

PHÂN LẬP VÀ NHẬN DIỆN VI KHUẨN NỘI SINH TRONG CÂY BẮP CÓ KHẢ NĂNG CỐ ĐỊNH NITƠ Ở TỈNH AN GIANG

Thái Thành Được^{1*}, Nguyễn Hữu Hiệp¹,

Trương Trọng Ngôn¹, Huỳnh Văn Tiền²

TÓM TẮT

Với mục đích xác định vi sinh vật nội sinh cây bắp có khả năng cố định nitơ, phục vụ sản xuất phân bón vi sinh, nội dung công trình nghiên cứu tập trung vào phân lập và nhận diện các dòng vi khuẩn nội sinh có khả năng cố định nitơ cao trong cây bắp dựa vào trình tự 16S rRNA. Kết quả phân lập được 120 dòng vi khuẩn từ 63 mẫu thu tại 7 huyện của tỉnh An Giang và chọn ra được 28 dòng có hiệu quả cố định nitơ cao bằng phương pháp so màu. Khả năng cố định nitơ sau 96 giờ của 28 dòng vi khuẩn dao động từ 0,92 đến 3,06 mg NH_4^+/L . Hai chủng vi khuẩn ký hiệu AMR1 và ADR3 có hiệu quả cố định nitơ cao đạt 2,750 và 3,064 mg NH_4^+/L . Thí nghiệm nhà lưới xác định nghiệm thức sử dụng các dòng vi khuẩn AMR1 và ADR3 cho năng suất bắp cao hơn đối chứng và tiết kiệm được 25% lượng phân đạm cần bón. Hai chủng vi khuẩn ký hiệu AMR1 và ADR3 được định danh là *Bacillus megaterium* AMR1 và *Bacillus aryabhattai* ADR3, thuộc nhóm vi khuẩn an toàn sinh học cấp độ 1.

Từ khóa: *Bacillus*, vi khuẩn cố định nitơ, vi khuẩn nội sinh cây bắp.

1. GIỚI THIỆU

Bắp - cây ngô (*Zea mays* L.) là cây trồng chính và là cây lương thực xếp hàng thứ 2 sau cây lúa ở Việt Nam (Bộ Nông nghiệp và PTNT, 2019), tỉnh An Giang là một trong những tỉnh trồng bắp lớn với diện tích khoảng 10.176 ha (UBND tỉnh An Giang, 2017). Nguyễn Quốc Khương và cs (2017) cho biết lượng phân đạm khuyến cáo sử dụng cho cây bắp là 200 kg/ha và việc sử dụng lượng lớn phân đạm ngoài gây ô nhiễm môi trường thì với giá thành phân bón tăng mạnh như hiện nay sẽ làm ảnh hưởng rất lớn đến chi phí sản xuất (Zhang *et al.*, 2012).

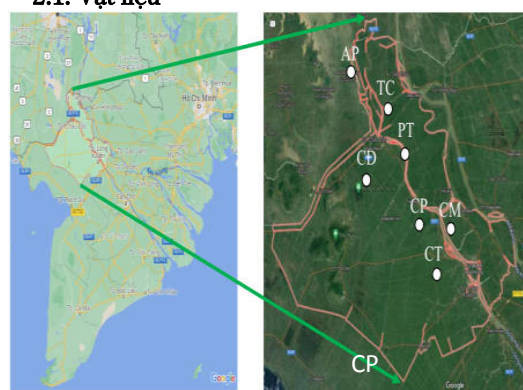
Giải pháp ứng dụng vi khuẩn cố định nitơ tự do tạo NH_3 xảy ra trong điều kiện sinh lý bình thường nhờ năng lượng ATP và sự xúc tác bởi enzyme nitrogenase ngày càng phổ biến và phát huy vai trò quan trọng trong tình hình thiếu hụt phân bón (John *et al.*, 1995). Vi khuẩn cố định nitơ đã được nghiên cứu và ứng dụng trên nhiều loài cây trồng khác nhau (Nguyễn Hữu Hiệp và cs., 2019; Cao Ngọc Diệp, 2008; Zinniel *et al.*, 2002). Việc phân tích trình tự của 16S rRNA đã xác định được các loài vi khuẩn có khả năng cố định nitơ thuộc chi *Bacillus* (Deepa *et al.*,

2010), *Rhizobium*, *Burkholderia* (Ferreira *et al.*, 2011), *Enterobacter*, *Pantoea*, *Serratia* và một số loài khác (Tian *et al.*, 2009).

Mục đích của nghiên cứu này là phân lập và xác định các vi khuẩn nội sinh cây bắp có khả năng cố định nitơ góp phần làm phong phú nguồn vi sinh vật có lợi ở địa phương để ứng dụng cho sản xuất phân bón vi sinh.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu



Hình 1. Bản đồ khảo sát và thu mẫu vi khuẩn nội sinh trong cây bắp ở An Giang

Ghi chú: Ký hiệu các huyện CM: Chợ mới; PT: Phú Tân; TC: Tân Châu; CT: Châu Thành; CP: Châu Phú; CD: Châu Đốc và AP: An Phú

Rễ, thân và lá cây bắp giai đoạn 40 đến 45 ngày được thu thập theo phương pháp mô tả bởi Nguyễn

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

² Trường Đại học Kiên Giang

Xuân Cự và cs. (2001) tại 7 huyện/thành phố của tỉnh An Giang gồm: Chợ Mới, Châu Thành, Phú Tân, Châu Phú, thành phố Châu Đốc, Tân Châu và An Phú (Hình 1). Mẫu được bảo quản trong tủ lạnh (ở nhiệt độ 5°C trước khi phân tích).

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phân lập vi khuẩn nội sinh cố định nitơ

Mẫu rễ, thân và lá cây bắp được khử trùng bề mặt, nghiền và tách lọc dịch trong ở điều kiện vô trùng, sau đó đưa vào môi trường *Nfb* bán lỏng, ủ ở nhiệt độ 32°C trong 2 - 3 ngày cho đến khi xuất hiện lớp vòng màu trắng (pellicle) cách bề mặt môi trường 2 - 5 mm và môi trường chuyển từ màu xanh lá sang màu dương. Cấy chuyển vi khuẩn từ vòng màu trắng sang môi trường *Nfb* đặc với thành phần theo Kirchhof *et al.* (1997) gồm: 5,0 g acid malic; 0,5 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 g NaCl; 0,02 g $CaCl_2$; 2 ml bromthymol blue 0,5% trong KOH 0,2 N; 1 ml dung dịch vitamin; 2 ml dung dịch vi lượng; 4 ml dung dịch 1,64% FeEDTA; 4,5 g KOH. Đánh giá khả năng hình thành khuẩn lạc các dòng vi khuẩn trên môi trường thạch, quan sát đặc điểm hình thái khuẩn

lạc và đặc điểm tế bào các dòng vi khuẩn phân lập theo Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp (2002).

Các dòng vi khuẩn sau phân lập được làm thuần và nuôi cấy tăng sinh trong môi trường *Nfb* sau 72 giờ. Xác định nồng độ NH_4^+ thông qua phản ứng giữa phenol và NH_3 với sự hiện diện của tác nhân oxy hoá là hypochlorite hình thành phức có màu xanh (Page *et al.*, 1982).

2.2.2. Đánh giá ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh cố định nitơ đối với cây bắp trong thí nghiệm nhà lưới

Thí nghiệm được thực hiện với 15 nghiệm thức (NT), 4 lần lặp lại trong nhà lưới gồm 60 chậu kích thước 30 x 25 x 24 cm chứa đất khô đã băm nhuyễn và trộn đều. Hạt bắp được khử trùng bề mặt bằng cồn 75% và H_2O_2 (3%), sau đó rửa lại 4 lần với nước cất vô trùng trước khi tẩm nhiễm sinh khối các vi khuẩn có hoạt tính cố định nitơ cao đã được tuyển chọn ở trên. Nghiệm thức đối chứng là nghiệm thức không tẩm nhiễm sinh khối vi khuẩn. Sơ đồ bố trí thí nghiệm được tổng hợp trong bảng 1. Theo dõi, đánh giá các chỉ tiêu cấu thành năng suất và năng suất bắp của các nghiệm thức thí nghiệm.

Bảng 1. Bố trí các nghiệm thức

Phân đạm (%)	0	25	50	75	100
Đối chứng	NT1	NT4	NT7	NT10	NT13
Chủng vi khuẩn 1	NT2	NT5	NT8	NT11	NT14
Chủng vi khuẩn 2	NT3	NT6	NT9	NT12	NT15

Ghi chú: Sử dụng phân đạm theo khuyến cáo địa phương (180 kg/ha) thí nghiệm bố trí mức độ đạm tăng dần.

2.2.3. Nhận diện các dòng vi khuẩn bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Phản ứng khuếch đại trình tự 16S rRNA của các dòng vi khuẩn được thực hiện dựa theo phương pháp của Zinniel *et al.* (2002) với trình tự mỗi:

p515FPL 5'-GTGCCAGCAGCCGCGTAA-3'

p13B 5'-AGGCCCGGGAACGTATTAC-3'

PCR-1 5'-AGTTTGATCCTGGCTCAGGA-3'

Phản ứng PCR được thực hiện với thể tích 50 µl gồm: 22 µl nước cất hai lần, 4 µl Sperminde, 0,5 µl Buffer 10X ($(NH_4)_2SO_4$, 3 µl $MgCl_2$, 10 µl dNTP, 1 µl mỗi p515FPL, 1 µl mỗi p13B, 1 µl PCR-1, 5 µl dimethyl sulfoxide, 0,5 µl Taq DNA polymerase, 2 µl ADN vi khuẩn. 30 chu kỳ nhiệt được thực hiện bằng máy PCR Apollo™ ATC401 Thermal Cycler: 1' ở 94°C, 1' ở 57°C, 2 phút ở 72°C. Sau đó, sản phẩm PCR sẽ được xác định trình tự bởi Công ty BioTrace. Sự tương đồng giữa trình tự 16S rRNA của các dòng vi khuẩn

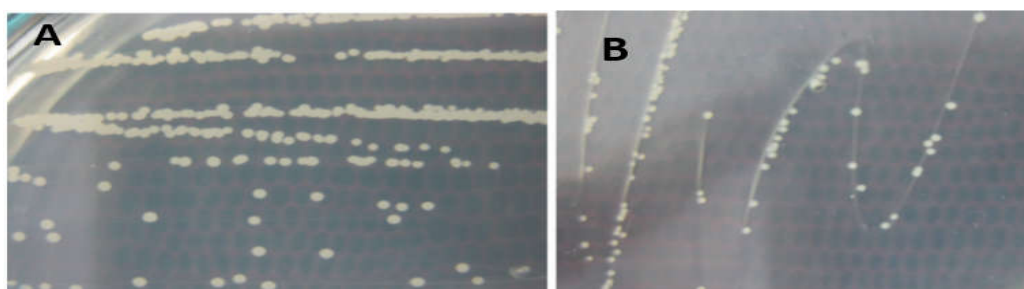
với trình tự 16S rRNA trên ngân hàng gene NCBI được xác định nhờ chương trình BLAST N (Nucleotide - Nucleotide BLAST). Từ đó, xây dựng cây phát sinh loài bằng phần mềm MEGA-X (Kumar *et al.*, 2018).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn nội sinh cố định nitơ

120 dòng vi khuẩn được phân lập từ 63 mẫu được thu ở 7 huyện/thành phố của tỉnh An Giang, trong đó vi khuẩn phân lập từ rễ chiếm 46,4%, từ thân 26,1% và từ lá là 27,5%.

Khuẩn lạc các dòng vi khuẩn chủ yếu có màu trắng đục (96,8%), hình tròn (92,3%), bìa nguyên (88,3%), độ nổi mô (69,5%), có bề mặt trơn láng (84,4%) và đường kính khuẩn lạc dao động từ 0,5 đến 6,6 mm (Hình 2).



Hình 2. Hình dạng khuẩn lạc của một số dòng vi khuẩn ADR3 (A) và AMR1 (B)

Tế bào vi khuẩn phân lập có dạng hình que chiếm tỷ lệ cao nhất (82,6%), còn lại là hình cầu (17,4%). 7,7% các dòng vi khuẩn phân lập không có khả năng chuyển động, còn lại 92,3% các dòng vi khuẩn có khả năng chuyển động với tốc độ khác nhau. Tỷ lệ vi khuẩn Gram (-) là 67,6% cao hơn so với Gram (+) là 32,4%. Đa số các dòng vi khuẩn phát triển thành khuẩn lạc từ 48 giờ đến 72 giờ và một số dòng phát triển nhanh sau 24 giờ (Bảng 2). Các dòng vi khuẩn nội sinh phân lập đều có khả năng sinh trưởng, phát triển trong điều kiện vi hiếu khí và tạo thành vòng pellicle trắng đục bên dưới môi trường bán lỏng 2 - 5 mm tương tự như công bố của Van *et al.* (1997), Nguyễn Hữu Hiệp và Nguyễn Thị Mai Khanh (2010).

Sau 72 giờ nuôi cấy tăng sinh, màu sắc môi trường trong các ống nghiệm hoàn toàn chuyển sang màu xanh dương và màu xanh dương nhạt hay đậm tùy vào từng dòng vi khuẩn. Kết quả đã tuyển chọn

được 28/120 dòng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ, phát triển mạnh sau 72 giờ nuôi cấy ở 30°C, gồm 13 dòng vi khuẩn phân lập từ rễ, 11 dòng vi khuẩn từ thân và 4 dòng từ lá cây bắp.

Theo Cao Ngọc Diệp và cs. (2011) các vi khuẩn nội sinh thuộc các chi *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*... có khả năng cố định nitơ, hoà tan lân khó tan, phân giải kali và một số hoạt tính sinh học khác có lợi cho thực vật.

Kết quả nghiên cứu tổng hợp tại bảng 3 cho thấy tất cả 28 dòng vi khuẩn nội sinh được phân lập đều có khả năng tổng hợp NH_4^+ với hàm lượng dao động từ 0,92 đến 3,06 mg/L sau thời gian nuôi cấy 96 giờ, trong đó 2 dòng vi khuẩn ký hiệu ADR3, AMR1 có hàm lượng NH_4^+ tổng hợp cao trên 2 mg/L và được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 2. Đặc điểm phát triển của 28 dòng vi khuẩn cố định nitơ trên môi trường NFb đặc

STT	Dòng vi khuẩn	Thời gian khảo sát (giờ)			STT	Dòng vi khuẩn	Thời gian khảo sát (giờ)		
		24	48	72			24	48	72
1	AML1	++	+++	+++	15	ACR1	++	+++	+++
2	AML2	++	+++	+++	16	ACR2	++	+++	+++
3	AMT1	++	+++	+++	17	APT1	++	+++	+++
4	AMR1	++	+++	+++	18	APT2	++	+++	+++
5	AMR2	++	+++	+++	19	APT3	++	+++	+++
6	AMR3	++	+++	+++	20	APR1	++	+++	+++
7	ABT1	++	+++	+++	21	ADR2	++	+++	+++
8	ABR1	++	+++	+++	22	ADR3	++	+++	+++
9	ABR2	++	+++	+++	23	AAL1	++	+++	+++
10	ABR3	++	+++	+++	24	AAT1	++	+++	+++
11	ATT1	++	+++	+++	25	AAT2	++	+++	+++
12	ATR1	++	+++	+++	26	AAT3	++	+++	+++
13	ACL1	++	+++	+++	27	AAT1	++	+++	+++
14	ACT1	++	+++	+++	28	AAR1	++	+++	+++

Ghi chú: AML1: 2 chữ cái đầu địa điểm thu mẫu, chữ cái thứ 3 là vị trí mẫu (rễ, thân hoặc lá), số là số dòng tuyển chọn; (++) phát triển trung bình, (+++) phát triển mạnh

Bảng 3. Khả năng tổng hợp NH_4^+ của 28 dòng vi khuẩn phân lập sau 96 giờ nuôi cấy

STT	Dòng vi khuẩn	NH_4^+ (mg/L)	STT	Dòng vi khuẩn	NH_4^+ (mg/L)
1	AML1	1,132	15	ACR1	1,139
2	AML2	1,536	16	ACR2	1,157
3	AMT1	0,999	17	APT1	1,057
4	AMR1	2,750	18	APT2	1,352
5	AMR2	1,601	19	APT3	0,920
6	AMR3	1,547	20	APR1	1,327
7	ABT1	1,082	21	ADR2	1,359
8	ABR1	1,330	22	ADR3	3,064
9	ABR2	1,248	23	AAL1	2,205
10	ABR3	1,341	24	AAT1	1,281
11	ATT1	1,903	25	AAT2	1,150
12	ATR1	1,702	26	AAT3	1,167
13	ACL1	1,244	27	AAT1	1,078
14	ACT1	1,201	28	AAR1	1,069

Theo Cao Ngọc Diệp (2008); Nguyễn Thị Huỳnh Như và cs. (2013); Beneduzi *et al.* (2008) các vi khuẩn nội sinh trong rễ cây có hoạt tính cố định cao hơn vi khuẩn nội sinh trong thân, lá cây và khả năng cố định nitơ của các dòng vi khuẩn nội sinh ở các loài cây khác nhau là khác nhau.

3.2. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh cố định nitơ đến năng suất cây bắp

Bảng 4. Ảnh hưởng của vi khuẩn nội sinh cố định nitơ đến năng suất và yếu tố cấu thành năng suất cây bắp tại An Giang

Nghiem thức	Chiều dài trái (cm)	Đường kính trái (cm)	Số hàng hạt/trái	Số hạt /hàng	Khối lượng 1.000 hạt (g)	Năng suất (tấn/ha)
0N, không nhiễm VK	12,55 ^{hi}	2,36 ^g	6,500 ^e	9,50 ^f	197,12 ^f	0,66 ^g
0N, nhiễm AMR1	11,65 ⁱ	2,94 ^e	10,00 ^d	12,00 ^e	195,03 ^f	1,27 ^f
0N, nhiễm ADR3	13,48 ^{gh}	2,91 ^e	10,00 ^d	11,50 ^e	195,68 ^f	1,22 ^f
25N, không nhiễm VK	13,98 ^{fg}	3,14 ^e	12,50 ^c	20,25 ^d	225,58 ^e	3,10 ^e
25N, nhiễm AMR1	14,98 ^{ef}	3,16 ^e	13,00 ^{bc}	24,25 ^c	237,35 ^d	4,06 ^d
25N, nhiễm ADR3	15,50 ^{de}	3,20 ^e	13,00 ^{bc}	23,75 ^c	230,81 ^{de}	3,87 ^d
50N, không nhiễm VK	16,23 ^{de}	3,18 ^e	13,00 ^{bc}	23,25 ^c	246,40 ^c	4,04 ^d
50N, nhiễm AMR1	18,95 ^a	3,60 ^{bc}	13,50 ^{bc}	28,75 ^{ab}	261,27 ^b	5,51 ^b
50N, nhiễm ADR3	17,95 ^{bc}	3,56 ^c	14,00 ^{ab}	28,50 ^{ab}	245,61 ^c	5,34 ^b
75N, không nhiễm VK	16,83 ^{cd}	3,62 ^{abc}	13,50 ^{bc}	27,00 ^b	247,05 ^c	4,89 ^c
75N, nhiễm AMR1	19,33 ^a	3,86 ^{ab}	15,00 ^a	29,50 ^a	269,49 ^a	6,47 ^a
75N, nhiễm ADR3	19,13 ^{ab}	3,74 ^{abc}	15,00 ^a	28,75 ^{ab}	271,60 ^a	6,37 ^a
100N, không nhiễm VK	19,03 ^{ab}	3,89 ^a	15,00 ^a	29,25 ^a	268,55 ^{ab}	6,40 ^a
100N, nhiễm AMR1	19,33 ^a	3,88 ^{ab}	15,00 ^a	28,75 ^{ab}	272,82 ^a	6,39 ^a
100N, nhiễm ADR3	18,98 ^{ab}	3,87 ^{ab}	15,00 ^a	29,27 ^a	271,11 ^a	6,48 ^a
CV (%)	5,71	6,04	7,65	5,53	2,32	4,49

Ghi chú: Bón phân đạm theo khuyến cáo địa phương (180 kgN/ha) gồm: 0N = 0 kgN/ha, 25N = 45 kgN/ha, 50N = 90 kgN/ha, 75N = 135 kgN/ha, 100N = 180 kgN/ha. VK: Vi khuẩn, giá trị có chữ theo sau giống nhau cùng một cột hiển thị sự khác biệt không ý nghĩa ở mức 5%.

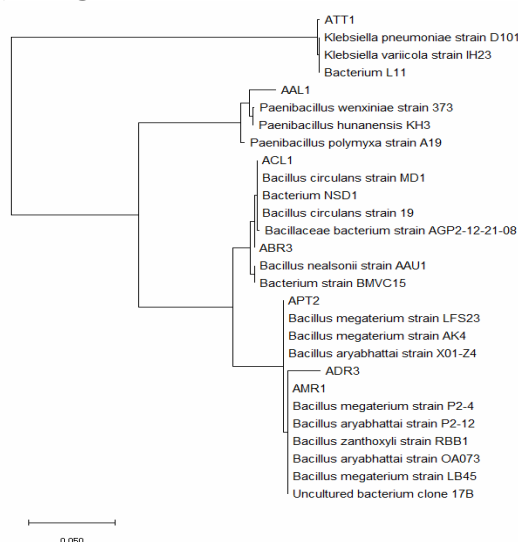
Kết quả đánh giá ảnh hưởng của hai vi khuẩn cố định nitơ ký hiệu AMR1, ADR3 đến năng suất cây bắp trong thí nghiệm nhà lưới tổng hợp trong bảng 4 cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về chiều dài trái bắp, đường kính trái, số hàng/trái, số hạt/hàng, khối lượng 1.000 hạt và năng suất bắp giữa

các nghiệm thức thí nghiệm, trong đó các nghiệm thức sử dụng 75N và nhiễm vi khuẩn AMR1, ADR3 cho các giá trị không khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức sử dụng 100N ở mức 5%. Chiều dài trái bắp dao động ở các nghiệm thức từ 11,65 cm đến 19,33 cm, đường kính trái bắp từ 2,36 cm đến 3,89 cm, số hàng hạt từ 6,5 hàng đến 15 hàng, khối lượng 1.000 hạt 195,03 g đến 272,82 g. Mức chênh lệch giữa các nghiệm thức khá cao và các nghiệm thức nhiễm vi khuẩn đều cho kết quả cao hơn các nghiệm thức không nhiễm vi khuẩn ở cùng một giá trị phân bón. Năng suất bắp đạt 6,47 tấn/ha khi nhiễm chủng vi khuẩn AMR1 và đạt 6,37 tấn/ha khi nhiễm chủng vi khuẩn ADR3.

Kết quả nghiên cứu đã xác định 2 dòng vi khuẩn nội sinh có thể giúp giảm được 25% lượng phân đạm khoáng cần bón tương tự như công bố của Premising và Archana (2018) về khả năng giảm 25% phân bón NPK khi sử dụng vi khuẩn nội sinh *Lactococcus lactis* và *Klebsiella*. Montañez *et al.* (2009) đánh giá hiệu quả của vi khuẩn cố định nitơ trên cây bắp trồng trong chậu và cho biết, khối lượng khô rễ bắp tăng 42 - 53% và khối lượng chất khô thân, lá tăng 22 - 50% so với đối chứng ở giai đoạn cây bắp 90 ngày.

3.3. Định danh vi khuẩn nội sinh cố định nitơ

Trình tự 16S rRNA của 2 dòng vi khuẩn nội sinh được tuyển chọn AMR1 chiều dài là 1240 nucleotide và ADR3 chiều dài là 985 nucleotide. Cây phát sinh loài của 2 dòng vi khuẩn nội sinh phân lập được thể hiện trong hình 3.



Hình 3. Cây phát sinh loài dạng Maximum Likelihood xây dựng dựa trên 16S rRNA của 2 dòng vi khuẩn nội sinh cây bắp

Phân tích cây phát sinh loài cho thấy, hai dòng vi khuẩn nội sinh tuyển chọn ký hiệu AMR1 và ADR3 có quan hệ di truyền gần với vi khuẩn *Bacillus* và được định danh là *Bacillus megaterium* AMR1, *Bacillus aryabhattai* ADR3 với mức độ tương đồng lần lượt là 100% và 97%. Barazani và Friedman (1999); Sarwar và Kremer (1995); Arshad và Frankenberger (1991) cho biết vi khuẩn nội sinh cây bắp có khả năng cố định nitơ phân bố ở rễ, thân, lá và có ảnh hưởng tích cực đến sự phát triển của cây. Theo TRBA 466 của Cộng hòa Liên bang Đức, cả 2 loài vi khuẩn nội sinh tuyển chọn đều thuộc nhóm vi khuẩn an toàn sinh học cấp độ 1.

4. KẾT LUẬN

Từ 63 mẫu thân, lá và rễ cây bắp thu thập tại 7 huyện/thành phố ở tỉnh An Giang đã phân lập được 120 dòng vi khuẩn nội sinh và tuyển chọn được 28 dòng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ cao với hàm lượng NH_4^+ đạt từ 1,167 mg/L đến 3,064 mg/L, trong đó 2 dòng vi khuẩn ký hiệu ADR3, AMR1 có hàm lượng NH_4^+ tổng hợp đạt 2,750 mg/L và 3,064 mg/L. Thử nghiệm trong điều kiện nhà lưới xác định 2 dòng vi khuẩn phân lập có ảnh hưởng tích cực đến các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất cây bắp. Năng suất bắp đạt 6,47 tấn/ha khi nhiễm chủng vi khuẩn AMR1 và đạt 6,37 tấn/ha khi nhiễm chủng vi khuẩn ADR3. Sử dụng vi khuẩn nội sinh cố định nitơ có thể giảm được 25% lượng dinh dưỡng đạm cần bón. Trên cơ sở phân tích trình tự 16S rRNA, 2 dòng vi khuẩn tuyển chọn được định danh là *Bacillus megaterium* AMR1 và *Bacillus aryabhattai* ADR3, thuộc nhóm vi khuẩn an toàn sinh học cấp độ 1. Vi khuẩn *Bacillus megaterium* AMR1 và *Bacillus aryabhattai* ADR3 có tiềm năng ứng dụng cho sản xuất phân bón vi sinh sử dụng cho cây bắp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arshad, M. and Frankenberger, W. T., 1991. Microbial production of plant hormones. Plant Soil 133: 1 - 8.
2. Barazani, O. and Friedman, J., 1999. Is IAA the major root growth factor secreted from plantgrowth - mediating bacteria. J Chem Ecol 25 (10): 2397 - 2406.
3. Beneduzi, A., D. Peres, L. K. Vargas, M. H. Bodanese - Zanettini, L. M. P. Passaglia, 2008. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen - fixing Bacilli isolated from rice fields in South Brazil. Appl Soil Ecol 39: 311 - 320.

4. Bộ Nông nghiệp và PTNT, 2019. Thông tư số 17/2019/TT - BNNPTNT ban hành danh mục loài cây trồng chính.
5. Nguyễn Xuân Cự, Bùi Thị Ngọc Dung, Lê Trần Khắc Hiệp và Cái Văn Tranh, 2001. Phương pháp phân tích đất nước cây trồng. Nhà xuất bản Giáo dục, 2001. 304, tr.6.
6. Deepa, C. K., Dastager S. G. and Pandey A., 2010. Plant growth - promoting activity in newly isolated *Bacillus thiarparus* (NII-0902) from Western ghat forest, India. *World J Microbiol Biotechnol* 26 (12): 2277 - 2283.
7. Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp, 2002. Giáo trình thực tập vi sinh vật đại cương. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ.
8. Cao Ngọc Diệp, 2008. Nghiên cứu sản xuất phân sinh học bón cho đậu nành: chất mang thích hợp cho sự sống sót của vi khuẩn nốt rễ và vi khuẩn *Pseudomonas* spp. *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ*. 10: 14 - 24.
9. Cao Ngọc Diệp, Trần Thị Giang, Nguyễn Thanh Tùng, 2011. Hiệu quả của phân hữu cơ vi sinh trên năng suất và chất lượng rau xanh trồng trên đất phù sa tại tỉnh Long An. *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ*. 18b: 18 - 28.
10. Ferreira, P. A. A., Bomfeti, C. A., Soares B. L. and Moreira, F. M. S., 2011. Efficient nitrogen - fixing *Rhizobium* strains isolated from amazonian soils are highly tolerant to acidity and aluminium. *World J Microbiol Biotechnol* 28: 1847 - 1959.
11. Nguyễn Hữu Hiệp và Nguyễn Thị Mai Khanh, 2010. Phân lập và nhận diện một số chủng vi khuẩn cố định nitơ trên cây bắp. *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ*. 16a: 151 - 156.
12. Nguyễn Hữu Hiệp, Trần Thị Ngọc Sơn và Nguyễn Thị Bé Thương, 2019. Hiệu quả của hai dòng vi khuẩn cố định đạm và hòa tan lân lên sinh trưởng và năng suất lúa IR 50404 tại xã Hiếu Nhơn, huyện Vũng Liêm, tỉnh Vĩnh Long. *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ*. 55 (2): 141 - 150.
13. John, W., Peters, K., Fisher, D. and Dean, R., 1995. Nitrogenase structure and function. Department of Biochemistry and Anaerobic Microbiology, The Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia 24061. 49: 335 - 366.
14. Nguyễn Quốc Khương, Lê Văn Dang, Trần Ngọc Hữu và Ngô Ngọc Hưng, 2017. Khả năng hấp thu vi lượng (Cu, Fe, Zn và Mn) của cây bắp lai ở các mô hình luân canh trên đất phù sa không bồi ở đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ*. 48b: 81 - 91.
15. Kirchhof, G., Reis, V. M., Baldani, J. I., Eckert, B., Döbereiner, J. and Hartmann, A., 1997. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. *Plant and Soil*. 194: 45 - 55.
16. Kumar S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549.
17. Montañez, A., Abreu, C., Gill, P. R., Hardarson, G. and Sicardi, M., 2009. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by 15 N isotope - dilution and identification of associated culturable diazotrophs. *Biol Fertil Soils* 45: 253 - 263.
18. Nguyễn Thị Huỳnh Như, Nguyễn Hữu Hiệp, Thái Trần Phương Minh, Trần Nguyễn Nhật Khoa và Nguyễn Minh Đồi, 2013. Phân lập các dòng vi khuẩn nội sinh có khả năng tổng hợp IAA và cố định đạm trên cây chuối. *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ*. 27: 24 - 31.
19. Page, L., Miller, R. H. and Keeney, R. D., 1982. Methods for Soils Analysis, Part 2: Chemical and Microbial properties, 2 nd edition. American Society of Agronomy Incorporation.
20. Premising, S. M. and Archana, S., 2018. Growth stage and tissue specific colonization of endophytic bacteria having plant growth promoting traits in hybrid and composite maize (*Zea mays* L.). *Microbiological Research* 214: 101 - 113.
21. Sarwar, M. and Kremer, R. J., 1995. Enhanced suppression of plant growth through production of L - tryptophan - derived compounds by deleterious rhizobacteria. *Plant Soil* 172: 261 - 269.
22. Tian, F., Ding, Y., Zhu, H., Yao, L. and Du, B., 2009. Genetic diversity of siderophoreproducing bacteria of tobacco rhizosphere. *Braz J Microbiol* 40 (2): 276 - 284.
23. TRBA 466 "Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen", Ausgabe August 2015. <http://www.gda-portal.de/VorschriftenRegeln/VorschriftenRegeln.html>.
24. UBND tỉnh An Giang, 2017. Quyết định số 1469/QĐ - UBND ngày 15/5/2017 phê duyệt kế hoạch chuyển đổi từ trồng lúa sang trồng bắp (ngô)

theo Quyết định số 915/QĐ - TTg ngày 27/5/2016 của Thủ tướng Chính phủ. 7pp.

25. Van, T. V., Ngoke, S., Berge, O., Faure, D., Bally, R., Hebbat, P. and Heulin, T., 1997. Isolation of *Azospirillum lipoferum* from the rhizosphere of rice by a new, simple method. *Can. J. Microbiol.* 43: 486 - 490.

26. Zhang, Y., Liu, J., Mu, Y., Xu, Z., Pci, S. and Lun, X., 2012. Nitrous oxide emissions from a maize field during two consecutive growing seasons in the

North China Plain. *Journal of Environmental Sciences*, 24 (1): 160 - 168.

27. Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, N. B., Feng, Z., Kuczmarski, D., Higley, P., Ishimaru, C. A., Arunakumari, A., Barletta, R. G. and Vidaver, A. K., 2002. Isolation and characterization of endophytic bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 2198 - 2208.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF NITROGEN-FIXING ENDOGENOUS BACTERIA IN CORN IN AN GIANG PROVINCE

**Thai Thanh Duoc¹, Nguyen Huu Hiep¹,
Truong Trong Ngon¹, Huynh Van Tien²**

¹*Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University, Vietnam*

²*Kien Giang University, Vietnam*

Summary

For the purpose of identifying endogenous bacteria in corn which can fix nitrogen, for the production of bio-fertilizers, the aim of this research was to isolate and identify endophytic bacteria with high nitrogen fixation ability in corn based on 16S rRNA sequence. As a result, 120 strains were isolated from 63 samples collected in 7 districts of An Giang province and 28 strains with highest nitrogen fixation ability were selected by colorimetric analysis. The fixing nitrogen activities of 28 strains after 96 hours were determined with NH_4^+ concentration ranged from 0.92 to 3.06 mg/L and two strains with highest NH_4^+ concentration were AMR1 (2.750 mg/L) and ADR3 (3.064 mg/L). In the net house experiment, the treatment using bacterial strains AMR1 and ADR3 gave higher corn yield than the control and saved 25% of the recommended amount of nitrogen fertilizer. Two strains AMR1 and ADR3 were identified as *Bacillus megaterium* AMR1 and *Bacillus aryabhattai* ADR3, respectively and belonging to the group in Biosafety Level 1.

Keywords: *Bacillus*, nitrogen - fixing bacteria, endogenous bacteria in corn.

Người phản biện: GS.TS. Phạm Văn Toán

Ngày nhận bài: 10/8/2021

Ngày thông qua phản biện: 11/9/2021

Ngày duyệt đăng: 18/9/2021