

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN CÓ ĐỊNH NITROGEN TỪ ĐẤT RỪNG NGẬP MẶN Ở THỪA THIÊN HUẾ

Phạm Thị Ngọc Lan, Nguyễn Thị Việt*

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học - Đại học Huế

*Email: vietnguyensinh33@gmail.com

TÓM TẮT

Để có cơ sở tạo chế phẩm vi sinh góp phần cải thiện hiệu quả công tác ương trồng phục hồi và phát triển hệ sinh thái rừng ngập mặn các chủng vi khuẩn cố định nitrogen (N) đã được phân lập và tuyển chọn. Kết quả nghiên cứu cho thấy: số lượng vi khuẩn cố định N trong các mẫu đất rừng ngập mặn ở Thừa Thiên Huế khá cao, từ $0,66 \times 10^6$ đến $26,34 \times 10^6$ CFU/g đất khô. Phân lập được 216 chủng vi khuẩn cố định N, từ đó chọn được hai chủng V94 và V204 có khả năng cố định N mạnh. Kết quả giải trình tự gen: chủng V94 là *Pseudomonas pseudoalcaligenes* và chủng V204 là *Klebsiella pneumonia*.

Từ khóa: cây ngập mặn, phân lập, tuyển chọn, vi khuẩn cố định nitrogen.

1. MỞ ĐẦU

Ở Thừa Thiên Huế, rừng ngập mặn (RNM) là một hệ sinh thái có vai trò rất quan trọng đối với vùng đầm phá Tam Giang - Cầu Hai. Tuy nhiên, hiện nay RNM chỉ còn chưa đầy 8 ha và đang đứng trước nguy cơ ngày càng bị thu hẹp chủ yếu do người dân khai thác cây ngập mặn làm củi đốt, lấy đất làm ao nuôi tôm, xây dựng các khu đô thị, khu nghỉ dưỡng... Vì vậy công tác ương trồng, phục hồi rừng ngập mặn hiện đang được quan tâm và triển khai theo hướng phát triển bền vững. Trong khi đó, hệ vi sinh vật ở rừng ngập mặn rất đa dạng, chúng tham gia vào quá trình chuyển hóa các chất để cây dễ hấp thu. Chính vì vậy, mà ta có thể sử dụng hệ vi sinh vật như một tác nhân để thúc đẩy sự sinh trưởng phát triển của thảm thực vật qua đó sẽ tăng cường hiệu quả phục hồi rừng ngập mặn. Trong khuôn khổ bài báo này chúng tôi đề cập đến các nghiên cứu phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn cố định N để tạo chế phẩm sinh học và đưa trở lại đất ương trồng cây ngập mặn. Nhóm đối tượng vi khuẩn cố định N có vai trò rất quan trọng. Nó chuyển hóa N trong khí quyển thành nguồn N mà cây có thể hấp thu được. Nguồn N này là thành phần cấu tạo của nhiều hợp chất hữu cơ đặc biệt quan trọng như protein, acid nucleic, ADP, ATP... Đây là các chất có vai trò quyết định trong quá trình trao đổi chất và năng lượng cũng như hoạt động sinh lý của thực vật mà không ảnh hưởng xấu đến môi trường [1].

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các chủng vi khuẩn cố định N được phân lập từ đất vùng rễ của các loại cây chá, đước, sú, ô rô, ráng, vẹt... ở RNM trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Địa điểm thu mẫu: RNM Rú Chá (Hương Trà), Cảnh Dương (Phú Lộc), Tân Mỹ (Phú Vang), Lập An (Phú Lộc).

- Phương pháp phân lập và đếm số lượng tế bào: sử dụng phương pháp Koch để phân lập vi khuẩn cố định N trên môi trường Ashby thạch đĩa. Đếm số lượng tế bào vi khuẩn bằng phương pháp đếm gián tiếp thông qua số lượng khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch đĩa [2].

- Sơ tuyển vi khuẩn hiếu khí cố định N: tiến hành nuôi cấy trực tiếp vi khuẩn trên môi trường Ashby thạch đĩa ở nhiệt độ 30°C trong khoảng thời gian 4-7 ngày, sau đó xác định sinh trưởng phát triển của khuẩn lạc trên thạch đĩa.

- Phương pháp tuyển chọn chủng vi khuẩn cố định N: nuôi cấy chủng vi khuẩn trong 50 mL môi trường Ashby dịch thể ở điều kiện lắc 120 vòng/phút, nhiệt độ 30°C sau 4 ngày. Thu dịch nuôi cấy, xác định hàm lượng N-NH₄⁺ được tạo thành bằng phương pháp so màu với thuốc thử Nessler [3]. Phần cặn được sấy khô để xác định sinh khối vi khuẩn.

- Xác định một số đặc điểm hình thái, sinh hóa và phân loại chủng vi khuẩn: quan sát khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường Ashby thạch đĩa. Quan sát hình thái tế bào bằng phương pháp nhuộm đơn. Phân loại chủng vi khuẩn bằng giải trình tự gene 16S rRNA và tra cứu trên Blast search để xác định loài vi khuẩn [4, 5].

- Xử lý số liệu: thí nghiệm được lặp lại ba lần. Số liệu được tính giá trị trung bình và phân tích ANOVA (Duncans' test $p < 0,05$) bằng chương trình SPSS 16.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và xác định số lượng vi khuẩn cố định N

Từ 32 mẫu đất RNM ở Thừa Thiên Huế chúng tôi đã tiến hành phân lập được 216 chủng vi khuẩn cố định N. Số lượng vi khuẩn cố định N trong các mẫu đất RNM được trình bày ở bảng 1.

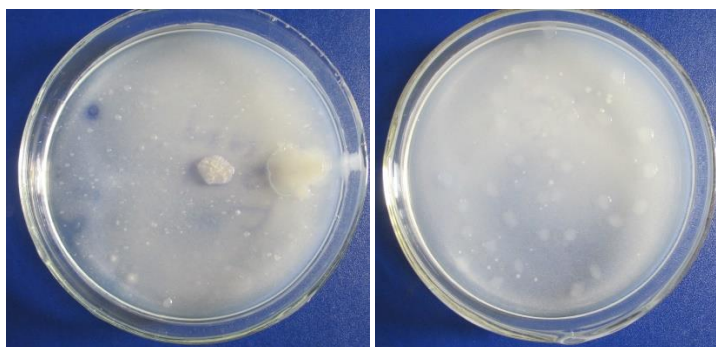
Bảng 1. Số lượng vi khuẩn cố định N trong các mẫu đất phân lập

STT	Kí hiệu mẫu	Địa điểm lấy mẫu	Nền đất	Thảm thực vật	pH đất	CFU/g đất khô (x10 ⁶)
1	TM1	Tân Mỹ 1-Phú Vang	Khô	Bàn	6,04	9,73

2	TM2	Tân Mỹ 2- Phú Vang	Khô	Vẹt	5,42	0,72
3	TM3	Tân Mỹ 3- Phú Vang	Uớt	Bần	5,36	1,66
4	TM4	Tân Mỹ 4- Phú Vang	Bán ngập	Bần	5,16	8,74
5	TM5	Tân Mỹ 5- Phú Vang	Uớt	Sú	5,75	4,21
6	TM6	Tân Mỹ 6- Phú Vang	Uớt	Vẹt	6,25	0,66
7	TM7	Tân Mỹ 7- Phú Vang	Khô	Bần	6,13	9,04
8	RC1	Rú Chá 1-Hương Trà	Khô	Chá	5,58	24,19
9	RC2	Rú Chá 2-Hương Trà	Khô	Ráng	6,15	5,08
10	RC3	Rú Chá 3-Hương Trà	Khô	Ngọc nữ biên	6,01	8,74
11	RC4	Rú Chá 4-Hương Trà	Uớt	Đước	5,92	6,86
12	RC5	Rú Chá 5-Hương Trà	Uớt	Dà quánh	5,45	1,72
13	RC6	Rú Chá 6-Hương Trà	Bán ngập	Quau nước	5,62	11,43
14	RC7	Rú Chá 7-Hương Trà	Khô	Ô rô	5,21	5,48
15	RC8	Rú Chá 8-Hương Trà	Bán ngập	Chá	4,97	15,75
16	RC9	Rú Chá 9-Hương Trà	Khô	Chá	5,58	26,34
17	RC10	Rú Chá 10-Hương Trà	Uớt	Ráng	5,64	3,31
18	RC11	Rú Chá 11-Hương Trà	Uớt	Bần	5,03	8,28
19	RC12	Rú Chá 12-Hương Trà	Khô	Bần	5,25	12,45
20	CD1	Cảnh Dương 1-Phú Lộc	Bán ngập	Đước	6,34	14,37
21	CD2	Cảnh Dương 2-Phú Lộc	Uớt	Đước	6,26	7,63
22	CD3	Cảnh Dương 3-Phú Lộc	Uớt	Chá	5,88	4,45
23	CD4	Cảnh Dương 4-Phú Lộc	Khô	Đước	6,37	20,84
24	CD5	Cảnh Dương 5-Phú Lộc	Bán ngập	Ráng	6,52	2,83
25	CD6	Cảnh Dương 6-Phú Lộc	Khô	Bần	6,14	16,87
26	CD7	Cảnh Dương 7-Phú Lộc	Khô	Chá	6,33	16,25
27	LA1	Lập An 1-Phú Lộc	Khô	Vẹt	6,78	1,16
28	LA2	Lập An 2-Phú Lộc	Bán ngập	Bần	6,65	14,34
29	LA3	Lập An 3-Phú Lộc	Uớt	Đước	6,70	8,32
30	LA4	Lập An 4-Phú Lộc	Uớt	Bần	6,42	16,33
31	LA5	Lập An 5-Phú Lộc	Khô	Vẹt	6,17	1,26
32	LA6	Lập An 6-Phú Lộc	Khô	Ráng	6,74	5,03

Qua kết quả ở bảng 1 chúng tôi nhận thấy, số lượng vi khuẩn cố định N trong đất có sự khác biệt rõ rệt tùy vào từng địa điểm thu mẫu khác nhau. Số lượng vi khuẩn đạt cao nhất là mẫu đất rừng ngập mặn Rú Chá 9 - Hương Trà ($26,34 \times 10^6$ CFU/g đất khô). Số lượng vi khuẩn thấp nhất là ở Tân Mỹ 6 – Phú Vang ($0,66 \times 10^6$ CFU/g đất khô). Ngoài ra, ở vùng rễ của các loại cây trồng khác nhau thì số lượng vi khuẩn phân bố cũng khác nhau, cụ thể với vùng đất rễ cây đước (*Rhizophora stylosa*) số lượng vi khuẩn đạt $20,84 \times 10^6$ CFU/g đất khô, còn ở vùng rễ của cây ráng (*Acrostichum aureum*) thì số lượng thấp hơn chỉ $2,83 \times 10^6$ CFU/g đất khô. Mặt khác, trên cùng một loại cây trồng nhưng ở các địa điểm thu mẫu khác nhau với nền đất khác nhau thì số lượng vi khuẩn phân bố cũng không giống nhau. Cụ thể như cùng đối tượng là cây bần chua (*Sonneratia caseolaris*) nhưng ở mẫu Cảnh Dương 6 – Phú Lộc số lượng vi khuẩn phân bố ($16,87 \times 10^6$ CFU/g đất khô) lớn hơn nhiều so với mẫu ở Tân Mỹ 3 - Phú Vang ($1,66 \times 10^6$ CFU/g đất khô). Sự khác biệt này do nhiều nguyên nhân như độ dinh dưỡng của đất, pH đất, đặc điểm hóa lý của đất...

Theo Phạm Thị Ngọc Lan, Lê Thị Hương Xuân (2005), khi nghiên cứu trên nền đất bạc màu số lượng vi khuẩn cố định N cao nhất đạt $265,5 \times 10^6$ CFU/g đất khô và thấp nhất là $3,3 \times 10^6$ CFU/g đất khô [6]. Có thể do đất canh tác tuy bạc màu nhưng tính chất hóa lí đặc biệt là độ thoáng khí tốt hơn ở đất ngập mặn nên sinh trưởng phát triển của vi khuẩn cố định N mạnh hơn.



Hình 1. Vi khuẩn cố định N phân lập trên môi trường Ashby thạch đĩa

Từ những so sánh trên có thể thấy rằng, sự đa dạng về thành phần loài vi khuẩn cố định N phụ thuộc rất nhiều vào nguồn gốc phân lập. Đối với RNM, lớp trầm tích nói chung được đặc trưng bởi môi trường nước lợ, thường có hàm lượng carbon hữu cơ cao nhưng lại bị hạn chế về N và phosphate [7]. Ngoài một phần N được đem tới từ đất liền, nguồn N chính để đảm bảo cân bằng trong chu trình tuần hoàn vật chất ở RNM do nhóm vi khuẩn cố định N đảm nhiệm [7, 8]. Vì vậy, vai trò của vi khuẩn cố định N hết sức quan trọng đối với sự sinh trưởng phát triển của hệ thực vật RNM.

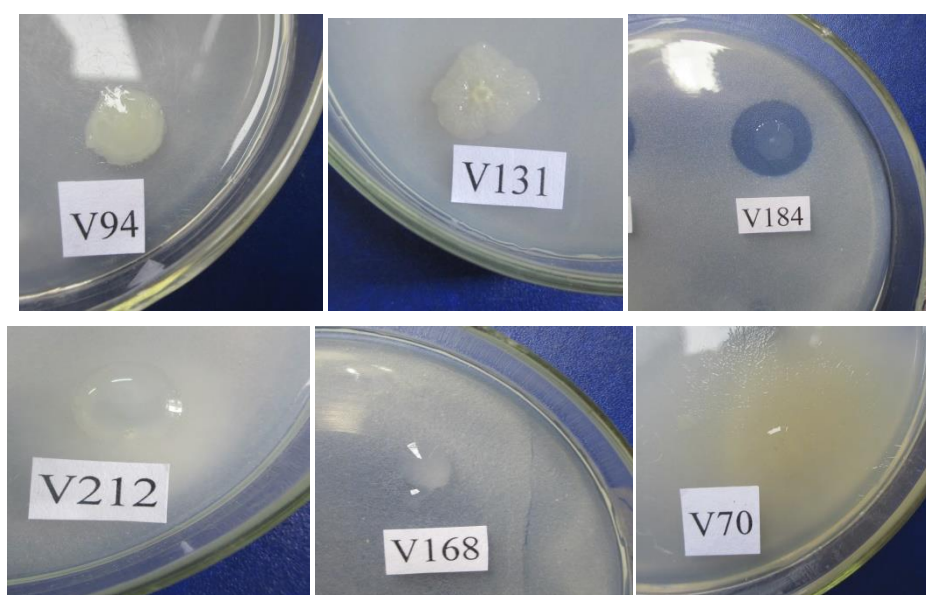
3.2. Đánh giá năng lực sinh trưởng và phát triển của các chủng vi khuẩn cố định N

Để đánh giá sơ bộ khả năng sinh trưởng phát triển của các chủng vi khuẩn phân lập, chúng tôi tiến hành cấy trực tiếp vi khuẩn trên môi trường Ashby thạch đĩa. Sau 4 ngày nuôi, đo đường kính khuẩn lạc để đánh giá khả năng sinh trưởng phát triển của chủng vi khuẩn. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Năng lực sinh trưởng phát triển của các chủng vi khuẩn phân lập

Năng lực sinh trưởng, phát triển của vi khuẩn	Đường kính khuẩn lạc (mm)	Số chủng vi khuẩn	Tỉ lệ (%)
Yếu	1-5	82	37,96
Trung bình	6-10	110	50,93
Mạnh	11-15	15	6,94
Rất mạnh	>15	9	4,17

Qua bảng 2 chúng tôi nhận thấy, khả năng sinh trưởng phát triển của các chủng vi khuẩn trên môi trường là không đều. Số chủng vi khuẩn sinh trưởng phát triển yếu và trung bình chiếm tỷ lệ cao (yếu: 37,96%; trung bình: 50,93%), còn các chủng mạnh và rất mạnh chiếm tỷ lệ khá thấp (6,94% và 4,17%).



Hình 2. Một số chủng vi khuẩn cố định N sinh trưởng phát triển mạnh trên môi trường Ashby thạch đĩa

Theo kết quả nghiên cứu của Phạm Thị Ngọc Lan và cộng sự (1999), trong số 137 chủng vi khuẩn cố định N phân lập từ đất vùng gò đồi tỉnh Thừa Thiên Huế đã tuyển chọn được 6 chủng có khả năng cố định N mạnh (chiếm tỷ lệ 4,4%) [9]. Theo Đỗ Kim Nhung và Vũ Thành Công (2011), trong số 16 chủng vi khuẩn cố định N phân lập từ đất trồng mía chỉ có 2 chủng vi khuẩn có khả năng cố định N mạnh [10].

Như vậy có thể thấy rằng, trong nghiên cứu này tỷ lệ vi khuẩn có khả năng cố định N mạnh cũng chiếm một tỷ lệ tương đương với nghiên cứu của các tác giả khác tại các khu vực đất nông nghiệp hoặc lâm nghiệp có điều kiện dinh dưỡng không quá khắc nghiệt như ở RNM.

3.3. Tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng cố định N mạnh

Để tuyển chọn chủng vi khuẩn cố định N mạnh, chúng tôi lựa chọn 15 chủng có đường kính và bề dày khuẩn lạc lớn đem nuôi cấy lác trong môi trường Ashby dịch thể. Sau 4 ngày nuôi cấy, xác định sinh khối khô và hàm lượng $N-NH_4^+$ trong môi trường nuôi cấy bằng phương pháp so màu với thuốc thử Nessler ở bước sóng 425 nm. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Qua kết quả phân tích cho thấy, trong số 15 chủng vi khuẩn nghiên cứu có hai chủng có khả năng sinh trưởng phát triển mạnh ở môi trường Ashby dịch thể là V94 và V204. Trong đó, chủng V94 có sinh khối tích lũy mạnh nhất (2,154 mg/mL) và hàm lượng $N-NH_4^+$ là cao nhất (3,566 mg/L). Chủng V204 cũng có khả năng tạo sinh khối khá lớn (2,093 mg/mL) và hàm lượng $N-NH_4^+$ cũng khá cao (3,403 mg/L).

Bảng 3. Khả năng sinh trưởng phát triển và cố định N của các chủng vi khuẩn

STT	Chủng vi khuẩn	Sinh khối khô (mg/mL)	Hàm lượng $N-NH_4^+$ (mg/L)
1	V8	1,127 ^f	1,883 ^f
2	V16	0,656 ^h	3,083 ^d

Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn cố định nitrogen từ đất rừng ngập mặn ở Thừa Thiên Huế

3	V35	0,683 ^h	2,054 ^k
4	V70	0,740 ^{gh}	2,145 ^j
5	V81	0,847 ^g	2,886 ^e
6	V87	0,753 ^{gh}	2,267 ⁱ
7	V94	2,154^a	3,566^a
8	V100	1,766 ^{bc}	2,133 ^j
9	V103	1,573 ^e	2,544 ^g
10	V115	1,604 ^{de}	2,733 ^f
11	V131	1,713 ^{cd}	2,083 ^{jk}
12	V157	1,565 ^e	2,295 ^{hi}
13	V168	1,653 ^{cde}	3,200 ^c
14	V204	2,093^a	3,403^b
15	V212	1,865 ^b	2,350 ^h

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test).

Theo Đỗ Kim Nhung và Vũ Thành Công (2011), trong số 16 chủng vi khuẩn cố định N phân lập từ đất trồng mía, chủng A1 có khả năng cố định N với hàm lượng $N-NH_4^+$ là 8,09 mg/L sau 4 ngày nuôi cấy [10].

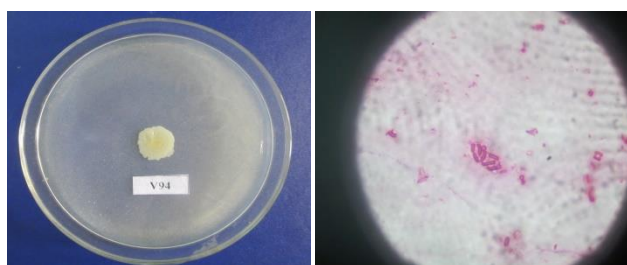
Như vậy, có thể thấy rằng khả năng cố định N của các chủng vi khuẩn phân lập từ RNM yếu hơn so với chủng vi khuẩn phân lập từ các nguồn khác. Điều này có thể do điều kiện sinh trưởng, phát triển ở RNM có phần khắc nghiệt hơn nhưng cũng có thể do thời gian nghiên cứu chưa nhiều, tần số phân lập chưa đủ lớn để phát hiện được sự đa dạng của nhóm vi khuẩn này ở vùng RNM.

3.4. Kết quả định danh chủng vi khuẩn

3.4.1. Chủng V94

Chủng vi khuẩn V94 được nuôi cấy trên môi trường Ashby thạch đĩa. Hình thái khuẩn lạc có những đặc điểm sau: khuẩn lạc màu vàng, dày, méo, bờ không đều, không tiết sắc tố ra môi trường. Tiêu bản nhuộm đơn tế bào chủng V94 có hình que dài.

Chủng vi khuẩn V94 được phân loại bằng giải trình tự gen 16S rRNA và tra cứu trên Blast search để xác định loài. Kết quả được trình bày ở bảng 4.



Hình 3. Khuẩn lạc và tiêu bản của chủng V94

Bảng 4. Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn V94

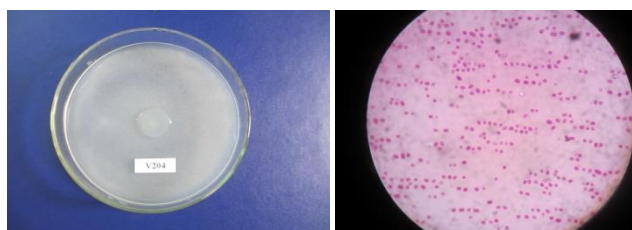
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
848 bits(459)	0.0	483/495(98%)	0/495(0%)	Plus/Plus
Query 1	CCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAGGGG			60
Sbjct 11	CCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGG			70
Query 61	TGCTTGCACTCCGATTCCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGT			120
Sbjct 71	AGCTTGCTCCATGATTCCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGT			130
Query 121	GGGGGATAACGTTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGTGGGG			180
Sbjct 131	GGGGGACAACGTTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGTGGGG			190
Query 181	GATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGCGAGGTAA			240
Sbjct 191	GATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGCGAGGTAA			250
Query 241	AGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACT			300
Sbjct 251	AGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACT			310
Query 301	GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAA			360
Sbjct 311	GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAA			370
Query 361	GCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGT			420
Sbjct 371	GCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGT			430
Query 421	TGGGAGGAAGGGCTGTAGGCTAATATCCTGCAGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCAC			480
Sbjct 431	TGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCAC			490
Query 481	CGGCTAACTTCGTGC 495			
Sbjct 491	CGGCTAACTTCGTGC 505			

Kết luận chủng V94 là *Pseudomonas pseudoalcaligenes* với tỷ lệ tương đồng là 98%.

3.4.2. Chủng V204

Chủng vi khuẩn V204 được nuôi cấy trên môi trường Ashby thạch đĩa, hình thái khuẩn lạc có những đặc điểm sau: khuẩn lạc màu trắng đục, tròn, bờ đều, không tiết sắc tố ra môi trường. Tiêu bản nhuộm đơn tế bào chủng V204 có hình que ngắn.

Chủng vi khuẩn V204 được phân loại bằng giải trình tự gen 16S rRNA và tra cứu trên Blast search để xác định loài. Kết quả được trình bày ở bảng 5.



Hình 4. Khuẩn lạc và tiêu bản của chủng V204

Bảng 5. Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn V204

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
915 bits(495)	0.0	497/498(99%)	0/498(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGA	60		
Sbjct 12	CTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGA	71		
Query 61	GAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGAT	120		
Sbjct 72	GAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGAT	131		
Query 121	GGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTG	180		
Sbjct 132	GGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTG	191		
Query 181	GGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTGGTAGGTGGGG	240		
Sbjct 192	GGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTGGTAGGTGGGG	251		
Query 241	TAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGA	300		
Sbjct 252	TAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGA	311		
Query 301	ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	360		
Sbjct 312	ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	371		
Query 361	CAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTC	420		
Sbjct 372	CAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTC	431		
Query 421	AGCGGGGAGGAAGGCGATGAGGTTAATAACCTTGTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAG	480		
Sbjct 432	AGCGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAATAACCTTGTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAG	491		
Query 481	CACCGGCTAACTCCGTGC	498		
Sbjct 492	CACCGGCTAACTCCGTGC	509		

Kết luận chủng V204 là *Klebsiella pneumonia* với tỷ lệ tương đồng là 99%.

4. KẾT LUẬN

- Từ 32 mẫu đất RNM ở Thừa Thiên Huế đã phân lập được 216 chủng vi khuẩn cố định N. Số lượng vi khuẩn cố định N trong các mẫu đất RNM dao động trong khoảng 0,66-26,34 x 10⁶ CFU/g đất khô.
- Tuyển chọn được hai chủng vi khuẩn cố định N mạnh là V94 và V204:
 - Chủng V94: tích lũy sinh khối 2,154 mg/mL và hàm lượng N-NH₄⁺ là 3,566 mg/L.
 - Chủng V204: tích lũy sinh khối 2,093 mg/mL và hàm lượng lượng N-NH₄⁺ là 3,403 mg/L.
- Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA: chủng V94 là *Pseudomonas pseudoalcaligenes* và chủng V204 là *Klebsiella pneumonia*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Kamlesh Kukreja, Sunita Suneja, Sneha Goyal and Neeni Narula (2004). Phytohormone production by *Azotobacter*- A review, *Agric. Rev.*, 25(1): 70-75.
- [2]. Phạm Thị Ngọc Lan (2012). *Thực tập Vi sinh vật học*. NXB Đại học Huế.
- [3]. Đoàn Văn Cung, Phạm Văn Quyến, Trần Thúc Sơn, Nguyễn Văn Súc, Trần Thị Tâm (1998). *Sổ tay phân tích đất, nước, phân bón cây trồng*. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
- [4]. Sambrook J. and Russell D. W. (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 35-68.
- [5]. Tamura, K., et al. (2013), “MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0”, *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), pp. 2725-2729.
- [6]. Phạm Thị Ngọc Lan, Lê Thị Hương Xuân (2005). Tìm hiểu vi khuẩn cố định nitơ sống tự do trong đất canh tác bạc màu ở Thừa Thiên Huế. *Báo cáo khoa học hội thảo toàn quốc Đa dạng Sinh học Việt Nam*. Hà Nội, tr.120-125.
- [7]. Dittmar T., Lara RJ. (2000). Driving forces behind nutrient and organic matter dynamics in a mangrove tidal creek in north Brazil. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 52: 249-259.
- [8]. Cleveland CC. (1999). Global patterns of terrestrial biological nitrogen fixation. *Glob. Biogeochem. Cycles* 13: 623-645.
- [9]. Phạm Thị Ngọc Lan, Trương Văn Lung (1999). Bước đầu nghiên cứu vi khuẩn *Azotobacter* trong đất gò đồi tỉnh Thừa Thiên – Huế, Báo cáo khoa học. *Chương trình nghiên cứu Công nghệ Sinh học quốc gia KHCN -02 - Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường - Hội nghị Công nghệ Sinh học*, NXB Khoa học & Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 406-411.
- [10]. Đỗ Kim Nhung, Vũ Thành Công (2011). Khảo sát khả năng sinh tổng hợp IAA và cố định đạm của vi khuẩn *Gluconacetobacter* sp. và *Azospirillum* sp. được phân lập từ cây mía. *Tạp chí khoa học*. Đại học Cần Thơ, tr. 161-167.

ISOLATION AND SELECTION OF NITROGEN FIXING BACTERIA FROM SOIL OF MANGROVE IN THUA THIEN HUE PROVINCE

Pham Thi Ngoc Lan, Nguyen Thi Viet*

Department of Biology, Hue University College of Sciences

*Email: vietnguyensinh33@gmail.com

ABSTRACT

*To make biological products contributing to improve the effectiveness of recovery from planting and the development of mangrove ecosystems, strains of nitrogen fixing bacteria were isolated and selected. The research results showed that the number of bacteria in soil samples of mangroves in Thua Thien Hue province was rather high, from 0.66×10^6 to 26.34×10^6 CFU/ g. There were 216 strains of nitrogen fixing bacteria isolated, and two strains V94 and V204 with strong nitrogen fixation were chosen. The results of DNA sequencing: strain V94 is *Pseudomonas pseudoalcaligenes* and strain V204 is *Klebsiella pneumonia*.*

Keywords: *isolation, mangrove plants, nitrogen fixing bacteria, selection.*