PHÂN LẬP VÀ NHẬN DIỆN MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN CỐ ĐỊNH NITƠ TRÊN CÂY BẮP

Nguyễn Hữu Hiệp[1] và Nguyễn thị Mai Khanh[2]

ABSTRACT

From stems, leaves and roots of maize collected 78 nitrogen-fixing bateria isolates. These isolates have had the same characteristics as those described by previous authors. Using specific primers of NifH gene, 13 isolates were identified as Azospirillum lipoferum and 2 isolates were identified as Burkholderia vietnamiensis. Others have had no DNA band like the positive controls. So they did not belong to these species.

Keywords: maize, PCR technique, Azospirillum lipoferum, Burkholderia vietnamiensis, nitrogen fixation

Title: Isolation and identification of nitrogen fixing bacteria on maize

TÓM TẮT

Từ các bộ phận của cây bắp (rễ, thân, lá), chúng tôi đã phân lập được 78 chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ từ N_2 của không khí. Các chủng vi khuẩn phân lập được có các đặc tính giống như mô tả của các tác giả trước đây.

Sử dụng cặp mồi chuyên biệt gen NifH để nhận diện các chủng vi khuẩn nầy bằng kỹ thuật PCR, chúng tôi nhận thấy có 13 chủng vi khuẩn có băng DNA có kích thước 400bp giống như kích thước DNA của gen NifH của vi khuẩn đối chứng dương Azospirillum lipoferum và 2 dòng vi khuẩn có băng DNA có kích thước 330bp giống như kích thước DNA của gen NifH của vi khuẩn đối chứng dương Burkholderia vietnamiensis. Các chủng vi khuẩn còn lại không có băng DNA giống như của đối chứng dương chứng tỏ chúng không thuộc 2 loài nầy.

Từ khóa: bắp, phân lập, kỹ thuật PCR, Azospirillum lipoferum, Burkholderia vietnamiensis, cố định nitơ

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Bắp (ngô) là loại cây lương thực quan trọng thứ hai sau cây lúa. Diện tích trồng bắp ở Việt Nam năm 2004 là 1triệu ha, Trung Quốc là 2,3 triệu ha, Tandania là 2,7 triệu ha… (hppt://www.DCSVN.vn). Để đạt năng suất cao, nông dân thường sử dụng phân bón hóa học cho cây, trong đó quan trọng nhất là đạm.

Đối với cây trồng nói chung và cây bắp nói riêng, đạm là nguyên tố rất quan trọng ảnh hưởng đến các quá trình sinh trưởng, phát triển và năng suất của cây bắp. Đầy đủ đạm, cây bắp sẽ mọc nhanh, thân lá phát triển tốt, cờ to nhiều phấn, trái nhiều hột. Nếu thiếu đạm, cây tăng trưởng chậm, trái nhỏ, nhiều hột lép (nhất là ở chóp trái), diện tích lá giảm làm cho cây giảm khả năng quang hợp. Do đó, khi trồng bắp người ta thường bón khoảng 180 kg N/ ha, tương ứng với số tiền là 3.910.000.000 VND /ha (mỗi kilogam urea có 46% N, giá: 10.000 VND). Nhưng

[1] Viện nghiên cứu & PT CNSH, Trường Đại học Cần Thơ
[2] Trường CĐ KTKT Cần Thơ

lượng phân bón thường chỉ được hấp thu khoảng 30-40%, lượng phân thừa đi vào chu trình N_2 của trái đất, góp phần làm đất bị chai cứng, lượng đạm Nitrate thừa lại hòa tan vào mạch nước ngầm và chảy ra sông suối làm cho động vật và người bị nhiễm độc…Ngoài ra, phần lớn phân đạm hóa học được sản xuất theo qui trình Haber-Bosh, đòi hỏi một lượng lớn khí tự nhiên, than đá hoặc dầu là những nguồn năng lượng không phục hồi và việc sử dụng chúng sẽ tạo ra một lượng lớn khí CO_2; một trong những nguyên nhân gây ra hiệu ứng nhà kính…(Stoltzfus *et al.*, 1997). Như vậy, bón phân hóa học vừa tốn kém vừa góp phần gây ô nhiễm môi trường. Trong khi đó, lượng N_2 trong không khí chiếm đến 78% mà cây lại không sử dụng được (Osmar *et al.*, 2004). Để giải quyết vấn đề này, trên thế giới hiện nay đang có xu hướng nghiên cứu và sử dụng phân bón sinh học nhờ sự cố định nitơ của một số loài vi khuẩn trong đất, tiêu biểu như một số loài vi khuẩn thuộc giống *Azospirillum* và *Burkholderia* có thể tổng hợp đạm nhờ quá trình cố định nitơ sinh học với enzyme nitrogenase cắt nối ba của phân tử N_2 tạo ra NH_3; tương tự như quá trình cố định nitơ công nghiệp nhưng chúng ta không cần cung cấp năng lượng cho chúng. Chúng có thể làm tăng năng suất trên 20% (Bashan và Levanony, 1990) và làm giảm lượng đạm cần sử dụng từ 1/3-1/2 (Vasuvat *et al.*, 1986). Ngoài ra, chúng còn có thể tổng hợp các kích thích tố tăng trưởng như: IAA, NAA, Gibberellins (Bashan *et al.*, 2004).

Chúng tôi thực hiện đề tài nghiên cứu phân lập và nhận diện các chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ trên cây bắp hướng tới việc sản xuất phân vi sinh cho cây bắp nhằm giảm lượng phân bón hóa học, tiết kiệm chi phí sản xuất cho nông dân và góp phần bảo vệ môi trường, bảo vệ sức khỏe cộng đồng, gia tăng sản lượng, đáp ứng nhu cầu lương thực ngày càng cao của Việt Nam và thế giới.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện nghiên cứu

Địa điểm: Phòng thí nghiệm Vi Sinh Vật, phòng Thí Nghiệm Sinh Học Phân Tử, Viện Nghiên Cứu và Phát Triển Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại học Cần Thơ. Môi trường NFb (Kirchhof *et al.*, 1997) và môi trường Baz (Estrada *et al.*, 2001) sử dụng để phân lập vi khuẩn *Azospirillum và*vi khuẩn *Burkholderia*. Cặp mồi chuyên biệt để nhận diện *Azospirillum lipoferum* được Viện Nghiên Cứu và Phát Triển Công Nghệ Sinh Học Trường Đại học Cần Thơ thiết kế dựa theo trình tự gen *nif*H của vi khuẩn *Azospirillum* gồm, mồi xuôi: 5᾽-GTA AAT CCA CCA CCT CCC-3᾽ và mồi ngược: 5᾽-TGT AGA TTT CCT GGG CCT-3᾽và trình tự gen nif H của vi khuẩn *Burkholderia vietnamiensis*, mồi xuôi 5'-GGC AAG GGC GGT ATC GGC AAG TC-3' và mồi ngược 5'-CCA TCG TGA TCG GGG TCG GGA TG-3'.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phân lập một số chủng vi khuẩn cố định nitơ

Thu mẫu ở các ruộng bắp ở các địa điểm khác nhau, trong mỗi ruộng lấy năm cây (4 cây ở 4 gốc và 1 cây ở giữa ruộng). Mỗi cây lấy cả ba phần: rễ, thân và lá (ghi chú rõ địa điểm và bộ phận của cây), chỉ lấy những cây từ 6 lá đến trước khi trổ cờ. Rửa thật sạch bùn đất bám ở rễ, thân, lá dưới vòi nước chảy, để ráo tự nhiên, để riêng từng bộ phận trong bọc nylon buộc chặt và bảo quản trong tủ lạnh (50C) nếu

chưa phân lập ngay. Cắt các bộ phận thành những khúc nhỏ 2-3cm (để riêng từng bộ phận). Đối với lá, phải cắt bỏ gân chính rồi cắt lá thành những mảnh nhỏ (3x1 cm^2). Sau đó cho mẫu vào chai khử mẫu tiến hành khử trùng bề mặt mẫu: cho Tween 20% vào chai cho vừa ngập mẫu, lắc nhẹ (để mẫu không bị dập) 10 phút, rửa sạch bằng nước cất, tiếp tục khử trùng bằng cồn 700 5 phút, H_2O_2 3 phút rồi rửa thật sạch bằng nước cất vô trùng (6 lần). Nghiền 2g mẫu rồi thêm 0.5-2ml nước cất vô trùng vào cối, để yên 10 phút và hút lấy phần trong cho vào eppendorf, để yên 10 phút cho dịch mẫu lắng xuống và lấy phần nước trong để tiến hành phân lập vào môi trường NFb và Baz bán đặc. Sau 2-3 ngày, ta thấy xuất hiện vòng màu trắng (vòng pellicle), cách bề mặt môi trường 2-5 mm, làm cho môi trường xanh lá dần chuyển sang màu dương. Đó là dấu hiệu của sự phát triển của vi khuẩn. Chuyển vi khuẩn sang môi trường đặc và phân lập đến khi vi khuẩn ròng.

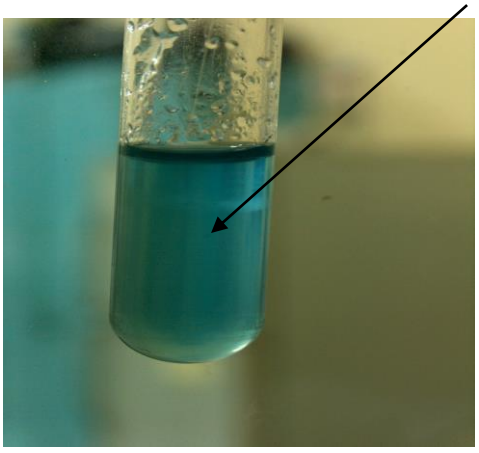
2.2.2 Nhận diện vi khuẩn Azospirillum và Burkholderia bằng kỹ thuật PCR

Trích DNA vi khuẩn và tiến hành nhân DNA bằng máy PCR rồi điện di sản phẩm. Nhận diện vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* và *Burkholderia vietnamiensis* nếu độ dài của DNA vi khuẩn cần nhận diện là 400bp (đối chứng dương *Azospirillum lipoferum*) và 330bp (đối chứng dương *Burkholderia vietnamiensis*)**.** Phản ứng khuếch đại DNA được thực hiện trong thể tích 25 µl. Một phản ứng bao gồm: 10µl nước cất 2 lần, 2.5 µl buffer, 3 µl $MgCl_2$, 4 µl dNTP, 2 µl primer, 0.25 µl BSA, 0.25 µl taq polymerase , 3 µl mẫu ADN. 35 chu kỳ gia nhiệt được thực hiện ở máy PCR Apollo ™ ATC401 Thermal Cycler như sau: 1’ ở 95^0C, 1’ ở 50^0C và 1phút ở 72^0C.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân lập vi khuẩn *Azospirillum* và *Burkholderia*

Các chủng vi khuẩn phân lập được đều sinh trưởng và phát triển trong điều kiện vi hiếu khí và tạo thành một vòng pellicle trắng đục bên dưới môi trường NFb bán đặc 2-5 mm (Hình 1). Đây là những đặc điểm giống với sự mô tả của Bashan và Levanony (1990), Nguyễn Khắc Minh Loan (2005), Đào Thanh Hoàng (2005) và Nguyễn Hữu Hiệp *et al.* (2005). Kết quả, chúng tôi đã phân lập được 78 chủng vi khuẩn ròng.

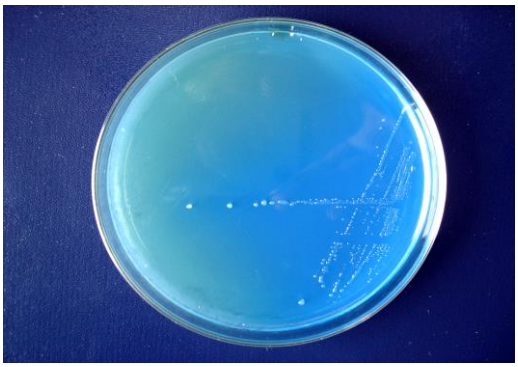


Hình 1: Phân lập vi khuẩn từ

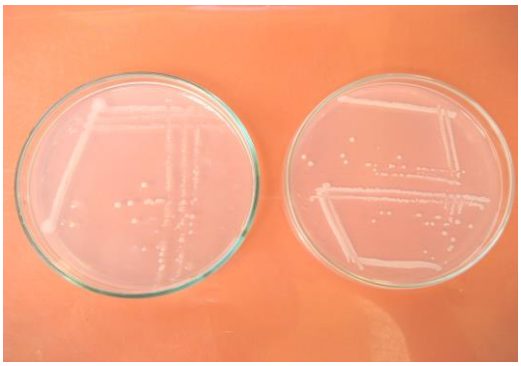
Khuẩn lạc của vi khuẩn có dạng tròn, nhô cao, bìa nguyên và có màu trắng trong, trắng sữa, vàng (Hình 2 và Hình 3).

Các chủng vi khuẩn phân lập được đều thuộc Gram âm, có khả năng chuyển động, hình que ngắn, que ngắn dính nhau thành cặp, bầu dục, hình cầu dính nhau thành chuỗi hay que dài. Kích thước biến thiên từ 2,56-5,13µm x 1,71-2,56µm (Hình 4 và Hình 5) .

môi trường bán đặc



Hình 2: Khuẩn lạc vi khuẩn *Azospirillum*



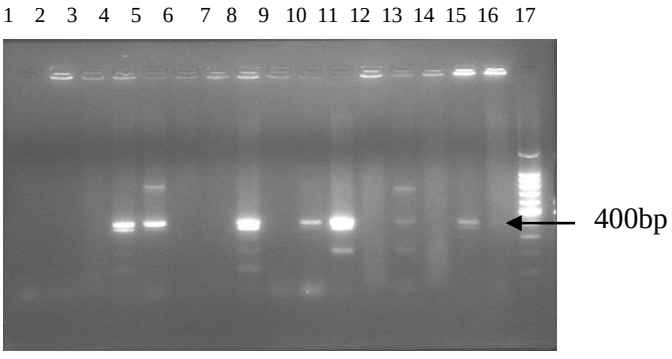
Hình 3: Khuẩn lạc vi khuẩn *Burkholderia*

Hình 4: Vi khuẩn *Azospirillum* chụp dưới kính hiển vi điện tử (x20.000 lần)

Hình 5: Vi khuẩn *Burkholderia* chụp dưới kính hiển vi điện tử (x30.000 lần)

3.2 Nhận diện vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR

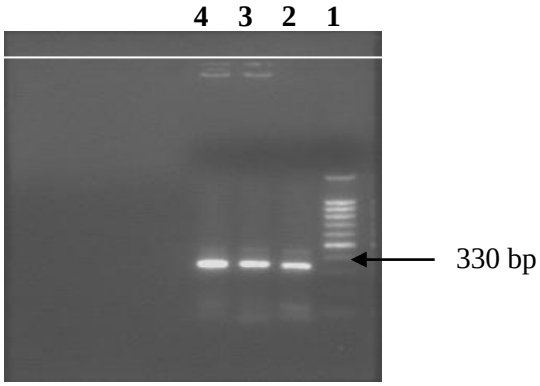
Mười ba trong số bốn mươi tám chủng vi khuẩn cho kết quả điện di sản phẩm PCR ở vị trí đặc hiệu với band DNA ở vị trí 400bp giống như đối chứng dương *Azospirillum lipoferum* (Hình 6).



Ghi chú: 1: đối chứng âm, 4 và 15: Ab28 và Ab22, 16: đối chứng dương, 17: thang 100bp, các giếng còn lại hoặc không phải là *Azospirillum lipoferum* (không có band 400bp hoặc có nhiều band phụ).

Hình 6: Kết quả điện di sản phẩm PCR. với cặp mồi chuyên biệt gen nifH của *Azospirillum lipoferum*

Hai trong số 30 chủng có băng DNA có kích thước 330bp giống như của đối chứng đương dòng *Burkholderia vietnamiensis* TVV 75 (Hình 7).



Ghi chú: :1 thang 100bp; 2: chủng vi khuẩn đối chứng *Burkholderia vietnamiensis* TVV 75; 3 và 4 là các chủng vi khuẩn phân lập được.

Hình 7: Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi chuyên biệt gen *nif*H của *Burkholderia vietnamiensis*

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1 Kết luận

Chúng tôi đã phân lập được 78 chủng vi khuẩn. Trong đó, có 13 chủng là vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* và 2 chủng là vi khuẩn *Burkholderia vietnamiensis*.

Các chủng vi khuẩn phân lập được có các đặc tính giống như mô tả của các tác giả trước đây.

Các chủng vi khuẩn còn lại không có băng DNA giống như của đối chứng dương chứng tỏ chúng không thuộc 2 loài nầy. Tuy nhiên, do thời gian và kinh phí hạn chế chúng tôi chưa kiểm tra xem chúng thuộc loài vi khuẩn nào.

4.2 Đề nghị

Cần được tiến hành thử nghiệm khả năng cố định nitơ của các chủng vi khuẩn *Azospirillum* và *Burkholderia* đã xác định được trên những vùng sinh thái khác nhau để chọn lựa chủng tốt nhất trước khi tiến hành sản xuất phân sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bashan Y. and H.Levanony. 1990. Current status of Azospirillum inoculation technology: Azospirillum as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 36: 591-603.

Bashan Y., G. Holguin and L. E. de-Bashan. 2004. Azospirillum- plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Can. J. Microbiol. 50: 521-577.

Đào Thanh Hoàng. 2005. Phân lập và nhận diện một số dòng vi khuẩn Azospirillum trên cây lúa. Luận văn Thạc sĩ ngành Công Nghệ Sinh Học. Viện Nghiên Cứu và Phát triển Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại học Cần Thơ.

Estrada-de los Santos, P., Bustillos-Cristales R. and Caballero-Mellado, J. 2001. Burkholderia, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. Appl. Environ. Microboil. 67: 2790-2798.

Kirchhof G., V. M. Reis, J. I. Baldani, B. Eckert, J. Dobereiner and A. Hartmann.1997. Occurrence, physiologycal and molecular analysis of endophytic diaztrophic bacteria in gramineous energy plants. Plants and Soil. 194: 45-55.

Nguyễn Hữu Hiệp, Trần Văn Chiêu, Đào Thanh Hoàng và Nguyễn Khắc Minh Loan. 2005. Azospirillum: vi sinh vật cố định đạm với cây không thuộc họ Đậu. Tạp chí Khoa học Cần Thơ. 2 (12): 4-6.

Nguyễn Khắc Minh Loan. 2005. Phân lập một số dòng Azospirillum Cố định đạm trên Lúa. Luận Văn Tốt Nghiệp Cử Nhân Công Nghệ Sinh Học. Viện Nghiên Cứu và Phát triển Công Nghệ Sinh Học- Khoa Khoa Học Trường Đại Học Cần Thơ.

Osmar R., D. Santa, R. F. Hernansdez, G. L. M. Alvarez, P. R. Junior and C. R. Soccol. 2004. Azospirillum sp. Inoculation in Wheat, Barley and Oats Seeds Greenhouse Experiments, Brazilian Archives of Bio. Tech. 47 (6): 843-850.

Stoltzfus J. R., R. So, P. P. Malaravithi, J.K. Ladha and F.J. de Brujin. 1997. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. Plant and Soil. 194: 25-36.

Vasuvat Y., B. Fangcham, S. Siripin, D. Fusang and P. Chanaram.1986. Yield maximization of feed grain by associative N2-fixing bacteria. In: Proceedings of International Serminar on Yield Maximization of Feed Grains Through Soil and Fertilizer Management, Bangkok, Thailand, 12-16 May.