu tố cấu thành năng suất lúa cao sản (OM2517) trồng trên đất phù sa Nông trường Sông Hậu - Cần Thơ (vụ hè thu 2016)

Nghiệm thức	Chiều cao cây lúa (cm)	Số bông/m ²	Số hạt chắc/bông	Khối lượng 1000 hạt (g)	Năng suất lúa (tấn/ha)	Hàm lượng protein gạo (%)
KG1-0% N	90,9 abc	356,7 f	69,3 ab	23,5 ab	5,992 de	5,82 bc
KG1-50% N	93,5 a	420,0 abcd	69,4 ab	23,3 ab	6,607 abc	6,44 a
KG1-75% N	93,7 a	456,7 a	71,3 ab	23,9 a	6,788 ab	6,64 a
CT1-0% N	81,8 e	400,0 bcde	61,3 d	23,4 ab	5,862 ef	5,29 d
CT1-50% N	87,0 cd	426,7 abc	62,7 d	23,6 ab	6,395 bcd	5,96 bc
CT1-75% N	89,7 abc	456,7 a	72,7 a	23,3 ab	6,615 abc	6,02 bc
NT-0% N	80,2 e	313,3 g	54,7 e	23,2 ab	4,258 g	5,19 d
NT-100% N	90,2 abc	390,0 cdef	72,6 a	23,4 ab	6,883 a	6,04 b
CV (%)	2,86	5,93	3,70	2,81	3,87	3,47

Ghi chú: NT-0: Nghiệm thức đối chứng âm, không chủng vi khuẩn và không bổ sung N; NT100: Nghiệm thức đối chứng dương, không chủng vi khuẩn nhưng có bón 100% N = 90 kg N/ha; KG1: chủng vi khuẩn *Burkholderia vietnamiensis* KG1; CT1: chủng vi khuẩn *Burkholderia vietnamiensis* CT1; các số liệu trong cùng một cột có cùng mẫu tự theo sau thì không khác biệt nhau ở mức ý nghĩa 1%.

Các nghiệm thức có sử dụng chủng vi khuẩn KG1 hoặc CT1 kết hợp bón 50% N cho kết quả tương đương và khác biệt không có ý nghĩa so với đối chứng dương (100% N) về chiều cao cây lúa, số bông/m² và khối lượng 1000 hạt cho thấy vai trò cung cấp 50% đạm sinh học để góp phần hình thành nên các giá trị này cho cây lúa OM2517. Ngoài ra, ở nghiệm thức KG1-50% N còn có kết quả về số hạt chắc/bông và năng suất lúa tương đương và khác biệt không có ý nghĩa so với đối chứng dương, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức CT1-50% N. Kết quả ở bảng 3 cũng cho thấy năng suất lúa ở các nghiệm thức KG1-50% N và 75% N hoặc CT1-75% N đều tương đương và khác biệt không có ý nghĩa so với đối chứng dương (8,883 tấn/ha). Nghiệm thức CT1-50% N cho năng suất thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng dương là vì số hạt chắc/bông (62,7) thấp hơn và khác biệt rất xa so với đối chứng dương (72,6 hạt chắc/bông). Như vậy, chủng vi khuẩn KG1 có thể cung cấp 50% nhu cầu đạm sinh học cho quá trình sinh trưởng và phát triển của cây lúa, trong khi chủng vi khuẩn CT1 chỉ đảm bảo được 25% cho nhu cầu đạm của cây lúa để đạt năng suất như đối chứng dương. Cụ thể hơn, nếu sử dụng chủng KG1 cho cây lúa thì có thể tiết giảm được 50% phân đạm hóa học cho nhu cầu phát triển của cây lúa cao sản, điều này đồng nghĩa với việc giảm chi phí mua 45 kg N/ha (tương đương 97,8 kg urê/ha) nhưng vẫn đảm bảo năng suất tương đương đối chứng dương (NT-100: bón 90 kg N/ha, tương đương 195,6 kg urê/ha). Trong khi đó, nếu sử dụng chủng CT1 sẽ giảm chi phí cho 22,5 kg N/ha (tương đương 48,9 kg urê/ha) nhưng vẫn đảm bảo năng suất như đối chứng dương.

Nếu xét về chất lượng hạt gạo nguyên cám (hàm lượng protein trong gạo), so sánh ở các nghiệm thức có mức bổ sung đạm hóa học như nhau thì nghiệm thức có sử dụng chủng KG1 có giá trị cao hơn và khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức chủng CT1. Riêng nghiệm thức KG1-50% N và KG1-75% N đều cho hàm lượng protein trong gạo cao hơn và khác biệt so với đối chứng dương ở mức ý nghĩa 1%. Như vậy, 2 chủng vi khuẩn *Burkholderia vietnamiensis* KG1 và *Burkholderia vietnamiensis* CT1 đều có khả năng cố định đạm sinh học cung cấp cho nhu cầu đạm trong quá trình sinh trưởng và phát triển của cây lúa cao sản (OM2517) trồng trên đất phù sa ở Nông trường Sông Hậu.

4. KẾT LUẬN

Phân lập được 150 chủng vi khuẩn có khả năng cố định đạm từ đất vùng rẫy lúa ở 13 tỉnh, thành đồng bằng sông Cửu Long. Các chủng vi khuẩn này đều có khả năng tổng hợp amoni. Một số chủng được đánh giá sàng lọc với cây lúa với các mô hình trong ống nghiệm, trong chậu và ngoài đồng đều cho thấy có sự cung cấp đạm sinh học cho quá trình sinh trưởng và phát triển của cây lúa OM2517.

Sử dụng kỹ thuật PCR đặc chủng PolF-115 và PolR-476 đã nhận diện được sự có mặt của gen *nifH* trong một số chủng vi khuẩn được khảo sát. Kết quả giải trình tự ADN và so sánh với ngân hàng dữ liệu NCBI cho thấy cả 4 dòng đều tương đồng di truyền 97 - 100% so với *Burkholderia vietnamiensis* hoặc *Burkholderia kururiensis*. Trong đó, hai dòng KG1 tương đồng 98% với dòng DQ979872 *Burkholderia vietnamiensis* AU0913, dòng CT1 tương đồng 100% với dòng AB568313.1 *Burkholderia vietnamiensis*, dòng KG8 tương đồng 97% với dòng AY098588.1 *Burkholderia brasiliensis* M113, dòng CM1 tương đồng 97% với dòng AY098590.1 *Burkholderia kururiensis* KP23.

Dòng *Burkholderia vietnamiensis* BV3 và *Burkholderia vietnamiensis* BV5 lần lượt có khả năng tiết kiệm 25% N và 50% N khi dùng cho cây lúa cao sản OM2517 trồng trên đất phù sa Nông trường Sông Hậu - Cần Thơ vào vụ hè thu 2016.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cao Ngọc Diệp, Phạm Thị Khánh Vân và Lăng Ngọc Dậu, 2007. Phát hiện vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* nội sinh trong cây lúa mùa đặc sản (*Oryza sativa* L.) trồng ở vùng đồng bằng sông Cửu Long. *Đại học Qui Nhơn*, 5-2007.
2. Dilworth M. J., 1966. Acetylene reduction by nitrogen fixing preparation from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem Biophys Acta* 127: 285-294.
3. Kronzucker H. J., Yaesh S. M. and Anthony D. M., 1999. Nitrat-Amonium synergism in rice, A sub cellular Flux Analysis. *Plant physiology* 119: 1041-1047.
4. Mirza S. M., Mehnaz S., Normand P., Prigent-Combaret C., Moenne-Loccoz Y., Bally R. and Malik K. A., 2006. Molecular characterization and PCR detection of a nitrogen-fixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth. *Biol. Fertil. Soils* (2006) 43:163-170.

5. Neumann B., Pospiech A. and Schairrer H. U., 1992. Rapid isolation of genomic DNA from Gram - negative bacteria. *Trends Genet* 8: 332 - 333.
6. Ngô Thanh Phong, Nguyễn Thị Minh Thu và Cao Ngọc Điệp, 2010. Phân lập và nhận diện vi khuẩn cố định đạm trong đất vùng rẫy lúa trồng trên đất phù sa tỉnh Kiên Giang. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 8(34): 1015-1020.
7. Ngô Thanh Phong, Cao Ngọc Điệp và Trần Thị Xuân Mai, 2011. Phân lập, nhận diện và tuyển chọn vi khuẩn cố định đạm bón cho cây lúa cao sản. *Bộ Giáo dục và Đào tạo*, B2009-16-119.
8. Ngô Thanh Phong, 2012. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cố định đạm *Pseudomonas* spp. từ đất vùng rẫy lúa ở đồng bằng sông Cửu Long và đánh giá hiệu quả trên giống lúa OM2517. *Luận án tiến sĩ, Trường Đại học Cần Thơ*.
9. Nguyễn Thị Lang và Bùi Chí Bửu, 2008. Giống lúa và sản xuất hạt lúa giống tốt. *Nxb Nông nghiệp, thành phố Hồ Chí Minh*.
10. Park M. C., Kim J. and Yang Y., 2005. Isolation and characteration of diazotrophic growth promotion bacteria from Rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiol. Res.* 160: 127- 133.
11. Phạm Văn Sổ và Bùi Thị Nhu Thuận, 1991. Kiểm nghiệm lương thực thực phẩm. *Nxb Đại học Bách khoa, Hà Nội*.
12. Poly F., Joteur M. L. and 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.
13. Trần Văn Vân, Berge O., Ngo Ke S., Balandreau J. and 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.
14. Võ Minh Kha, 2003. Sử dụng phân bón phối hợp cân đối: nguyên lý và giải pháp. *Nxb Nghệ An*.
15. Yabuuchi E., Kosako Y., Yano I. and Nishiuchi Y., 1995. Transfer of two *Burkholderia* and *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen.nov.: Proposal of *Ralstonia pikettii*. *Microbiol Immunol* 39: 897-904.

ISOLATION AND SELECTION OF NITROGEN-FIXING BACTERIA *Burkholderia* sp. FROM RHIZOSPHERE SOIL OF RICE IN THE MEKONG DELTA AND ASSESS THE EFFECT ON HIGH-YIELDING RICE (CV. OM2517) CULTIVATED ON ALLUVIAL SOIL OF SONG HAU FARM, CAN THO CITY

Ngo Thanh Phong¹

¹College of Natural Sciences, Cantho University

Summary

One hundred and fifty isolates were isolated able to synthesize NH_4^+ . Conduct screening these bacteria based on their ability to grow in mineral solution (do not use protein) and in soil pots at the greenhouse, 3/6 strains have identified with the capable of providing 50-75% protein biological needs for the growth of rice in-pots. Using primer FGPS4-28bis and FGPS1509-153 to produce PCR that is applied for 4 prospect isolate strains. Isolates were sequenced, DNA sequencing were compared with GenBank database of NCBI by BLAST N software; the results showed that four isolates were similarity of 97-100% with *Burkholderia vietnamiensis* or *Burkholderia kururiensis*. A field experiment was conducted to evaluate biological nitrogen fixation ability of two isolates (*Burkholderia vietnamiensis* KG1 and *Burkholderia vietnamiensis* CT1) and they were selected from in-vitro and in-pots experiments on high-yielding rice (OM2517) cultivated on alluvial soil of Song Hau farm, Can Tho city in summer-autumn cropping-season 2016. The results showed that KG1 strain had biological nitrogen fixation ability equivalent to 50% inorganic fertilizer while one strain (CT1) only provided 25% nitrogen requirement for rice growth.

Keywords: Alluvial soil, biological nitrogen fixation, *Burkholderia vietnamiensis*, high-yielding rice - cv. OM2517, *nif* gene, rice rhizosphere soils.

Người phản biện: GS.TS. Cao Ngọc Điệp

Ngày nhận bài: 21/7/2017

Ngày thông qua phản biện: 21/8/2017

Ngày duyệt đăng: 28/8/2017