

TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG CỐ ĐỊNH NITƠ VÀ TỔNG HỢP INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA) TỪ ĐẤT TRỒNG CÀ CHUA Ở MỘT SỐ XÃ, PHƯỜNG TẠI TỈNH THÁI NGUYÊN

Trần Văn Chí^{1*}, Nguyễn Mạnh Tuấn², Ngô Xuân Bình¹, Nguyễn Duy Dũng¹,
Lã Văn Hiền¹, Nguyễn Đức Tuấn¹, Nguyễn Xuân Vũ¹, Phạm Thị Tuyết Mai¹

¹Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

²Viện Khoa học sự sống, Đại học Thái Nguyên

*Tác giả liên hệ: tranvanchi@tuaf.edu.vn

Ngày nhận bài: 19.09.2022

Ngày chấp nhận đăng: 20.12.2022

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ và tổng hợp IAA mạnh. Từ 32 mẫu đất trồng cà chua thu tại tỉnh Thái Nguyên đã phân lập được 5 chủng vi khuẩn có cả hai hoạt tính trên. Từ đó tuyển chọn được chủng MN26 có hoạt tính cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA mạnh nhất tương ứng với 20,822 $\mu\text{g/ml}$ NH_4^+ khi nuôi trên môi trường Ashby và 77,2344 $\mu\text{g/ml}$ IAA trên môi trường Ashby bổ sung 0,1% L-Tryptophan. Kết quả so sánh trình tự gen 16S-rRNA của chủng MN26 cho tỷ lệ tương đồng 98,88% với chủng *Flavobacterium tistrianum* GB 56.1^T (KT223144). Sơ đồ phả hệ cho thấy chủng MN26 giữ một trí độc lập với *Flavobacterium tistrianum* GB 56.1^T. Dựa vào dữ liệu phân tích trình tự gen 16S Rna, chủng MN26 có thể được coi là ứng viên loài mới thuộc chi *Flavobacterium*, với danh pháp khoa học là *Flavobacterium* sp. MN26. Đánh giá đặc điểm nuôi cấy cho thấy chủng MN26 có khả năng sinh 8 loại enzyme (Phosphatase alkaline, Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Trypsine, Phosphatase acide, Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase, β -galactosidase, D-glucosidase), có khả năng đồng hóa các nguồn carbon, bao gồm D-glucose, L-arabinose, D-mannose, D-mannitol, D-maltose, L-rhamnose, D-ribose, Inositol, D-saccharose, N-acetyl-glucosamine, Malic acid, Phenylacetic acid, Potassium gluconate, Sodium acetate và Trisodium citrate; có khả năng sinh Indole và không có khả năng chuyển hóa nitrate thành nitrite.

Từ khóa: Cố định nitơ, tổng hợp indole-3-acetic axit, *Flavobacterium*.

Selection of Bacterial Strains Capable of Nitrogen Fixation and Indole-3-acetic Acid (IAA) Biosynthesis from Tomato-Grown Soil in some Communes and Wards in Thai Nguyen Province

ABSTRACT

The objective of this study was to select bacterial strains with strong nitrogen fixation and IAA biosynthesis ability. Five strains with both activities were selected from 32 tomato soil samples collected in Thai Nguyen province. The strain MN26 was selected for its strongest nitrogen fixation and IAA biosynthetic activity, corresponding to 20.82 $\mu\text{g/ml}$ NH_4^+ when grown on Ashby medium and 77.23 $\mu\text{g/ml}$ IAA on Ashby medium supplemented with 0.1% L-Tryptophan. Based on 16S rRNA gene sequence analysis data and phylogenetic tree, the strain MN26 could be considered as a new species candidate belonging to the genus *Flavobacterium* with scientific name as *Flavobacterium* sp. MN26. Results of culture characterization showed that *Flavobacterium* sp. MN26 was capable of producing 8 enzymes (phosphatase alkaline, leucine arylamidase, valine arylamidase, trypsin, phosphatase acid, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, β -galactosidase, and D-glucosidase) and capable of assimilation of various carbon sources including D-glucose, L-arabinose, D-mannose, D-mannitol, D-maltose, L-rhamnose, D-ribose, inositol, D-saccharose, N-acetyl-glucosamine, malic acid, phenylacetic acid, potassium gluconate, sodium acetate and trisodium citrate. The strain MN26 was capable of producing indole but incapable of converting nitrate to nitrite.

Keywords: Nitrogen fixation, IAA biosynthesis, *Flavobacterium*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thực tế hiện nay cho thấy, phần lớn lượng đạm sử dụng cho cây trồng được tạo ra từ con đường tổng hợp hóa học. Các bằng chứng khoa học đã chỉ rõ, việc lạm dụng đạm hóa học trong thời gian dài tiềm ẩn nhiều rủi ro cho con người và môi trường sinh thái (Ladha & cs., 2005). Chính vì vậy, khai thác nguồn nitơ dồi dào trong khí quyển phục vụ cho sản xuất nông nghiệp được đặt ra.

Vi sinh vật có khả năng cố định nitơ là một trong các giải pháp hữu hiệu cho nền nông nghiệp hiện đại. Quá trình cố định nitơ tự do của vi sinh vật được phát hiện năm 1901 bởi Beijerinck, đây được xem là một trong những phát hiện tiêu biểu của thế kỷ XX trong nông nghiệp (Wagner, 2011). Ứng dụng nhóm vi sinh vật cố định nitơ sẽ góp phần làm hạn chế sử dụng các loại phân bón hóa học (Orr & cs., 2011). Đã có nhiều công trình nghiên cứu được triển khai giúp các nhà khoa học có được cái nhìn tổng quan về vai trò của vi sinh vật cố định nitơ trong sản xuất nông nghiệp. Theo Nguyễn Lâm Dũng & cs. (2001), vi khuẩn cố định nitơ gồm có hai nhóm lớn: (1) vi khuẩn cố định nitơ tự do và (2) vi khuẩn cố định nitơ cộng sinh. Trong đó, các nhóm vi khuẩn sống tự do trong đất tiêu biểu như *Cyanobacteria*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* và *Azotobacter* có thể cố định nitơ lên đến 60kg N/ha/năm (Kahindi & cs., 1997).

Nhiều vi khuẩn bên cạnh khả năng cố định nitơ còn có khả năng sản sinh ra IAA - một loại hormone nhóm Auxin, đóng vai trò quan trọng cho điều hòa sinh trưởng ở thực vật (Zhao, 2010). IAA còn ngăn chặn và trì hoãn hiện tượng sinh lý của lá, thúc đẩy sự ra hoa, tạo quả. Theo Sergeeva & cs. (2002), một số nhóm vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp IAA từ tiền chất L-tryptophan. Hàm lượng IAA được sinh tổng hợp ở nồng độ tryptophan 50 và 500 $\mu\text{g/l}$ bổ sung lần lượt dao động 1,47-3,6 $\mu\text{g/ml}$ tăng lên 10,17-22,02 $\mu\text{g/ml}$ (Ahmad & cs., 2008).

Hiện nay, sản xuất nông nghiệp phụ thuộc vào việc sử dụng phân bón hóa học quy mô lớn. Vì chúng cung cấp các chất dinh dưỡng cần thiết cho cây trồng, như nitơ, phot pho và

kali. Tuy nhiên, việc sử dụng loại phân bón này quá mức có thể gây ra những tác động môi trường khó lường và có tác động tiêu cực đến các tính chất vật lý, hóa học và sinh học của đất. Ô nhiễm nước ngầm, mất độ phì nhiêu của đất, giảm đa dạng sinh học (Yadav & cs., 2017; Baez & cs., 2017). Do đó nền nông nghiệp đang hướng tới một cách tiếp cận bền vững hơn và thân thiện với môi trường. Các chiến lược hiện đại làm tăng năng suất nông nghiệp nhấn mạnh tầm quan trọng của chế phẩm vi sinh trong việc hiện thực hóa mục tiêu của chúng. Ứng dụng của các sản phẩm vi sinh có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA đang được áp dụng ngày một rộng rãi trên thế giới. Nhiều nước trên thế giới đã sản xuất chế phẩm vi sinh theo nhiều hướng khác nhau, nhiều dạng khác nhau, tùy thuộc vào điều kiện tự nhiên, kinh tế, xã hội và khoa học công nghệ, trình độ dân trí của mỗi quốc gia. Nhưng tất cả đều hướng tới một mục tiêu chung là: Tiềm lợi cho người sử dụng, giảm thiểu ô nhiễm môi trường và đạt hiệu quả kinh tế cao.

Trong các loại rau, cà chua là loại rau ăn quả được ưu chuộng. Đây là nguồn thực phẩm cung cấp dinh dưỡng cần thiết cho cơ thể người như: β -Caroten, chất khoáng Ca, Fe, P, S, K, Mg, Na... đường và các loại vitamin A, B, C, E và PP (Thế Mậu, 2003). Theo số liệu thống kê của tỉnh Thái Nguyên, năm 2021 toàn tỉnh có 299ha diện tích đất trồng cà chua, với tổng sản lượng 6.575 tấn/năm. Con số khá khiêm tốn và còn nhiều tiềm năng phát triển cho loại cây trồng này để đáp ứng nhu cầu thị trường trong và ngoài tỉnh. Do vậy nghiên cứu về vi sinh có khả năng cố định nitơ và tổng hợp IAA từ đất trồng cây cà chua sẽ góp phần làm giàu thêm thông tin nguồn gen vi sinh vật có hoạt tính quý hướng tới ứng dụng vào lĩnh vực sản xuất phân vi sinh phục vụ ngành trồng trọt và bảo vệ môi trường sinh thái bền vững.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thu mẫu

Thu mẫu đất ở một số phường, xã trồng cà chua theo phương pháp theo TCVN 7538-6:2010. Mẫu đất được thu tại các ruộng trồng cà

chưa 01 vụ trong năm, lấy vào thời điểm cây cà chua bắt đầu ra hoa. Mẫu được lấy ở độ sâu 6-15cm, sau khi đã loại bỏ khoảng 5cm phần đất và tàn dư thực vật. Tổng số 32 mẫu, được thu thập tại một số xã, phường ở thành phố Thái Nguyên (5 mẫu), Sông Công (4 mẫu), Phổ Yên (2 mẫu); các huyện: Đại Từ (3 mẫu), Phú Lương (5 mẫu), Phú Bình (4 mẫu), Định Hóa (3 mẫu), Đồng Hỷ (4 mẫu), Võ Nhai (2 mẫu).

2.2. Phép lập vi khuẩn

Các mẫu đất được nghiền mịn, pha loãng đến các cấp độ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} trong các ống nghiệm chứa nước muối sinh lý (0,85%) đã vô trùng. Các chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ được phân lập theo phương pháp của Koch, nuôi cấy trên môi trường đặc vô đạm Ashby (Phạm Thị Ngọc Lan & Nguyễn Thị Việt, 2016).

2.3. Phân tích chỉ tiêu chất lượng

Định tính khả năng sinh tổng hợp IAA của vi khuẩn bằng cách bổ sung thuốc thử Salkowski vào dịch nuôi cấy các chủng vi khuẩn, dịch nuôi sẽ chuyển sang màu đỏ nếu có IAA (TCVN10784:2015).

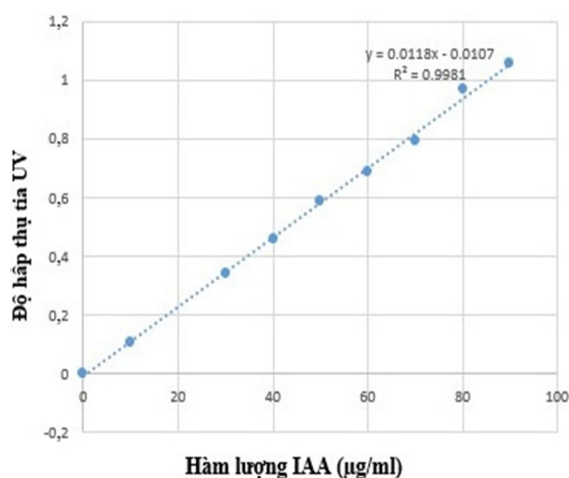
Xác định khả năng sinh IAA: Vi khuẩn được nuôi trong môi trường lỏng Ashby có bổ sung 0,01% tryptophan, nuôi lắc (180-200 vòng/phút) ở 30°C trong 6 ngày. Hàm lượng IAA thô được sinh ra trong dịch nuôi được xác định bằng phương pháp phản ứng màu với thuốc thử

Salkowski tạo ra sản phẩm có màu, so màu trên máy quang phổ ở bước sóng 530nm. Dựa vào đồ thị chuẩn IAA (Hình 1a) sẽ xác định được hàm lượng IAA (Glickmann & Dessaux, 1995).

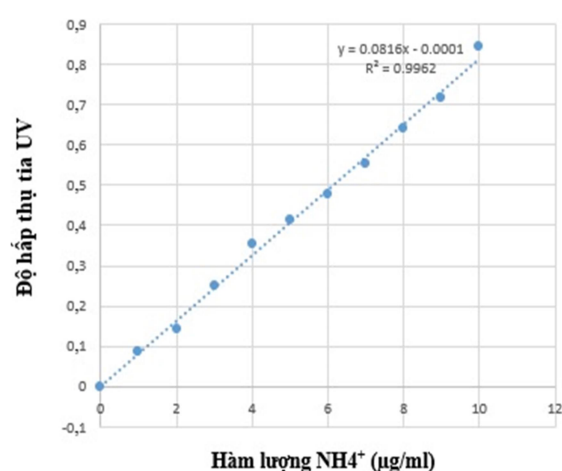
Phương pháp xác định khả năng cố định nitơ: Nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy Ashby lỏng, nuôi lắc 180 vòng/phút ở 30°C trong 6 ngày. Ly tâm thu dịch trong và xác định nồng độ NH_4^+ được cố định bởi chủng vi khuẩn trong dịch nuôi bằng phương pháp so màu với thuốc thử Nessler (Nguyễn Thị Thu Hằng & Nguyễn Thị Thủy, 2015), sử dụng đường chuẩn ammonium (Hình 1b).

Xác định đặc điểm sinh hóa của chủng tuyển chọn bằng kit API (ZYM, 32GN, 20NE) của Biomérieux được hướng dẫn bởi nhà sản xuất.

Định danh phân tử và xây dựng sơ đồ phả hệ: DNA tổng số của chủng tuyển chọn được tách chiết theo phương pháp của Sambrook & Russell (2001). Trình tự gen 16SrRNA được khuếch đại sử dụng cặp mồi 27F AGAGTTTGATCMTGGCTCAG và 1492R TACGGYTACCTTGTTACGACTT (Lane, 1991) và được đọc trình tự thông qua hệ thống Applied Biosystems 3730 xl DNA analyzer sử dụng Big Dye terminator cycle sequencing kit v.3.1 (Macrogen, Hàn Quốc). Sử dụng dữ liệu công bố trên EzTaxon để nhận diện chủng phân lập (Chun & cs., 2007). Đồng thời, vị trí phân loại của chủng phân lập được xây dựng bằng phần mềm MEGA 7 (Kumar & cs., 2016).



Hình 1a. Đồ thị chuẩn IAA



Hình 1b. Đồ thị chuẩn NH_4^+

2.4. Xử lý số liệu

Tất cả các số liệu thu thập là đại diện của ba thí nghiệm lặp lại. Kết quả thí nghiệm được phân tích phương sai một nhân tố trên phần mềm SPSS 20.0 và Microsoft Excel. Sự khác biệt của giá trị trung bình giữa các công thức được đánh giá nhờ kiểm định Duncan ở độ tin cậy 95%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA từ đất trồng cà chua tại một số phường, xã ở tỉnh Thái Nguyên

Từ 32 mẫu đất trồng cà chua thu tại một số phường, xã ở tỉnh Thái Nguyên, tác giả phân lập được 5 chủng vi khuẩn. Các chủng vi khuẩn này có khả năng sống trên môi trường vô đạm Ashby cho phép kết luận sơ bộ rằng chúng có khả năng cố định nitơ. Kết quả phân tích định tính cho thấy cả 5 chủng đều có khả năng tổng hợp IAA. Một số đặc điểm: hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào, tính chất Gram và khả năng di động của các chủng mới phân lập được thể hiện qua bảng 1.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, khuẩn lạc có dạng hình tròn, màu trắng sữa và trong, bề mặt trơn bóng, không rìa. Tế bào có dạng phẩy, que ngắn và hình cầu, chúng đều có khả năng di động và thể hiện tính chất Gram âm. Như vậy, 5 chủng vi sinh vật mới phân lập được có nhiều đặc điểm về hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào khá khác nhau, nhưng chúng đều có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA. Cả 5 chủng này được tiếp tục nghiên cứu để lựa chọn ra một chủng có hoạt lực cố định nitơ và tổng hợp IAA mạnh nhất.

3.2. Tuyển chọn chủng có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA cao từ các chủng đã phân lập

Trong nghiên cứu này, việc tuyển chọn chủng vi sinh vật căn cứ vào hai tiêu chí: (1) khả năng cố định nitơ và (2) khả năng tổng hợp IAA. Kết quả đánh giá hai tiêu chí trên của 5 chủng

vi sinh vật phân lập được khi nuôi cấy chúng trong môi trường tương ứng sau 6 ngày thể hiện qua bảng 2. Kết quả khẳng định nhận định ở trên (5 chủng đều có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA) là đúng. Tuy nhiên hoạt lực cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA của 5 chủng là khác nhau. Chủng MN45 có hoạt lực yếu nhất, với khả năng cố định nitơ 5,4263 $\mu\text{g/ml}$, khả năng tổng hợp IAA 16,048 $\mu\text{g/ml}$. Trong khi đó, hoạt lực mạnh nhất là chủng MN26 với khả năng cố định nitơ 20,822 $\mu\text{g/ml}$, khả năng tổng hợp IAA 77,2344 $\mu\text{g/ml}$.

Hoạt lực tổng hợp IAA và cố định nitơ của chủng MN26 cao hơn so với kết quả công bố của Nguyễn Anh Huy & Nguyễn Hữu Hiệp (2018) khi nghiên cứu khả năng cố định nitơ và tổng hợp IAA của chủng vi khuẩn PL9 được phân lập từ vùng đất sản xuất lúa - tằm ở Bạc Liêu với khả năng cố định nitơ đạt 1,78 $\mu\text{g/ml}$ và tổng hợp IAA đạt 35,8 $\mu\text{g/ml}$ sau 6 ngày nuôi. Kết quả này cũng cao hơn so với công bố của Nguyễn Thị Thu Hằng & Nguyễn Thị Thủy (2015) với chủng AZT1 và AZT7 được phân lập từ đất trồng lúa ở Hà Nội, chúng có khả năng cố định nitơ phân tử thành nitơ dạng ammonium (NH_4^+) tương ứng là 3,36 $\mu\text{g/ml}$ và 3,32 $\mu\text{g/ml}$ và tổng hợp IAA tương ứng là 10,11 $\mu\text{g/ml}$ và 12,87 $\mu\text{g/ml}$. Khả năng tổng hợp IAA của chủng MN26 tương ứng khả năng tổng hợp IAA của chủng HC21 (73,92 $\mu\text{g/ml}$) được công bố bởi Trần Thị Xuân Phương & cs. (2017) khi tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA trong đất trồng lúa ở tỉnh Thừa Thiên Huế.

Như vậy, chủng MN26 là chủng có hoạt lực cố định cao nhất trong 5 chủng đã được phân lập và cao hơn so với một số công bố trước đó. Do vậy, chủng MN26 được tuyển chọn phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Xác định đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn được tuyển chọn

3.3.1. Định danh chủng vi khuẩn được tuyển chọn

Kết quả phân tích trình tự gen 16S rRNA (1.442bp) cho thấy chủng MN26 thể hiện mức độ tương đồng cao về trình tự gen với các loài đã công bố thuộc chi *Flavobacterium*, cụ thể

98,88% mức độ giống nhau với *Flavobacterium tistrianum* GB 56.1^T (KT223144), 98,61% với *Flavobacterium sharifuzzamanii* A7.6^T (QJGZ01000021) và 98,33% với *Flavobacterium zhairuonense* A5.7^T (MK248099) (Bảng 3).

Theo báo cáo của Browne & cs. (2016) về giới hạn giá trị so sánh giữa trình tự gen 16S-rRNA của chủng phân lập với các loài đã công bố lớn hơn 98,7% thì chủng MN26 thuộc chi *Flavobacterium* và gần nhất với loài *Flavobacterium tistrianum* GB 56.1^T. Tuy nhiên, sơ đồ phả hệ (phylogenetic tree) được thiết lập (Hình 2) cũng cho thấy chủng MN26 được sắp xếp thuộc chi *Flavobacterium* và gần nhất với loài *Flavobacterium tistrianum* GB 56.1^T (KT223144), nhưng chủng MN26 giữ một trí độ lập với *Flavobacterium tistrianum* GB 56.1^T. Dữ liệu so sánh trình tự gen và sơ đồ phả hệ cho thấy chủng MN26 có thể được coi là ứng viên loài mới thuộc chi *Flavobacterium*, với danh pháp khoa học là *Flavobacterium* sp. MN26.

Hầu hết các nghiên cứu về khả năng cố

định nitơ và sản sinh IAA được công bố ở nước ta chủ yếu tập trung vào các chi *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Azotobacter*... trong khi đối với chi *Flavobacterium* gần như chưa có công bố cho tới nay. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, thành viên của *Flavobacterium* được chứng minh có khả năng cố định nitơ, cũng như sản sinh IAA (Kämpfer & cs., 2015; Walitang & cs., 2017; Youseif, 2018). Tiêu biểu, *Flavobacterium nitrogenifigens* có khả năng cố định nitơ với tốc độ 48nM ethylen/ml trong 24 giờ (Kämpfer & cs., 2015), *Flavobacterium* sp. strain JS2 sản sinh IAA ở hàm lượng 40,27 µg/ml (tăng lên 82,8 µg/ml trong môi trường có bổ sung ở 0,5 mg/ml Tryptophan) (Youseif, 2018). Sự có mặt của các chủng *Flavobacterium* sp. IC27-25, *Flavobacterium* sp. FL478-19 và *Flavobacterium* sp. IR29-16 tác động tích cực tăng chiều dài rễ của lúa từ 8-12% (Walitang & cs, 2017). Một báo cáo khác cũng cho thấy chủng *Flavobacterium* sp. NGB-31 có tác động tăng chiều dài chồi và chiều dài rễ của cây ngô lần lượt là 47,68 và 37,93% so với đối chứng (Youseif, 2018).

Bảng 1. Kết quả phân lập vi khuẩn có khả năng cố định nitơ từ 32 mẫu đất trồng cà chua tại một số phường, xã ở tỉnh Thái Nguyên

Ký hiệu chủng	Địa điểm lấy mẫu	Đặc điểm hình thái khuẩn lạc	Đặc điểm hình thái tế bào	Tính chất Gram	Khả năng di động	Khả năng cố định nitơ	Khả năng tổng hợp IAA
MN26	Đại Từ	Trong, tròn bề mặt bóng, không rìa, nhót	Dấu phẩy	-	+	+	+
MN45	Phú Lương	Trắng sữa, tròn, không rìa, trơn	Que ngắn	-	+	+	+
MN102	Phú Lương	Trong, lồi, bề mặt bóng, không rìa	Que ngắn	-	+	+	+
MN105	Phú Bình	Trong, dẹt, bề mặt ráp, rìa gọn	Que ngắn	-	+	+	+
MN106	Đồng Hỷ	Trong, tròn, có nhân, không rìa	Cầu	-	+	+	+

Ghi chú: (-): Gram âm/không có khả năng; (+): Gram dương/có khả năng.

Bảng 2. Kết quả so sánh hoạt tính cố định nitơ và tổng hợp IAA của 5 chủng phân lập được

Ký hiệu chủng	Khả năng tổng hợp IAA (µg/ml)	Khả năng cố định nitơ (µg/ml)
MN26	77,2344 ^a	20,822 ^a
MN45	16,0480 ^e	5,4263 ^e
MN102	26,9802 ^d	7,5621 ^c
MN105	32,6581 ^c	6,2358 ^d
MN106	50,5113 ^b	17,526 ^b

Ghi chú: Các chữ trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $P \leq 0,05$

Đánh giá khả năng kháng nấm *Collectotrichum* gây bệnh thán thư trên quả thanh long bởi các chủng *Streptomyces* sp.

Bảng 3. So sánh sự tương đồng về trình tự gen 16S rRNA của chủng MN26 với các loài gần nhất công bố trên dữ liệu EzTaxon

Loài gần nhất	Mức độ tương đồng (%)
<i>Flavobacterium tistrianum</i> GB 56.1 ^T (KT223144)	98,88
<i>Flavobacterium sharifuzzamanii</i> A7.6 ^T (QJGZ01000021)	98,61
<i>Flavobacterium zhairuonense</i> A5.7 ^T (MK248099)	98,33
<i>Flavobacterium anhuiense</i> D3 ^T (EU046269)	98,00
<i>Flavobacterium nitrogenifigens</i> NXU-44 ^T (KP711654)	97,80
<i>Flavobacterium ginsenosidimutans</i> THG 01 ^T (GU138377)	97,77
<i>Flavobacterium chungangensis</i> MAH-10 ^T (KY964277)	97,40
<i>Flavobacterium defluvii</i> EMB117 ^T (DQ372986)	97,28
<i>Flavobacterium daemonense</i> THG-DJ7 ^T (KF532125)	97,28

Bảng 4. Một số đặc điểm nuôi cấy của chủng *Flavobacterium* sp. MN26

Đặc điểm hóa sinh khảo sát	Thể hiện của chủng MN26	Đặc điểm hóa sinh khảo sát	Thể hiện của chủng MN26
Sinh Phosphatase alkaline	+	Đồng hóa D-glucose	+
Sinh Esterase (C4)	-	Đồng hóa L-arabinose	+
Sinh Esterase Lipase (C8)	-	Đồng hóa D- mannose	+
Sinh Lipase (C14)	-	Đồng hóa D-mannitol	+
Sinh Leucine arylamidase	+	Đồng hóa N-acetyl-glucosamine	+
Sinh Valine arylamidase	+	Đồng hóa D-maltose	+
Sinh Cystine arylamidase	-	Đồng hóa Potassium gluconate	+
Sinh Trypsine	+	Đồng hóa Capric acid	-
Sinh D-chymotrypsine	-	Đồng hóa Adipic acid	-
Sinh Phosphatase acide	+	Đồng hóa Malic acid	+
Sinh Naphtol-AS-BI- phosphohydrolase	+	Đồng hóa Sodium acetate	+
Sinh D-galactosidase	-	Đồng hóa Trisodium citrate	+
Sinh β -galactosidase	+	Đồng hóa Phenylacetic acid	+
Sinh β -glucuronidase	-	Đồng hóa L-rhamnose	+
Sinh D-glucosidase	+	Đồng hóa D-ribose	+
Sinh β -glucosidase	-	Đồng hóa Inositol	+
Sinh N-acetyl- β -glucosaminidase	-	Đồng hóa D-saccharose	+
Sinh D-mannosidase	-	Chuyển hóa nitrate thành nitrite	-
Sinh D-fucosidase	-	Sinh Indole	+

Ghi chú: (-): Âm tính/không có khả năng; (+): dương tính/có khả năng.

3.3.2. Đánh giá một số đặc điểm nuôi cấy của chủng *Flavobacterium* sp. MN26

Thông tin về đặc điểm nuôi cấy của chủng vi sinh vật là cần thiết, góp phần hỗ trợ cho các nghiên cứu sau về thiết kế và tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy, đồng thời bổ sung thêm vào cơ sở dữ liệu về nguồn gen vi sinh vật có khả năng cố

định nitơ và sinh tổng hợp IAA. Sử dụng kit API để xác định một số đặc điểm nuôi cấy của chủng *Flavobacterium* sp. MN26, kết quả được thể hiện qua bảng 4. Kết quả cho thấy chủng *Flavobacterium* sp. MN26 có khả năng sinh 8 loại enzyme (Phosphatase alkaline, Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Trypsine,

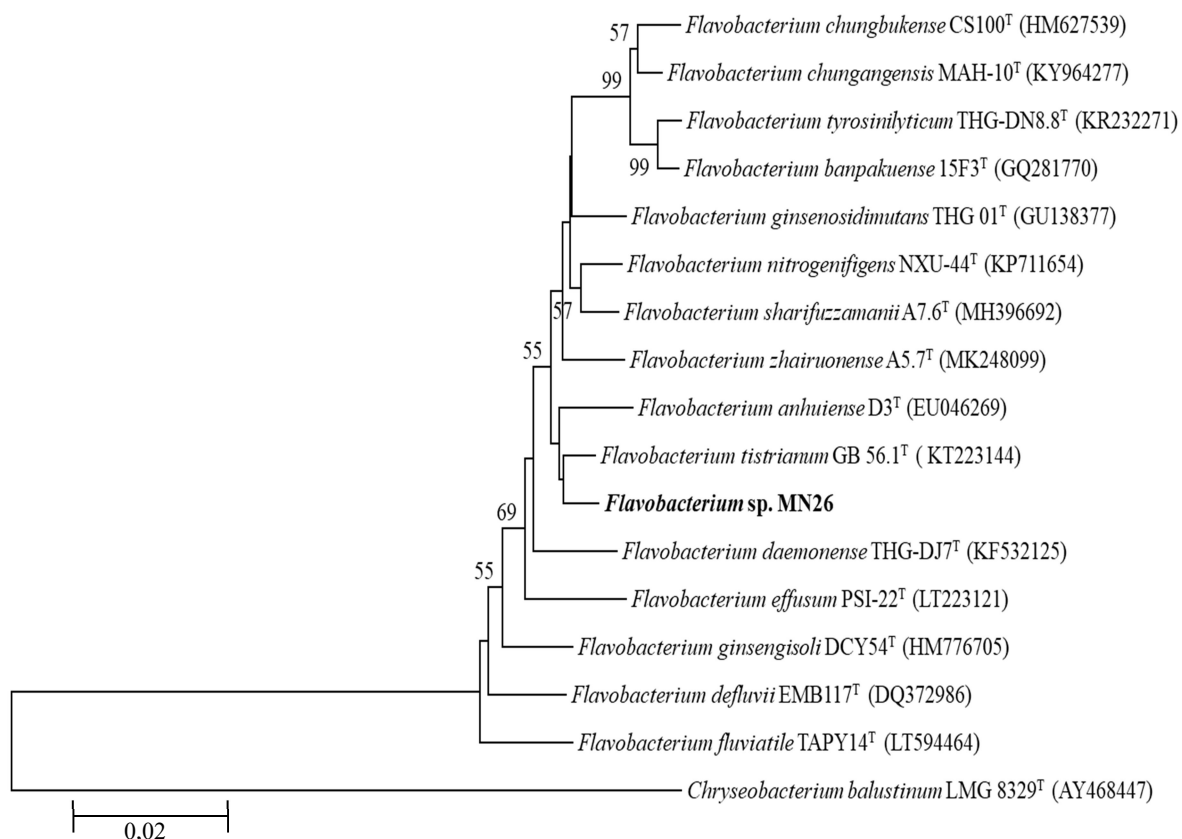
Phosphatase acide, Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase, β -galactosidase, D-glucosidase), có khả năng đồng hóa các nguồn carbon, bao gồm D-glucose, L-arabinose, D-mannose, D-mannitol, D-maltose, L-rhamnose, D-ribose, Inositol, D-saccharose, N-acetyl-glucosamine, Malic acid, Phenylacetic acid, Potassium gluconate, Sodium acetate và Trisodium citrate; có khả năng sinh Indole và không có khả năng chuyển hóa nitrate thành nitrite.

Chủng *Flavobacterium* sp. MN26 có đặc điểm nuôi cấy khá tương đồng với chủng *Flavobacterium tistrianum* sp. được công bố bởi Chatrudee & cs. (2016). Tuy nhiên, có điểm khác biệt là chủng *Flavobacterium* sp. MN26 có khả năng sinh Trypsin trong khi đó chủng *Flavobacterium tistrianum* sp. được nghiên cứu bởi Chatrudee & cs. (2016) không có khả năng

này. Điều này góp phần khẳng định sự phù hợp của sơ đồ phả hệ (Hình 2) khi trình diễn chủng MN26 giữ một trí độc lập với *Flavobacterium tistrianum* GB 56.1^T.

4. KẾT LUẬN

Từ 32 mẫu đất trồng cà chua thu tại tỉnh Thái Nguyên 5 chủng vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA đã được phân lập. Từ đó 1 chủng có hoạt lực cố định nitơ và tổng hợp IAA mạnh nhất đã được tuyển chọn với khả năng cố định nitơ 20,822 $\mu\text{g/ml}$ và khả năng tổng hợp IAA 77,2344 $\mu\text{g/ml}$. Sử dụng trình tự 16S_rRNA để định danh, cụ thể đã đưa ra danh pháp khoa học của chủng tuyển chọn là *Flavobacterium* sp. MN26. Chủng *Flavobacterium* sp. MN26 có khả năng sinh 8 loại enzyme (Phosphatase alkaline, Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Trypsine,



Ghi chú: Các giá trị ở các vị trí phân nhánh với tần số xuất hiện (bootstrap) 1000 phép so sánh (chỉ giữ lại giá trị $\geq 50\%$); *Chryseobacterium balustinum* LMG 8329^T (AY468447) là ngoài chi *Flavobacterium*.

Hình 2. Sơ đồ phả hệ của chủng MN26 với các loài gần nhất thuộc chi *Flavobacterium*

Tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ và tổng hợp indole-3-acetic acid (IAA) từ đất trồng cà chua ở một số xã, phường tại tỉnh Thái Nguyên

Phosphatase acide, Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase, β -galactosidase, D-glucosidase), có khả năng đồng hóa các nguồn carbon, bao gồm D-glucose, L-arabinose, D-mannose, D-mannitol, D-maltose, L-rhamnose, D-ribose, Inositol, D-saccharose, N-acetyl-glucosamine, Malic acid, Phenylacetic acid, Potassium gluconate, Sodium acetate và Trisodium citrate. Chủng MN26 có khả năng sinh Indole và không có khả năng chuyển hóa nitrate thành nitrite.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự tài trợ kinh phí từ đề tài khoa học công nghệ cấp Quốc gia của Bộ Khoa học và Công nghệ: “Khai thác phát triển nguồn gen vi khuẩn có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp Indole-3-acetic acid ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp”, mã số NVQG-2021/ĐT.04.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmad F., Ahmad I. & Khan MS. (2008): Screening of free-living Rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*. 163(2): 173-181.
- Bộ Khoa học và Công nghệ (2010). TCVN 7538-6:2010: Chất lượng đất - Lấy mẫu. Phần 6. Hướng dẫn về thu thập, xử lý và bảo quản mẫu đất ở điều kiện hiếu khí để đánh giá các quá trình hoạt động, sinh khối và tính đa dạng cấu vi sinh vật trong phòng thí nghiệm.
- Bộ Khoa học và Công nghệ (2015). TCVN10784:2015: Vi sinh vật - Xác định khả năng sinh tổng hợp axit 3-Indol-acetic (IAA).
- Browne H.P., Forster S.C., Anonye B.O., Kumar N., Neville B.A., Stares M.D., Goulding D. & Lawley T.D. (2016). Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature*. 533(7604):543-546.
- Chatrudee S., Kanjana R., Suksan S., Sophea P., Bundit F., Chantara P. & Song-GK. (2016). *Flavobacterium tistrianum* sp. Nov., a gliding bacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66: 2241-2246.
- Chun J., Lee J.H., Jung Y., Kim M., Kim S., Kim B.K. & Lim Y.W. (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*. 57(10): 2259-2261.
- Glickmann E. & Dessaux Y. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Apply Environ Microbiol*. 61: 793-795.
- Kahindi J.H.P., Woomer P., George T., Souza Moreira F.M., Karanja N.K. & Giller K.E. (1997). Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. *Applied Soil Ecology*. 6: 55-76.
- Kämpfer P., Busse H.J., McInroy J.A., Xu J. & Glaeser S.P. (2015). *Flavobacterium nitrogenifigens* sp. nov., isolated from switchgrass (*Panicum virgatum*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65(9): 2803-2809.
- Kumar S., Stecher G. & Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33(7): 1870-1974.
- Ladha J.K., Himanshu P., Timothy J.K., Six J. & Chris V.K. (2005). Efficiency of fertilizer Nitrogen in cereal production: Retrospects and prospects. *Advances in Agronomy*. 87: 85-156.
- Lane D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, E. Stackebrandt, M. Goodfellow (eds). John Wiley and Sons, New York. pp. 115-175.
- Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Đình Quyến & Phạm Văn Ty (2001). *Vi sinh vật học*. Nhà xuất bản Giáo dục.
- Nguyễn Thị Thu Hằng & Nguyễn Thị Thủy (2015). Tuyển chọn vi khuẩn *Azotobacter* có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*. 4: 3-9.
- Nguyễn Anh Huy & Nguyễn Hữu Hiệp (2018). Phân lập và nhận diện các dòng vi khuẩn chịu mặn có khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA từ đất sản xuất lúa - tôm ở Bạc Liêu, Sóc Trăng và Kiên Giang. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 54(1B): 7-12.
- Orr H.C., James A., Leifert C., Cooper J.M. & Cummings S.P. (2011). Diversity and activity of free-living nitrogen-fixing bacteria and total bacteria in organic and conventionally managed soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 77: 911-919.
- Phạm Thị Ngọc Lan & Nguyễn Thị Việt (2016). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cố định Nitrogen từ đất rừng ngập mặn ở Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Trường Đại học Khoa học - Đại học Huế*. 4(1): 63-72.

- Sambrook J., & Russell D.W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp.1-170.
- Sergeeva E., Liaimer A. & Bergman B. (2002). Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. *Planta*. 215: 229-238.
- Thế Mậu (2003). Cà chua - Bách khoa về sức khỏe. Nhà xuất bản Phụ nữ, Hà Nội. tr. 13-26.
- 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*. 1(1): 111-118.
- Wagner S.C. (2011). Biological Nitrogen Fixation. *Nature Education Knowledge*. 3(10): 15.
- Walitang D.I., Kim K., Madhaiyan M., Kim Y.K., Kang Y. & Sa T. (2017). Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of Rice. *BMC Microbiol*. 17 (1): 209.
- Youseif S.H. (2018). Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria and their effects on the growth of maize plants under greenhouse conditions. *Annals of Agricultural Sciences*. 63: 25-35.
- Yuan C.L., Mou C.X., Wu W.L. & Guo Y.B. (2011). Effect of different fertilization treatments on indole-3-acetic acid producing bacteria in soil. *Journal Soils Sediments*. 11: 322-329.
- Zhao Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual review of plant biology*. 61: 49.