



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.039

## PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN LAM (CYANOBACTERIA) CÓ KHẢ NĂNG CỐ ĐỊNH ĐẠM Ở RUỘNG LÚA TỈNH ĐỒNG THÁP

Nguyễn Thị Hạnh Nguyễn<sup>1\*</sup> và Nguyễn Hữu Hiệp<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tổ Công nghệ Sinh học Môi trường, Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Thị Hạnh Nguyễn (email: hanhnguyen2217@gmail.com)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 15/02/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

### Title:

Isolation and selection of cyanobacteria strains capable of nitrogen-fixation from paddy fields in Dong Thap province

### Từ khóa:

Cố định đạm, *Lyngbya aestuarii*, ruộng lúa, sinh khối, vi khuẩn lam

### Keywords:

Biomass, cyanobacteria, *Lyngbya aestuarii*, nitrogen-fixing, paddy field

### ABSTRACT

The aim of this research was isolation and selection of cyanobacteria strains capable of nitrogen-fixing property which were isolated from soil and water samples of paddy fields in Dong Thap province for microbial fertilizer production. Ten single-cell cyanobacteria isolated belonged to five genera *Synechocystis*, *Gloeocapsa*, *Chroococcus*, *Microcystis* and *Aphanocapsa* and 20 filamentous isolated belonged to four genera *Microcoleus*, *Lyngbya*, *Phormidium* and *Oscillatoria*. These isolates were checked for the nitrogen fixing capacity by culturing on BG11 N-free medium for 30 days showed that 4 single-celled cyanobacteria isolates (HN4, HN11, HN10 and LV4) had cell concentration higher from 5.9 log<sub>10</sub> cell/mL to 6.6 – 7.1 log<sub>10</sub> cell/mL and 6 filamentous cyanobacteria isolates (LVO2, HN7, HN3, HN5, LV5) had dry biomass increased from 0.05 g/50mL to 0.29 – 0.6 g/50mL. Based on morphology and results of 16S rRNA gene-sequencing, promising LV5 strain had 90% similarity with cyanobacteria *Lyngbya aestuarii* PCC 7419.

### TÓM TẮT

Nghiên cứu phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn lam có khả năng cố định đạm từ mẫu đất và nước ở một số ruộng lúa thuộc tỉnh Đồng Tháp để ứng dụng trong sản xuất chế phẩm vi sinh. Kết quả phân lập được 10 dòng đơn bào thuộc 5 chi *Synechocystis*, *Gloeocapsa*, *Chroococcus*, *Microcystis*, *Aphanocapsa* và 20 dòng dạng sợi thuộc 4 chi *Microcoleus*, *Lyngbya*, *Phormidium*, *Oscillatoria*. Kết quả khảo sát sự tăng trưởng của các dòng vi khuẩn lam này trên môi trường không đạm BG11 trong 30 ngày cho thấy 4 dòng vi khuẩn lam đơn bào (HN4, HN11, HN10 và LV4) đạt mật số cao hơn ban đầu (từ 6,6 – 7,1 log<sub>10</sub> cell /mL so với 5,9 log<sub>10</sub> cell/mL ban đầu), 6 dòng vi khuẩn lam dạng sợi (LVO2, HN7, HN3, HN5, LV5, LV9) đạt sinh khối khô cao gấp 5,6 – 7,2 lần so với lượng ban đầu (tương ứng từ 0,29 – 0,36 g/50mL so với 0,05 g/50mL ban đầu). Dựa vào đặc điểm hình thái và kết quả giải trình tự gen 16S rRNA, dòng vi khuẩn lam triển vọng LV5 có độ tương đồng 90% với loài vi khuẩn lam *Lyngbya aestuarii* PCC 7419.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Hạnh Nguyễn và Nguyễn Hữu Hiệp, 2019. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lam (cyanobacteria) có khả năng cố định đạm ở ruộng lúa tỉnh Đồng Tháp. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(2): 20-26.

## 1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn lam là một trong những nhóm sinh vật xuất hiện rất sớm trên Trái đất và hầu như có mặt ở tất cả các hệ sinh thái (Summons *et al.*, 1999). Vi khuẩn lam được mô tả như là các vi sinh vật nhân sơ quang tự dưỡng có chứa diệp lục tố. Hình dạng tế bào dinh dưỡng của vi khuẩn lam rất đa dạng như hình cầu, hình thoi hay hình ống. Cấu tạo cơ thể có thể là đơn bào hay đa bào dạng sợi. Nhiều vi khuẩn lam dạng sợi hay đơn bào tổng hợp các enzyme nitrogenase và có thể cố định được nitrogen tự do thành ammonium  $N-NH_4^+$ . Khả năng cố định đạm được ghi nhận ở những vi khuẩn lam có dị bào như *Nostoc*, *Anabaena*, *Aulosira* hay ở một số loài đơn bào như *Gloeocapsa*, *Aphanothece*, *Gloeothece* và cả ở một số loài vi khuẩn lam dạng sợi không có dị bào *Oscillatoria* và *Plectonema* (Issa *et al.*, 2014). Chi vi khuẩn lam đơn bào *Gloeothece* đã được nghiên cứu rộng rãi cho thấy hoạt động của enzyme nitrogenase và quang hợp tạo oxy vẫn cùng tồn tại trong một loại tế bào đơn. Theo nghiên cứu của Pearson *et al.* (1979), loài vi khuẩn lam dạng sợi không dị bào *Microcoleus chthonoplastes* vẫn có khả năng cố định đạm. Vi khuẩn lam có thể đóng góp khoảng 20 – 30 kg N/ha/vụ canh tác cho đất lúa. Thông thường, việc sử dụng vi khuẩn lam sống tự do được ưa chuộng ở các vùng nhiệt đới và được áp dụng ở hầu hết các nước châu Á. Ngoài lúa, các cây trồng khác như: rau, lúa mì, lúa miến, ngô, bông, mía cũng đáp ứng với phân sinh học vi khuẩn lam (Issa *et al.*, 2014). Hiện nay tại Việt Nam nói chung cũng như tỉnh Đồng Tháp nói riêng, tình hình đất nông nghiệp đang bị thoái hóa, mất chất đạm sau một thời gian dài bị khai thác kiệt quệ với thói quen lạm dụng phân hóa học trong canh tác. Một trong những giải pháp được đề ra để nâng cao chất lượng đất thoái hóa là sử dụng các chế phẩm vi sinh cụ thể là vi sinh cố định đạm. Việc bón các chế phẩm vi sinh vào đất góp phần cải thiện phẩm chất của đất, bổ sung lại nguồn dinh dưỡng trong đất giúp cây trồng sinh trưởng tốt hơn và còn thân thiện với môi trường. Với khả năng cố định đạm đã được ghi nhận, vi khuẩn lam là ứng viên tiềm năng cho việc sản xuất chế phẩm vi sinh để cải thiện năng suất cây trồng cũng như nâng cao sức khỏe đất một cách bền vững.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu nghiên cứu

Các mẫu đất và nước từ ruộng lúa được thu ở các vùng canh tác lúa trọng điểm của tỉnh Đồng Tháp như Lấp Vò, Lai Vung và Hồng Ngự.

## 2.2 Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1 Phân lập, quan sát đặc điểm hình thái và phân loại vi khuẩn lam cố định đạm

Hấp khử trùng đĩa Petri có lót 2 lớp giấy lọc, trải đều mẫu lên đĩa và tưới dung dịch môi trường BG11 cố định vào cho đủ ẩm (đối với mẫu đất) hay cho mẫu vào đĩa Petri và thêm môi trường BG11 cố định vào khoảng nửa đĩa (đối với mẫu nước). Môi trường BG11 đã được bổ sung 50 mg/L cycloheximide + 5 mg/L kanamycin (Kato *et al.*, 2014) để hạn chế sự phát triển của nấm và vi khuẩn khác trong mẫu ban đầu. Đặt đĩa Petri dưới đèn neon, nhiệt độ phòng. Sau khoảng 10 – 14 ngày, sinh khối vi khuẩn lam xuất hiện trên bề mặt đất hay trong nước thành những mảng màu xanh, dùng que cấy đã khử trùng gạt lấy vi khuẩn lam và chuyển vào đĩa Petri khác có lót giấy lọc với dung dịch môi trường BG11 không định. Sau 7 – 10 ngày, các vi khuẩn lam có khả năng phát triển trên môi trường BG11 không định sẽ được cấy chuyển sang đĩa Petri mới. Tiến hành phân lập các dòng vi khuẩn lam thuần khiết sử dụng phương pháp phân lập tế bào đơn bằng micropipette (Andersen and Kawachi, 2005). Phân loại vi khuẩn lam dựa vào đặc điểm hình thái và khóa phân loại Desikachary (1959).

**Bảng 1: Thành phần môi trường BG11 (Rippka *et al.*, 1979)**

	Thành phần	Nồng độ (g/L)
Môi trường BG11*	NaNO <sub>3</sub>	1,5
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,04
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,075
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,036
	Citric acid	0,006
	Ammonium ferric citrate	0,006
	EDTA	0,001
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,02
	Stock vi lượng A5 + Co	1 mL/L
	pH	7,2 – 7,4
Stock vi lượng A5 + Co	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,222
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,390
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,079
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0494

\*Trường hợp pha môi trường BG11 không định thì không bổ sung NaNO<sub>3</sub>

### 2.2.2 Khảo sát khả năng tăng trưởng của các dòng vi khuẩn lam trong môi trường không định

Đối với vi khuẩn lam dạng sợi: cân 0,05 g sinh khối khô vi khuẩn lam cho vào cốc có đậy nắp chứa 50 mL môi trường BG11 không định. Xác định sinh khối khô của vi khuẩn lam vào ngày thứ 10, 20 và

30 sau khi nuôi. Sinh khối vi khuẩn lam được lọc bằng giấy lọc, để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng, sau đó được cân và ghi nhận số liệu. Đơn vị tính: g/50 mL.

Đối với vi khuẩn lam dạng đơn bào: cho dung dịch vi khuẩn lam (mật số  $5,9 \log_{10}$  tế bào/mL) vào cốc có đáy nắp chứa môi trường BG11 không đậm với tỷ lệ 20%. Tiến hành xác định mật số của vi khuẩn lam bằng buồng đếm hồng cầu vào ngày thứ 10, 20 và 30 sau khi nuôi. Đơn vị tính:  $\log_{10}$  tế bào/mL.

Do đặc tính phát triển của hai dạng vi khuẩn lam dạng sợi và đơn bào không giống nhau nên áp dụng phương pháp đo sinh khối khác nhau cho mỗi dạng. Vi khuẩn lam đơn bào sau khi nuôi 30 ngày trong thí nghiệm nhận thấy khối lượng sinh khối rất nhỏ nên chọn cách thức đo mật độ tế bào để so sánh trong cùng dạng đơn bào.

### 2.2.3 Khảo sát ảnh hưởng của các dòng vi khuẩn lam cố định đậm lên sự tăng trưởng của lúa trong điều kiện in vitro

Thí nghiệm thực hiện trên giống lúa IR 50404. Xử lý hạt giống bằng cách ngâm hạt trong nước ấm 24 giờ, sau đó chuyển hạt sang đĩa Petri có lót giấy khử trùng, tưới nước cho ẩm hạt và ủ trong 48 giờ ở nhiệt độ phòng để hạt nảy mầm. Tiếp theo, chọn các hạt nảy mầm tương đối bằng nhau về chiều dài rễ cũng như thân mầm để ngâm trong sinh khối vi khuẩn lam (được nuôi cấy sau 30 ngày) trong 6 giờ. Sau đó, cấy mỗi hạt vào ống nghiệm chứa 15 mL môi trường Yoshida không đậm (Yoshida *et al.*, 1976). Quan sát trong 10 ngày, ghi nhận các chỉ tiêu chiều cao cây, chiều dài rễ, khối lượng cây (khối lượng thân và lá), khối lượng rễ. Thí nghiệm lặp lại 3 lần với mỗi dòng vi khuẩn lam.

Nghiệm thức đối chứng:

- Nước cất (NC): hạt lúa đã nảy mầm được ngâm trong 10 mL nước cất;
- Đối chứng âm (ĐC-) không bổ sung đậm: hạt lúa đã nảy mầm được ngâm trong 10 mL dung dịch môi trường BG11 không đậm;
- Đối chứng dương (ĐC+) có bổ sung đậm: hạt lúa đã nảy mầm được ngâm trong 10 mL dung dịch môi trường BG11 với lượng đậm 1,5 g/L.

### 2.2.4 Định danh các vi khuẩn lam cố định đậm bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Các dòng vi khuẩn lam có khả năng cố định đạm cao được ly trích DNA (Fiore *et al.*, 2000), tiến hành phản ứng PCR (Polymerase Chain Reaction) đoạn gene 16SrDNA với cặp mồi có trình tự mồi xuôi 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3' và mồi

ngược 1492R: 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACT-3'. Sản phẩm PCR được gửi giải trình tự tại Công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa. Sau đó, kết quả trình tự được so sánh với dữ liệu ngân hàng gene NCBI từ đó xác định đến cấp độ loài. Số liệu thí nghiệm được phân tích phương sai (ANOVA) với kiểu bố trí thí nghiệm hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD - Complete Randomized Design) sử dụng gói phần mềm Statgraphics Centurion XVI.II.

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Kết quả phân lập, quan sát đặc điểm hình thái và phân loại vi khuẩn lam cố định đậm

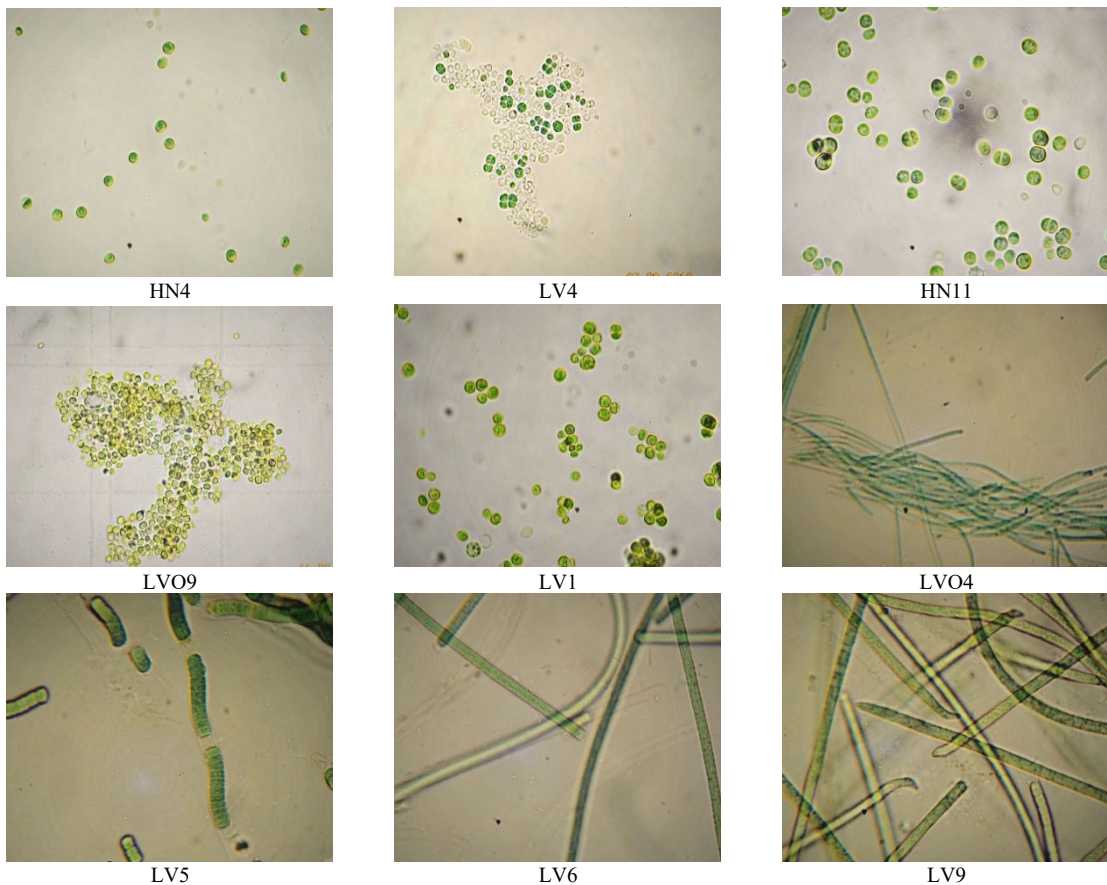
Nghiên cứu đã phân lập được 30 dòng vi khuẩn lam từ 36 mẫu đất và nước thu tại 3 huyện thuộc tỉnh Đồng Tháp. Tất cả 30 dòng vi khuẩn lam đều có khả năng phát triển trên môi trường BG11 không đậm, trong đó có 20/30 dòng dạng sợi và 10/30 dòng dạng đơn bào.

Kích thước tế bào của các dòng vi khuẩn lam đơn bào dao động từ 3,42 – 10,26  $\mu\text{m}$ . Bề rộng trichome của các dòng vi khuẩn lam dạng sợi dao động từ 3,42 – 6,84  $\mu\text{m}$ . Đa số các dòng vi khuẩn lam (8 đơn bào và 17 dạng sợi) đều có đặc điểm tế bào có bao, các dòng vi khuẩn lam không có bao chiếm ít hơn (2 đơn bào và 3 dạng sợi). Về màu sắc, các dòng vi khuẩn lam có màu sắc từ vàng xanh, xanh nhạt đến xanh đậm hay xanh đen. Các dòng vi khuẩn lam dạng sợi thấy có lớp nhầy trên bề mặt so với những dòng còn lại. Sự khác biệt về màu sắc của các dòng vi khuẩn lam có thể do tỷ lệ các sắc tố của chúng khác nhau. Vi khuẩn lam có chứa hai sắc tố phycocyanin (màu lam) và phicoerythrin (màu đỏ) khác nhau ở vài chi tiết trong quang phổ hấp thụ. Hai sắc tố ấy đi đôi theo thành phần thay đổi tùy loài và tùy môi trường nên vi khuẩn lam có màu thay đổi. Trong thí nghiệm, các dòng vi khuẩn lam được nuôi trong cùng điều kiện môi trường nên sự khác nhau về màu sắc có thể cho thấy chúng thuộc những loài khác nhau.

Từ các đặc điểm hình thái đã ghi nhận kết hợp với khóa phân loại của Desikachary (1959) các dòng vi khuẩn lam được phân loại như sau: ba mươi dòng vi khuẩn lam đã phân lập được thuộc lớp Cyanophyceae. Trong đó: 20 dòng dạng sợi thuộc lớp phụ 2: Hormogonophycideae, bộ Nostocales, họ Oscillatoriaceae; 10 dòng đơn bào thuộc lớp phụ 1: Coccogonophycideae, bộ Chroococcales, họ Chroococcaceae. Kết quả phân loại đến chi cho thấy, 30 dòng vi khuẩn lam thuộc 9 chi được tóm tắt cụ thể trong Bảng 2.

**Bảng 2: Kết quả phân loại các dòng vi khuẩn lam**

STT	Dạng	Dòng vi khuẩn lam	Chi
1	Đơn bào	HN4, HN10	<i>Synechocystis</i>
2		LV4	<i>Gloeocapsa</i>
3		HN11, LVO3	<i>Chroococcus</i>
4		LV10, LVO7, LVO9	<i>Microcystis</i>
5		LV1, HN8	<i>Aphanocapsa</i>
6	Dạng sợi	HN1, LVO4	<i>Microcoleus</i>
7		HN9, LV2, LV5, LV7, LV8, LVO1, LVO6, LVO8	<i>Lyngbya</i>
8		HN3, HN6, LV3, LV6, LVO2	<i>Phormidium</i>
9		HN2, HN5, HN7, LV9, LVO5	<i>Oscillatoria</i>



**Hình 1: Đặc điểm vi thể một số dòng vi khuẩn lam quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 40×**

Trong kết quả nghiên cứu, không có dòng vi khuẩn lam cố định đậm có dị bào được phân lập (Hình 1). Điều này có thể do các mẫu chỉ được thu thập vào một mùa nên sự đa dạng của các loài vi khuẩn lam bị hạn chế (Watanabe, 1961). Tuy nhiên, các dòng vi khuẩn lam cố định đậm đơn bào và dạng sợi không có dị bào đã phân lập được cũng thuộc các chi vi khuẩn lam cố định đậm đã được ghi nhận như: *Gloeocapsa*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Microcoleus*, *Phormidium*, *Aphanocapsa*, *Chroococcus*, *Gloeocapsa*, *Microcystis*, *Synechocystis* (Hasan, 2012).

**3.2 Kết quả khảo sát khả năng tăng trưởng các dòng vi khuẩn lam trong môi trường không đậm**

Trong môi trường BG11 lỏng không đậm, mật số vi khuẩn lam đơn bào và sinh khối khô vi khuẩn lam dạng sợi đều tăng dần sau thời gian 10 ngày, 20 ngày và cao nhất vào 30 ngày sau khi nuôi. Ở ngày thứ 30, 4 dòng vi khuẩn lam đơn bào LV03, LV4, HN10, HN11 và HN4 đạt mật độ từ 6,61 – 7,13 log<sub>10</sub> tế bào/mL cao hơn so với mật độ ban đầu 5,9 log<sub>10</sub> tế bào/mL (Bảng 3) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng đơn bào còn lại.

**Bảng 3: Mật độ tế bào của các dòng vi khuẩn lam đơn bào sau 10, 20 và 30 ngày nuôi cấy**

Ký hiệu	Mật độ tế bào ( $\log_{10}$ tế bào/mL)		
	Ngày 10	Ngày 20	Ngày 30
HN4	6,88a	7,08a	7,13a
HN8	6,35c	6,31de	6,55de
HN10	6,73ab	6,78b	6,84b
HN11	6,62b	6,95ab	7,05a
LV1	6,15d	6,23e	6,33de
LV4	6,40c	6,53c	6,63c
LV10	5,95g	6,16f	6,42d
LVO3	6,28cd	6,51cd	6,61c
LVO7	6,17d	6,19e	6,22f
LVO9	5,99e	6,31e	6,45d
CV (%)	0,85	1,06	0,78

Các giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trong cùng một cột có ký tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 95%

**Bảng 4: Sinh khối trung bình của các dòng vi khuẩn lam dạng sợi sau 10, 20 và 30 ngày nuôi cấy**

Ký hiệu	Sinh khối khô (g/50mL)		
	Ngày 10	Ngày 20	Ngày 30
HN1	0,13de	0,07gh	0,06h
HN2	0,02fg	0,05h	0,06h
HN3	0,21ab	0,28a	0,32ab
HN5	0,18bc	0,26ab	0,29b
HN6	0,12de	0,25ab	0,22cd
HN7	0,14cde	0,27a	0,36a
HN9	0,14cde	0,15de	0,18cdef
LV2	0,06f	0,1efgh	0,19cde
LV3	0,18bc	0,21bc	0,22c
LV5	0,15cd	0,26ab	0,29b
LV6	0,01g	0,12efg	0,02h
LV7	0,14cde	0,19cd	0,21cd
LV8	0,1e	0,15cde	0,17def
LV9	0,15cde	0,26ab	0,28b
LVO1	0,05fg	0,19cd	0,19cde
LVO2	0,23a	0,28a	0,36a
LVO4	0,12de	0,15de	0,13fg
LVO5	0,14cde	0,13ef	0,16ef
LVO6	0,05fg	0,19cd	0,18cde
LVO8	0,06f	0,07fgh	0,11g
CV (%)	20,6	17,6	12,2

Các giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trong cùng một cột có ký tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 95%

Ở nhóm vi khuẩn lam dạng sợi, 6 dòng đạt sinh khối khô cao khác biệt có ý nghĩa là: LV9, LV5, HN5, HN3, HN7, LVO2 trong khoảng từ 0,29 – 0,36 g/50mL tăng 5,6 – 7,2 lần so với lượng sinh khối bổ sung ban đầu 0,05 g/50mL (Bảng 4). Nguyễn Thị Kiều Đông (2006) khi khảo sát khả

năng tăng trưởng của các dòng vi khuẩn lam đạt sinh khối lần lượt là 0,05 – 0,75 (g/50mL) và 0,46 – 0,55 (g/50mL).

**3.3 Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các dòng vi khuẩn lam cố định đạm lên sự tăng trưởng của lúa trong điều kiện in vitro**

Tiến hành thí nghiệm và so sánh thống kê riêng biệt cho từng nhóm vi khuẩn lam đơn bào và dạng sợi nhằm chọn được cả hai dạng cho kết quả tốt. Ở mỗi chỉ tiêu ghi nhận, các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn lam và ĐC+ đều cho kết quả cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức không bổ sung đạm và nghiệm thức nước cất. Từ số liệu thu nhận được (Bảng 5 và Bảng 6), nghiệm thức có vi khuẩn lam HN11, HN4 và dạng sợi LV5 cho kết quả tốt nhất. Đây có thể là các dòng vi khuẩn lam có khả năng cố định đạm tiềm năng cho việc nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh.

Kết quả ghi nhận ở nghiệm thức không đạm và nước cất cho thấy cây lúa có dấu hiệu bị vàng lá, lá lúa ngắn, rễ còi cọc, thân cây chậm phát triển và chết dần. Với các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn lam, cây lúa phát triển tốt, lá xanh, thân cây vươn cao tương tự như ở nghiệm thức có bổ sung đạm. Điều này chứng tỏ nhiều dòng vi khuẩn lam cố định đạm cả dạng đơn bào và dạng sợi có ảnh hưởng tốt, hỗ trợ cho quá trình tăng trưởng của cây lúa. Các dòng vi khuẩn dạng sợi: HN3, HN5, LV5 và đơn bào: HN4, HN11 cho kết quả cao hơn ĐC+ có bổ sung đạm hóa học. Kết quả này tương tự như nghiên cứu về ảnh hưởng của vi khuẩn lam cố định đạm lên cây lúa của Nguyễn Hồng Ái Vy (2015). Từ kết quả khảo sát ở cả hai nhóm vi khuẩn lam đơn bào và dạng sợi, 3 dòng vi khuẩn lam cho kết quả tốt nhất là: HN11, HN4 và LV5 được chọn để tiến hành định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử.

**Bảng 5: Ảnh hưởng của vi khuẩn lam đơn bào lên sự tăng trưởng của lúa**

Nghiệm thức	Chỉ tiêu theo dõi			
	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng cây (mg)	Khối lượng rễ (mg)
HN4	17,1a	8,0a	53,8a	13,8ab
HN10	16,4a	6,3bc	61,8a	12,2bc
HN11	17,3a	7,2abc	65,2a	15,2a
LV4	17,6a	7,3abc	61,0a	13,5b
ĐC+	18,8a	7,5ab	61,8a	10,9c
ĐC-	8,2b	6,0cd	33,7b	8,7d
NC	7,4b	4,8d	24,3b	6,3e
CV (%)	9,9	11,9	13,6	8,3

Các giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trong cùng một cột có ký tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 95%

**Bảng 6: Ảnh hưởng của vi khuẩn lam dạng sợi lên sự tăng trưởng của lúa**

Nghiệm thức	Chỉ tiêu theo dõi			
	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng cây (mg)	Khối lượng rễ (mg)
HN3	19,6a	6,4b	76,0ab	13,2bc
HN5	18,3ab	7,1ab	78,4a	14,1bc
HN7	18,7ab	7,1ab	74,7ab	15,1b
LV5	17,1b	8,4a	64,1abc	18,6a
LV9	17,8ab	7,4ab	58,3c	13,4bc
LVO2	18,8ab	6,8b	74,8ab	14,8b
ĐC+	18,8ab	7,5ab	61,8bc	10,9cd
ĐC-	8,2c	6,0bc	33,7d	8,7de
NC	7,4c	4,8c	24,3d	6,3e
CV (%)	7,7	13,2	15,2	15,3

Các giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trong cùng một cột có ký tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 95%

**3.4 Kết quả định danh các dòng vi khuẩn lam bằng kỹ thuật sinh học phân tử**

Sau khi so sánh trình tự gene với ngân hàng dữ liệu trên NCBI (National Center for Biotechnology Information) bằng công cụ BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide) và kết hợp với định danh bằng hình thái, xác định được dòng LV5 có mức độ đồng hình 90% với loài *Lyngbya aestuarii* PCC 7419. Theo nghiên cứu của Green *et al.* (1974) từ bề mặt bùn ở Mexico đã phân lập được 3 chi vi khuẩn lam có khả năng cố định đạm *Calothrix*, *Anabaena* và *Lyngbya* – sau này được biết đến là *Lyngbya aestuarii*.

Pott và cộng sự (1979) nhận thấy rằng, thảm vi khuẩn lam dạng sợi không dị bào bao gồm: *Lyngbya aestuarii*, *Phormidium* sp., *Hydrocoleus* sp., *Hyella balani* và *Schizothrix* sp. cho tỉ lệ cố định nitrogen cao hơn cả *Scytonema* và *Calothrix*. *Lyngbya aestuarii* cũng đã được báo cáo là có khả năng cố định đạm hiệu quả trong nghiên cứu của Paerl và cộng sự (1991). Bên cạnh đó, trong một số nghiên cứu, loài vi khuẩn lam *Lyngbya aestuarii* PCC 7419 được ghi nhận là có mang gene *nif* – một gene liên quan tới sự cố định đạm (Woebken *et al.*, 2015).

**4 KẾT LUẬN**

Từ 36 mẫu đất và nước thu tại các ruộng lúa tỉnh Đồng Tháp, đề tài phân lập được 30 dòng vi khuẩn lam có khả năng phát triển trên môi trường BG11 không đạm, trong đó có 10 dòng vi khuẩn lam có tạo sinh khối cao nhất trên môi trường không đạm. Các dòng này có ảnh hưởng tích cực đến sự sinh trưởng của lúa ở các chỉ tiêu chiều cao cây, chiều dài rễ, khối lượng cây và khối lượng rễ. Sau khi định danh sinh học phân tử, dòng LV5 có độ đồng hình 90% với loài *Lyngbya aestuarii* PCC 7419.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Andersen, R.A. and Kawachi, M., 2005. Traditional microalgae isolation techniques. *In: Anderson, R.A. (Editor). Algal culturing techniques.* Elsevier, 90-99.

Desikachary, T.V., 1959. Cyanophyta. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi.

Fiore, M. F., Moon, D. H., Tsai, S. M., Lee, H. and Trevors, J. T., 2000. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. *Journal of Microbiological Method.* 39(2): 159-169.

Green, F. and Edmisten, J., 1974. Seasonality of nitrogen fixation in Gulf Coast Salt Marshes. *In: Helmut Lieth (Editor). Phenology and seasonality modeling.* Springer, Berlin, Heidelberg . 113-126.

Hasan, M. A., 2012. Investigation on the nitrogen fixing cyanobacteria (BGA) in rice fields of North-West Region of Bangladesh. I: Nonfilamentous. *Journal of Environmental Science and Natural Resources.* 5(2): 185-192.

Issa, A.A., Abd-Alla, M. H. and Ohyama, T., 2014. Nitrogen fixing cyanobacteria: future prospect. *In: Takuji Ohyama (Editor). Advanced in biology and ecology of nitrogen fixation.* Intech. 23-47.

Kato, H., Yokoshima, M., Kimura, S., Furukawa, J., Tomita-Yokotani, K., Yamaguchi, Y. and Takenaka, H., 2014. Utilization of the terrestrial cyanobacteria. 44<sup>th</sup> International Conference on Environmental Systems. Tucson, Arizona. 255-260.

Nguyễn Hồng Ái Vy, 2015. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lam có khả năng cố định đạm trong đất trồng lúa huyện Châu Thành, tỉnh Đồng Tháp. Báo cáo Nghiên cứu khoa học, nhóm ngành: Môi trường và Tài nguyên thiên nhiên, Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.

Nguyễn Thị Kiều Đông, 2006. Phân lập một số chủng vi khuẩn lam có tế bào dị hình trong đất trồng lúa huyện Hưng Nguyên và nghiên cứu ảnh hưởng của chúng lên sự sinh trưởng, phát triển

- và năng suất giống lúa Khải Phong. Luận văn tốt nghiệp Thạc sĩ Sinh học chuyên ngành Thực vật. Đại học Vinh. Nghệ An.
- Paerl, H. V., Prufert, L. E. and Ambrose, W. W., 1991. Contemporaneous N<sub>2</sub> fixation and oxygenic photosynthesis in the nonheterocystous mat-forming cyanobacterium *Lyngbya aestuarii*. Applied and Environmental Microbiology. 57(11): 3086-3092.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. and Stainer, R. Y., 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. Journal of General Microbiology. 111(1): 1-61.
- Summons, R. E., Jahnke, L. L., Hope, J. M. and Logan, G. A., 1999. 2-Methylhopanoids as biomarkers for cyanobacterial oxygenic photosynthesis. Nature. 400: 554-557.
- Watanabe, A., 1961. Collection and cultivation of nitrogen-fixing blue-green algae and their effect on the growth and crop yield of rice plants. Studies from the Tokugawa Institute, Tokyo. 9: 162-166.
- Woeckel, D., Burow, L.C., Behnam, F., et al., 2015. Revisiting N<sub>2</sub> fixation in *Guerrero negro* intertidal microbial mats with a functional single-cell approach. Journal of International Society for Microbial Ecology. 9(2): 485-496.
- Yoshida, S., Forno, D.A., Cock, J. H. and Gomez, K. A., 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice. The International Rice Research Institute. 61-66.
- Pearson, H.W., Howsley, R., Kjeldsen, C.K. and Walsby, A.E., 1979. Aerobic nitrogenase activity associated with a non-heterocystous filamentous cyanobacterium. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters, 5(3): 163- 167.