

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG CỐ ĐỊNH ĐẠM TỪ ĐẤT TRỒNG NGÔ

Nguyễn Thị Thúy Nhi, Nguyễn Thái Pháp, Dương Vi Ngọc, Nguyễn Minh Trí*

Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

TÓM TẮT

Sử dụng phân hóa học nhiều sẽ dẫn đến nhiều bất lợi cho môi trường như đất bạc màu, bị chai hóa, khả năng giữ nước kém, ảnh hưởng đến chất lượng nông sản. Để giảm thiểu sử dụng phân hóa học, việc tìm kiếm những chủng vi khuẩn có khả năng cố định đạm nhằm thay thế một phần phân hóa học là rất cần thiết.

Từ 9 mẫu đất trồng ngô ở thành phố Huế, huyện Hương Trà và huyện Quảng Điền, chúng tôi đã phân lập được 41 chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen. Số lượng vi khuẩn cố định nitrogen trong các mẫu đất dao động từ $15,82 \times 10^5$ - $35,47 \times 10^5$ CFU/g đất khô. Đã tuyển chọn được chủng M21 phân lập từ đất trồng ngô ven sông có khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường Ashby dịch thể với hàm lượng $N-NH_4^+$ tích lũy cao nhất (272,34 mg/L). Bằng phương pháp phân tích trình tự gen và so sánh với ngân hàng dữ liệu NCBI, chủng M21 được xác định là loài *Curtobacterium luteum* M21. Chủng *Curtobacterium luteum* M21 thể hiện sự tích lũy $N-NH_4^+$ cao nhất là sau 72 giờ nuôi cấy, pH tối thích là 5,5 và nhiệt độ tối ưu là 35°C . Nghiên cứu này còn cho thấy ở mật độ 10^6 CFU/mL sau 4 ngày tác động đã kích thích hạt ngô nảy mầm đạt tỷ lệ 100%.

Từ khóa: Cố định đạm, *Curtobacterium luteum*, đất trồng ngô, vi khuẩn

MỞ ĐẦU

Ngô là cây lương thực đứng hàng thứ 2 sau lúa gạo ở nước ta, đất trồng ngô chủ yếu là đất bãi bồi ven sông, đất ruộng một vụ, đất vườn, đất đồi... Cây ngô có nhu cầu phân bón rất lớn, tuy nhiên khi bón nhiều phân hóa học cho cây sẽ gây ra ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng đến sức khỏe con người và động vật (Ngô Hữu Tình, 2003). Bên cạnh đó hiện nay giá phân hóa học cao sẽ dẫn đến chi phí cho sản xuất trong canh tác cây trồng tăng lên. Hơn nữa, việc sử dụng phân hóa học với liều lượng cao có thể làm cho hàm lượng NO_3^- trong sản phẩm vượt quá mức cho phép, gây ảnh hưởng không tốt đến sức khỏe người sử dụng. Do đó, việc tìm kiếm nguồn phân bón mới để thay thế phần nào phân bón hóa học là vấn đề cấp thiết.

Trong những năm gần việc nghiên cứu các loài vi khuẩn có khả năng làm tăng năng suất cây trồng, đồng thời hạn chế được những độc tính cho đất khi việc sử dụng phân bón hóa học ngày càng gia tăng. Đặc biệt là các nhóm vi khuẩn lưu trú ở vùng rễ của cây trồng. Nhóm vi khuẩn này có khả năng cố định nitrogen, phân giải phosphate... tổng hợp nhiều chất kích thích sinh trưởng thực vật như IAA (Indole-3-acetic acid), GA3 (Gibberellic)... góp phần nâng cao độ phì của đất, kích thích tăng trưởng, tăng năng suất cây trồng, hạn chế bón phân hóa học, góp phần phát triển nền nông nghiệp sinh thái bền vững.

Xuất phát từ thực tế trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn cố định nitrogen trong đất trồng ngô ở thành phố Huế và vùng phụ cận nhằm tuyển chọn được chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen tốt, làm cơ sở để sản xuất các loại phân bón sinh học cho cây ngô, giảm lượng phân hóa học nhằm phát triển một nền nông nghiệp hữu cơ bền vững

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chủng vi khuẩn cố định nitrogen phân lập từ đất trồng ngô ở Thừa Thiên Huế và hạt giống ngô nếp Cồn Hến là giống ngô địa phương tại Thừa Thiên Huế (Trịnh Thị Sen, 2020).

Phương pháp

Thu mẫu đất: 9 mẫu đất xung quanh rễ cây ngô được lấy ở những vùng đất trồng ngô ven sông, đất vườn, đất đồi và đất trồng lúa tại thành phố Huế, huyện Hương Trà và huyện Quảng Điền vào tháng 2/2024. Thu mẫu vào lúc cây ngô bắt đầu trổ cờ, loại bỏ lớp đất bề mặt xung quanh gốc cây, lấy khoảng 500g đất xung quanh rễ ở độ sâu 20cm. Các mẫu đất được đưa về phòng thí nghiệm và hong khô trong không khí ở nhiệt độ phòng, sau đó sàng qua rây có kích cỡ 1mm và bảo quản ở 4°C .

Phân lập và nuôi cấy vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen

Hòa tan 1g đất rồi pha trong 9mL nước cất vô trùng, để ổn định ở 30°C trong 15 phút rồi pha loãng mẫu đến nồng độ 10^{-6} , cấy trải dịch pha loãng ở các nồng độ lên môi trường Ashby, nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ 30°C trong 72 giờ (Nguyễn Lân Dũng et al., 2003).

Phương pháp phân loại chủng vi khuẩn

Quan sát hình thái: Tiến hành nuôi cấy chủng vi khuẩn được tuyển chọn trên môi trường Ashby ở nhiệt độ 30°C, sau 3 ngày đo kích thước khuẩn lạc, quan sát màu sắc, hình dạng, độ dày, mép khuẩn lạc và nhuộm Gram (Nguyễn Lân Dũng et al., 2003).

Tuyển chọn chủng có khả năng cố định nitrogen: Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy cùng tỷ lệ vào 50mL môi trường Ashby dịch thể, nuôi lắc 120 vòng/phút ở 30°C trong 72 giờ. Ly tâm thu dịch trong và xác định hàm lượng $N-NH_4^+$ được tích lũy trong dịch nuôi cấy bằng phương pháp so màu với thuốc thử Nessler (Nguyễn Quốc Khương et al., 2019).

Phương pháp định danh: Chủng vi khuẩn tuyển chọn được định danh bằng phương pháp giải trình tự gen, tiến hành như sau: đầu tiên tách chiết DNA tổng số của vi khuẩn; nhân đoạn gene mã hóa 16S rRNA bằng kỹ thuật PCR. Trình tự của đoạn gene mã hóa 16S rRNA được xác định theo phương pháp của Sanger cải tiến, sử dụng máy đọc trình tự tự động ABI 3130XL. Phân tích kết quả bằng phần mềm Sequencing Analysis 5.3 và cuối cùng trình tự này được so sánh với các trình tự trên ngân hàng dữ liệu NCBI (National Center for Biotechnology Information) bằng công cụ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) để phân loại chủng vi khuẩn (Sambrook and Russell, 2001).

Xác định ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy: Chủng vi khuẩn đã tuyển chọn được nuôi cấy trong môi trường Ashby dịch thể với các điều kiện về nhiệt độ, pH và thời gian khác nhau. Sau khi nuôi cấy, ly tâm thu lấy phần dịch và xác định hàm lượng $N-NH_4^+$ bằng phương pháp so màu với thuốc thử Nessler.

Khảo sát ảnh hưởng của chủng vi khuẩn tuyển chọn đến tỷ lệ nảy mầm của hạt ngô: Chuẩn bị nguồn vi khuẩn và mật độ của chủng vi khuẩn được nuôi ở các nồng độ: 10^6 , 10^7 , 10^8 và 10^9 CFU/mL. Các thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ, mỗi công thức thí nghiệm có $n \geq 20$ và được lặp lại 3 lần. Thí nghiệm được thực hiện với 5 công thức trên các đĩa petri, mỗi công thức có 20 hạt ngô như sau: công thức 1: 10^0 CFU/mL, công thức 2: 10^7 CFU/mL, công thức 3: 10^8 CFU/mL, công thức 4: 10^9 CFU/mL và đối chứng là nước cất vô trùng. Thí nghiệm được kéo dài trong 4 ngày và xác định chỉ tiêu về tỷ lệ nảy mầm của hạt ngô.

Tất cả các số liệu được thống kê bằng chương trình MS. Excel 2016 qua phân tích ANOVA và ý nghĩa được chấp nhận ở $p < 0,05$ (Đặng Văn Giáp, 2000).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tiến hành phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen trên môi trường Ashby thạch đĩa từ 9 mẫu đất trồng ngô tại thành phố Huế và vùng phụ cận, kết quả được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Số lượng vi khuẩn cố định nitrogen trong các mẫu đất trồng ngô

STT	Mẫu	Địa điểm	Số chủng phân lập	CFU/g $\times 10^5$
1	Đất ven sông	Kim Long	6	35,47 $\pm$ 3,46
2	Đất ven sông	Hương An	5	34,86 $\pm$ 3,16
3	Đất cát	Quảng Điền	5	34,52 $\pm$ 2,97
4	Đất trồng lúa	Hương Hồ	4	27,12 $\pm$ 2,04
5	Đất trồng lúa	Hương Thủy	5	26,84 $\pm$ 2,11
6	Đất vườn	Hương An	4	22,04 $\pm$ 1,97
7	Đất vườn	Hương Long	5	21,46 $\pm$ 1,89
8	Đất đồi	Thủy Xuân	3	15,82 $\pm$ 1,56
9	Đất đồi	Hương Hồ	4	16,73 $\pm$ 1,62

Ghi chú: CFU: Colony Forming Unit (đơn vị hình thành khuẩn lạc)

Từ 9 mẫu đất trồng ngô đã phân lập được 41 chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen. Số lượng vi khuẩn cố định nitrogen trong các mẫu đất dao động trong khoảng $15,82 \times 10^5$ - $35,47 \times 10^5$ CFU/g đất khô. Số lượng vi khuẩn cố định nitrogen trong nghiên cứu này thấp hơn so với nghiên cứu của Phạm Thị Ngọc Lan (2017) với số lượng vi khuẩn cố định nitrogen trong đất trồng rau tại Hương Hồ, thị xã Hương Trà, tỉnh Thừa Thiên Huế dao động từ $0,13 \times 10^6$ - $22,95 \times 10^6$ CFU/g đất khô.

Để tuyển chọn chủng vi khuẩn cố định nitrogen mạnh, chúng tôi đã lựa chọn 5 chủng từ kết quả phân lập trên có đường kính và bề dày khuẩn lạc lớn để nuôi cấy trong môi trường Ashby dịch thể. Sau 3 ngày, xác định hàm lượng $N-NH_4^+$ tích lũy trong môi trường bằng phương pháp so màu với thuốc thử Nessler. Kết quả được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 3. Sự tích lũy hàm lượng $N-NH_4^+$ của các chủng vi khuẩn

STT	Chủng vi khuẩn	Hàm lượng $N-NH_4$ (mg/L)
1	M8 (Quảng Điền: đất cát)	134,91 ^d
2	M21 (Kim Long: đất phù sa ven sông)	272,34 ^a
3	M24 (Hương Long: đất vườn)	178,21 ^c
4	M32 (Hương Thủy: đất trồng lúa)	175,77 ^c
5	M39 (Hương Hồ: đất đồi)	213,48 ^b

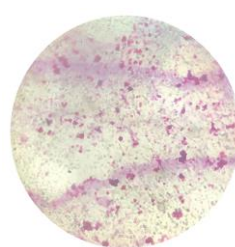
Qua kết quả phân tích cho thấy, trong số 5 chủng vi khuẩn được tuyển chọn; chủng M21 phân lập từ đất phù sa ven sông có khả năng tích lũy sinh khối và $N-NH_4^+$ mạnh trong môi trường Ashby dịch thể với hàm lượng $N-NH_4^+$ là cao nhất (272,34 mg/L). Theo nghiên cứu của Phạm Thị Ngọc Lan đã phân lập được 15 chủng vi khuẩn cố định nitrogen mạnh từ đất trồng rau ở tỉnh Thừa Thiên Huế thì có 2 chủng *Stenotrophomonas maltophilia* N49 và *Paenibacillus mucilaginosus* N161 có khả năng cố định nitrogen cao với hàm lượng $N-NH_4^+$ lần lượt là 33,60 mg/mL và 43,41 mg/m) thì kết quả cố định nitrogen của chủng M21 mà chúng tôi đã phân lập được cao hơn nhiều. Với kết quả này, chúng tôi lựa chọn chủng M21 để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

Đặc điểm hình thái và phân loại của chủng vi khuẩn

Đặc điểm hình thái: Chủng M21 nuôi cấy trên môi trường Ashby thạch đĩa cho khuẩn lạc nhầy quánh, màu trắng sữa, dày, mép tròn, không tiết sắc tố ra môi trường. Đường kính khuẩn lạc đạt 12mm sau 3 ngày nuôi cấy. Trong điều kiện nuôi cấy lắc môi trường Ashby dịch thể, chủng M21 phát triển làm dịch nuôi cấy từ dạng lỏng chuyển sang dạng sánh. Quan sát tiêu bản chủng M21 bắt màu Gram âm, tế bào có hình bầu dục (Hình 1).



Khuẩn lạc của chủng M21



Nhuộm gram tế bào vi khuẩn

Hình 1. Chủng M21 trên môi trường Ashby thạch đĩa và ảnh tiêu bản nhuộm gram (x100)

Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA của chủng M21 được thể hiện ở Hình 2.

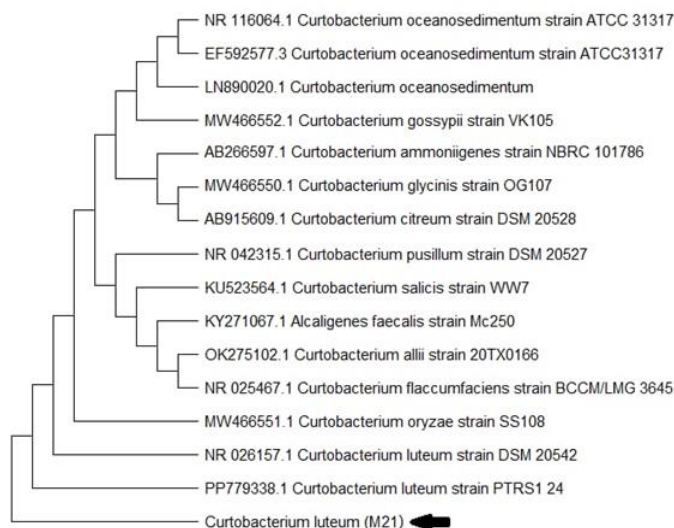
```

TGGCACG TAGTTAGCCGGTGCTTTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCTCCCTACTAAAAG
AGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGCGTTGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTTG
TGCAATATTCCTCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGGGTGGCC
GGTCACCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCGCTTGGTGAGCCATTACCTACCAACAAGCT
GATAGGCCGCGAGTCCATCCCCAACCAAAAAATCTTTCCACCACCAGGCCATGCGACCAAGTAGT
CATATCCAGTATTAGACGTCGTTTCCAACGCTTATCCCAGAGTCAGGGGCAGGTTACTCACGTG
TTACTCACCCGTTCCGCACTAATCCACCCAGCAAGCTGGGCTTCATCGTTTCGACTTGCATGTGTT
AAGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGATCAAACCTCTCCAA
    
```

Hình 2. Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA

Sử dụng công cụ Blast Search để tra cứu và so sánh trình tự này trên Ngân hàng gene. Kết quả cho thấy trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn được tuyển chọn có độ tương đồng 99,59% với trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng *Curtobacterium luteum*. Như vậy, chủng vi khuẩn được tuyển chọn được xác định là thuộc loài *Curtobacterium luteum* M21.

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên trình tự 16S rRNA của chủng nghiên cứu và các chủng có quan hệ họ hàng gần thuộc *Curtobacterium* được thể hiện qua Hình 3.



Hình 3. Cây phả hệ thể hiện mối quan hệ di truyền của chủng *C. luteum* M21

Ghi chú: Chủng nghiên cứu được đánh dấu bằng mũi tên.

Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy

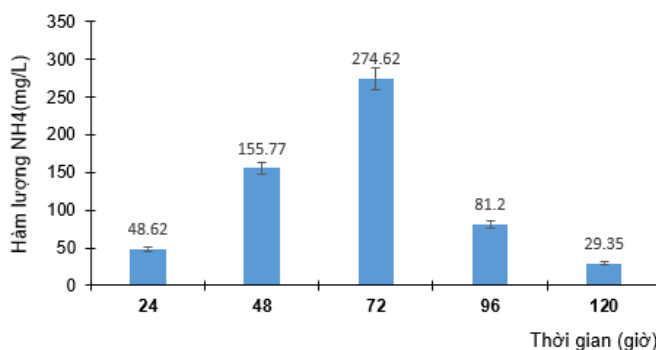
Thời gian nuôi cấy

Để thăm dò ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng phát triển và tích lũy N-NH_4^+ , tiến hành nuôi cấy lacc chủng *C. luteum* M21 trong môi trường Ashby dịch thể. Xác định hàm lượng N-NH_4^+ tích lũy trong môi trường nuôi sau các mốc thời gian 24, 48, 72, 96 và 120 giờ. Kết quả được trình bày ở hình 4.

Kết quả cho thấy: Sau 48 giờ nuôi, hàm lượng N-NH_4^+ đã tích lũy nhiều trong môi trường, đạt giá trị cao nhất là 274,62 mg/L sau 72 giờ.

Hansen và cộng sự khi nghiên cứu khả năng cố định nitrogen của chủng *Enterobacter cloacae* đã xác định được sau 36 giờ nuôi cấy thì chủng nghiên cứu đạt giá trị cao nhất với sinh khối là 13,86 lg CFU/mL (Hansen *et al.*, 2007)

Khi lượng N-NH_4^+ trong môi trường tăng cao vượt quá giới hạn sẽ ức chế lại vi khuẩn, vi khuẩn sử dụng lượng N-NH_4^+ có trong môi trường và không tổng hợp thêm N-NH_4^+ nên lượng N-NH_4^+ khảo sát vào ngày thứ 5 giảm xuống rất đáng kể (Van & Sloger, 1981). Nguyên nhân thứ hai là do hàm lượng dinh dưỡng trong môi trường nuôi sẽ tiêu hao dần theo thời gian và các vi khuẩn tạo ra các chất ức chế lẫn nhau làm ảnh hưởng đến sự phát triển mật độ vi khuẩn và ức chế quá trình tổng hợp N-NH_4^+ .



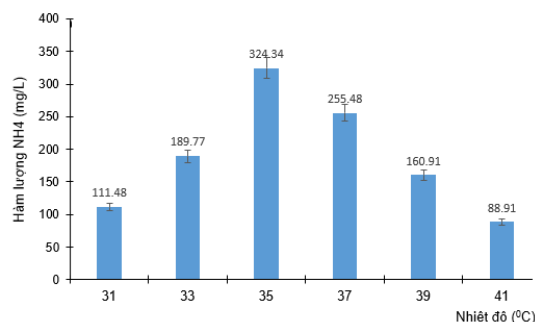
Hình 4. Khả năng cố định N của chủng *C. luteum* M21 theo thời gian nuôi cấy

Như vậy, chúng tôi nhận thấy rằng khoảng thời gian thích hợp cho cố định nitrogen của chủng *C. luteum* M21 được khảo sát là tương đương với nghiên cứu của Hansen và đồng tác giả (2007).

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Tiến hành nuôi cấy lacc chủng *C. luteum* M21 trong môi trường Ashby dịch thể ở các nhiệt độ 31°C, 33°C, 35°C, 37°C và 41°C. Xác định hàm lượng N-NH_4^+ tích lũy trong môi trường nuôi sau 72 giờ, kết quả được trình bày ở hình 5.

Qua kết quả nghiên cứu ở Hình 4 cho thấy: Chủng *C. luteum* M21 có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt trong khoảng nhiệt độ 31°C - 39°C. Trong đó nhiệt độ thích hợp nhất cho vi khuẩn phát triển và tích lũy lượng N-NH₄⁺ là 35°C. Trên 35°C là quá trình tích lũy N-NH₄⁺ của vi khuẩn đã giảm xuống và vượt quá giới hạn 41°C thì hàm lượng N-NH₄⁺ của vi khuẩn tích lũy trong môi trường nuôi đã giảm rõ rệt.



Hình 5. Khả năng cố định N của chủng *C. luteum* M21 theo nhiệt độ nuôi

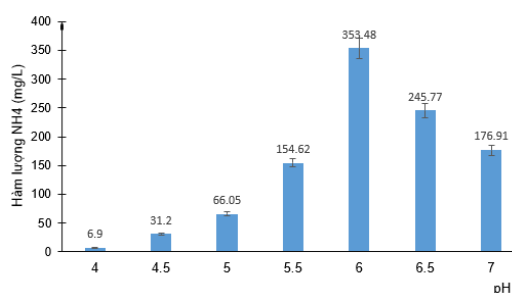
Theo nghiên cứu của Trần Thị Xuân Phương và cộng sự thì 3 chủng cố định nitrogen phân lập từ đất trồng lúa ở tỉnh Thừa Thiên Huế là HC21, HC24 và TT13 sinh trưởng phát triển tốt nhất ở nhiệt độ lần lượt là 28°C và 30°C (Trần Thị Xuân Phương *et al.*, 2017). Còn kết quả nghiên cứu của chúng tôi về giới hạn nhiệt độ cho chủng *C. luteum* M21 sinh trưởng tốt là 25°C - 35°C. Điều này có thể do khu hệ vi khuẩn ở đây thích nghi với điều kiện khí hậu địa phương. Chính vì vậy chủng *C. luteum* M21 thích hợp phát triển trong giới hạn nhiệt độ này.

Ảnh hưởng của pH

pH môi trường được điều chỉnh ở các mức 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 và nuôi chủng *C. luteum* M21 ở thời gian và nhiệt độ tối ưu (72 giờ và 35°C), sau đó xác định hàm lượng N-NH₄⁺ tích lũy trong môi trường nuôi. Kết quả được trình bày ở hình 6.

Qua Hình 6 cho thấy: Giá trị pH của các môi trường nuôi cấy khác nhau thì sinh trưởng phát triển và khả năng tích lũy N-NH₄⁺ là khác nhau. Chủng *C. luteum* M21 phát triển được trong khoảng pH rộng từ 4,5 đến 7,0; hàm lượng N-NH₄⁺ tạo thành có sự biến thiên rõ rệt trong khoảng pH từ 4,5 đến 7,0; đạt giá trị cao nhất là 353,48 mg/mL tại pH: 6,0

Theo Trần Hải Minh, pH tối ưu cho sinh trưởng phát triển và cố định N của chủng vi khuẩn *Azotobacter* là 6,8 (Trần Hải Minh, 2012). Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu của Đỗ Hoàng Quân về ảnh hưởng của pH môi trường đến khả năng sinh trưởng phát triển và hoạt tính cố định N của 02 chủng vi khuẩn Az03 và Az07 thuộc chi *Azotobacter* phân lập từ đất canh tác thì giá trị pH thích hợp cho sinh trưởng phát triển và cố định N của các chủng nghiên cứu từ 7,0 - 7,5 (Đỗ Hoàng Quân, 2011).

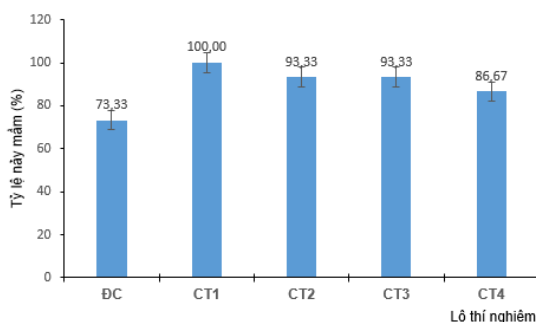


Hình 6. Khả năng cố định N của chủng *C. luteum* M21 theo pH môi trường

Khảo sát ảnh hưởng của vi khuẩn đến tỷ lệ nảy mầm hạt ngô

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các mật độ vi khuẩn khác nhau của chủng *C. luteum* M21 đến tỷ lệ nảy mầm hạt ngô được trình bày ở Hình 7. Kết quả cho thấy chủng *C. luteum* M21 ở công thức 1 có nồng độ 10⁶ CFU/mL giúp gia tăng tỷ lệ nảy mầm của hạt, có tỷ lệ nảy mầm cao nhất (100%), khác biệt ý nghĩa thống kê (p<0,05) khi so sánh với công thức đối chứng không có chủng vi khuẩn (73,3%). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Kiều Phương Nam cho thấy các dòng vi khuẩn *Methylobacterium* spp. từ lá cây có khả năng kích thích gia tăng tỷ lệ nảy mầm các hạt giống như đậu đũa, đậu xanh, đậu cove và cà chua (Kiều Phương Nam *et al.*, 2010).

Kết quả thí nghiệm cho thấy nồng độ 10⁶ CFU/mL là thích hợp nhất để chủng *C. luteum* M21 xâm nhập vào hạt ngô, giúp gia tăng tỷ lệ nảy mầm của hạt và có thể với mật độ này vi khuẩn đã tổng hợp ra một lượng phytohormone vừa đủ để giúp kích thích tỉ lệ nảy mầm của hạt ngô tốt nhất.



Hình 7. Tỷ lệ nảy mầm của hạt ngô khi ủ với chủng *C. luteum* M21 ở các nồng độ khác nhau (n=3)

KẾT LUẬN

Từ 9 mẫu đất trồng ngô ở thành phố Huế và vùng phụ cận, đã phân lập được 41 chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen. Số lượng vi khuẩn cố định nitrogen trong các mẫu đất dao động trong khoảng $15,82 \times 10^5$ - $35,47 \times 10^5$ CFU/g đất khô.

Tuyển chọn được chủng M21 phân lập từ đất ven sông có khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường Ashby dịch thể với hàm lượng $N-NH_4^+$ tích lũy cao nhất (272,34 mg/L) và được định danh bằng phân tích trình tự gen, so sánh với ngân hàng dữ liệu NCBI, được xác định là loài *Curtobacterium luteum* M21.

Chủng *Curtobacterium luteum* M21 thể hiện sự tích lũy $N-NH_4^+$ cao nhất là sau 72 giờ nuôi cấy, pH tối thích là 5,5 và nhiệt độ tối ưu là $35^\circ C$.

Chủng *C. luteum* M21 ở nồng độ 10^6 CFU/mL có khả năng kích thích hạt ngô nảy mầm đạt tỷ lệ 100% sau 4 ngày ủ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ngô Hữu Tình (2003). *Cây ngô*. Nhà xuất bản Nghệ An.
- Trịnh Thị Sen, Phan Thị Phương Nhi (2020). Tuyển chọn giống ngô nếp tại Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, Tập 129, Số 3D, Tr. 65-79
- Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Đình Quyền, Phạm Văn Ty (2003). *Vi sinh vật học*. NXB Giáo dục Hà Nội
- Nguyễn Quốc Khương, Lê Vĩnh Thúc, Nguyễn Thị Thái Lê, Trần Hoàng Em, Lâm Dư Mẫn, Trần Ngọc Hữu, Nguyễn Thị Thanh Xuân, Trần Chí Nhân, Lý Ngọc Thanh Xuân (2019). Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn có khả năng cố định đạm, phân giải lân, kích thích sinh trưởng cây trồng từ đất vùng rễ cây Ngô lai. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, số 23, tr: 17–23
- Sambrook J. and Russell DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Đặng Văn Giáp (2000). Phân tích dữ liệu khoa học bằng Microsoft Excel. NXB Giáo dục Hà Nội
- Phạm Thị Ngọc Lan, Nguyễn Thị Việt, Lê Thị Hoa Sen (2017). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cố định nitrogen từ đất chuyên canh rau tại phường Hương Hồ, thị xã Hương Trà, tỉnh Thừa Thiên Huế. *Tuyển tập báo cáo Hội nghị Khoa học toàn quốc về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, lần thứ 7*, Hà Nội, tr. 1296 - 1303.
- Hansen A, Xu J, Yang J (2007). Growth condition of associative nitrogen fixing bacteria *Enterobacter cloacae* in Rice plant. *Agricultural Journal*, 2: 672 - 675.
- Van BP, & Sloger C (1981). Ontogenetic variation of nitrogenase, nitrate reductase and glutamin synthetase activities in *Oryza sativa* rice. *Plant Physiol*, 68: 722-726.
- Trần Thị Xuân Phương, Nguyễn Thị Như Ngọc, Nguyễn Thị Thuận, Lê Xuân Diễm Ngọc (2017). Tuyển chọn vi khuẩn Azotobacter có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA trong đất trồng lúa ở tỉnh Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp*, tập 1, trang 111 - 118
- Trần Hải Minh (2012). *Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn Azotobacter có hoạt tính nitrogenase từ đất trồng lúa tại huyện Vạn Ninh, tỉnh Khánh Hòa*. Luận văn Thạc sĩ Khoa học, Đại học Nha Trang.
- Đỗ Hoàng Quân (2011). *Phân lập, tuyển chọn và nghiên cứu các đặc tính tăng trưởng, cố định đạm của vi khuẩn Azotobacter - thử nghiệm trên cây trồng*. Luận văn Thạc sĩ Sinh học. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh.
- Kiều Phương Nam, Hồ Lê Trung Hiếu, Trần Minh Tuấn, Bùi Văn Lệ (2010). Khả năng ứng dụng vi khuẩn Methylobacterium spp. trong việc gia tăng tỉ lệ nảy mầm của hạt giống cây trồng. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*. Tập13, tr: 49-57.

ISOLATION AND SELECTION OF BACTERIAL STRAINS CAPABLE OF NEGATIVE FIXATION FROM CORN PLANTING SOIL

Nguyen Thi Thuy Nhi, Nguyen Thai Phap, Duong Vi Ngoc, Nguyen Minh Tri*

Hue University of Science, Hue University

SUMMARY

Using too much chemical fertilizer will lead to many disadvantages for the environment such as degraded soil, callousing, poor water holding capacity, and affecting the quality of agricultural products. To minimize the use of chemical fertilizers, it is necessary to find microbial strains capable of fixing nitrogen to partially replace chemical fertilizers.

From 9 samples of corn growing land in Hue city, Huong Tra district and Quang Dien district, we have isolated 41 strains of bacteria with the ability to fix nitrogen. The number of nitrogen-fixing bacteria in soil samples ranged from 15.82×10^5 - 35.47×10^5 CFU/g dry soil. Selected strain M21 isolated from riverside corn soil has the ability to grow well in Ashby liquid medium with the highest accumulated N-NH_4^+ content (272.34 mg/L). By gene sequence analysis and comparison with NCBI data bank, strain M21 was identified as *Curtobacterium luteum* M21. *Curtobacterium luteum* M21 strain showed the highest accumulation of N-NH_4^+ after 72 hours of culture, optimal pH was 5.5 and optimal temperature was 35°C . This study also showed that at a density of 10^6 CFU/mL after 4 days of impact, it stimulated corn seed germination at a rate of 100%.

Keywords: Bacteria, corn soil, *Curtobacterium luteum*, nitrogen fixation.

* Author for correspondence: Tel: +84-914031085; Email: nguyenminhtri@husc.edu.vn