

# PHÂN LẬP VÀ NHẬN DIỆN CÁC DÒNG VI KHUẨN AZOSPIRILLUM BẰNG KỸ THUẬT PCR

Nguyễn Hữu Hiệp<sup>1</sup>, Phạm Thị Khánh Vân<sup>2</sup>, Trần Văn Chiêu<sup>3</sup>  
Đào Thanh Hoàng<sup>3</sup> và Nguyễn Khắc Minh Loan<sup>4</sup>

## ABSTRACT

*Twenty bacterial strains isolated from roots and stem of wild rice, cultivated rice and weeds in rice field had similar characteristics to those of Azospirillum genus. Two specific primers 5'- GTA AAT CCA CCA CCT CCC -3' (forward) and 5'- TGT AGA TTT CCT GGG CCT -3' (reverse) were used to identify these strains. The results showed that 8/20 strains and the positive Azospirillum lipoferum strain had the same DNA band at the position of 400bp. Other strains did not have the same band with the control strain. Therefore, they were not belong to Azospirillum lipoferum species. Several studies need to be carried out to classify them before applying in the field.*

**Keywords:** isolation, Azospirillum lipoferum, PCR, primer, gen nifH

**Title:** Isolation and identification of Azospirillum strains using PCR technique

## TÓM TẮT

*20 dòng vi khuẩn phân lập được từ rễ và thân lúa hoang, lúa trồng và một số loại cỏ ở ruộng lúa có các đặc tính giống như giống Azospirillum đã được mô tả bởi các tác giả khác. Sử dụng cặp mồi chuyên biệt khuếch đại gen nifH của loài vi khuẩn Azospirillum lipoferum, Mồi xuôi: 5'- GTA AAT CCA CCA CCT CCC -3', Mồi ngược: 5'- TGT AGA TTT CCT GGG CCT -3' để nhận diện chúng bằng kỹ thuật PCR. Kết quả cho thấy có 8/20 dòng có các băng ADN ở vị trí 400bp giống như dòng vi khuẩn đối chứng Azospirillum lipoferum. Các dòng khác không có băng ADN tương ứng chứng tỏ chúng không thuộc loài Azospirillum lipoferum. Nhiều nghiên cứu cần được tiến hành trong tương lai để xác định các loài vi khuẩn còn lại trước khi ứng dụng thực tiễn.*

**Từ khóa:** phân lập, Azospirillum lipoferum, PCR, mồi, gen nifH

## 1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa gạo là một nguồn thực phẩm chính yếu nuôi sống gần phân nửa dân số thế giới. Để tăng trưởng, phát triển tốt và cho năng suất cao cây lúa cần nhiều chất dinh dưỡng khác nhau trong đó quan trọng nhất là chất đạm. Theo ước tính để sản xuất 1 tấn lúa (bao gồm hạt và rơm) cây lúa đã lấy từ đất 16-17 kgN (De Datta, 1981; Ponnampereuma và Deturck, 1993; Sahrawat, 2000). Tuy nhiên, hầu hết đất trồng lúa trên thế giới đều thiếu đạm. Vì vậy, để thỏa mãn nhu cầu về đạm cho cây lúa nông dân phải sử dụng phân đạm đặc biệt là phân urea. Thông thường chỉ có khoảng 30-40% phân đạm bón được cây lúa hấp thu (De Datta, 1978; Choudhury và Khanif, 2001 và Choudhury *et al*, 2002). Lượng phân đạm mất đi do sự khử đạm, bốc hơi và rửa trôi (Ponnampereuma, 1972 và De Datta và Buresh, 1989).

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học

<sup>2</sup> Trung tâm Giáo dục thường xuyên Tỉnh Bạc Liêu

<sup>3</sup> Lớp Cao học Công nghệ Sinh học khóa 9

<sup>4</sup> Lớp Công nghệ Sinh học khóa 27

Lượng đạm bị khử và bốc hơi làm ô nhiễm môi trường không khí (Reeves *et al*, 2002). Đạm rửa trôi làm ô nhiễm nguồn nước (Shrestha và Ladha, 1998). Để giải quyết các vấn đề trên, việc nghiên cứu cố định đạm cho cây lúa đóng vai trò quan trọng nhằm thay thế nguồn đạm hoá học, giảm ô nhiễm môi trường và không làm cạn kiệt nguồn chất hữu cơ của đất trồng lúa (Jeylabal và Kuppaswamy, 2001). Trong vòng 2 thập niên trở lại đây nhiều nghiên cứu đã được thực hiện nhằm tìm ra các nguồn vi sinh vật có khả năng cố định đạm cho lúa và một số cây họ hòa bản khác.

Nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới đã phát hiện được các nhóm vi khuẩn có khả năng cố định đạm cho cây lúa và giúp tăng năng suất cây lúa từ 15 % đến 54 % (Okon, 1994; Omar *et al*, 1989). Các nhóm vi khuẩn này đã và đang được phân lập tại nhiều vùng sinh thái khác nhau để tìm các loài thích hợp cho điều kiện khí hậu, đất đai của mỗi nước và các giống lúa sản xuất (Okon *et al*, 1994 ; Baldani *et al*, 1997). Các vi khuẩn này giúp cây tăng trưởng tốt hơn và làm gia tăng năng suất (Bashan *et al*, 2004), hoà tan lân dạng khoáng khó tan và các chất dinh dưỡng khác (Seshadri *et al*, 2002; Richardson, 2003), sản xuất kích thích tố thực vật (Vande Broek và Vanderleyden, 1995; Arshad *et al*, 1991); hay kiểm soát các vi sinh vật gây bệnh cho cây trồng (Rangarajan *et al*, 2003).

Ở đồng bằng sông Cửu Long, các nghiên cứu bước đầu của Hiệp *et al* (2002, 2003) cho thấy khi chủng vi khuẩn cố định đạm và hòa tan lân cho cây đậu nành đã giúp gia tăng năng suất đậu nành một cách đáng kể. Ở Việt nam từ trước đến nay chỉ có vài thông báo cho biết sử dụng chế phẩm vi sinh của nước ngoài để nhúng rễ mạ trước khi cấy giúp tăng năng suất lúa (KHKT Nông nghiệp, 1979).

Để có một nền nông nghiệp bền vững, môi trường không bị ô nhiễm, chi phí sản xuất thấp, tăng thu nhập cho người dân, chúng tôi tiến hành nghiên cứu các dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm sinh học cho cây lúa trồng ở ĐBSCL nhằm mục đích thay cho các loại phân đạm hóa học cũng là *ứng dụng công nghệ sinh học vào sản xuất*, một việc làm cần thiết và cấp bách cho ĐBSCL.

## 2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Phương tiện

Lúa hoang, lúa trồng và một số loại cỏ trong ruộng lúa ở một số Tỉnh ở Đồng bằng Sông Cửu Long.

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1 Phân lập vi khuẩn *Azospirillum*

Chúng tôi tiến hành thu hoạch các cây lúa hoang trong tự nhiên, lúa trồng và một số loại cỏ mọc lẫn trong lúa trồng. Rửa thật sạch thân và hệ thống rễ. Lột bỏ lớp bao bên ngoài thân lúa và cắt thành những miếng nhỏ từ 2-3 cm, chậm khô nước. Phần rễ rửa thật sạch và rửa lại bằng nước cất 2 lần, chậm cho thật khô rễ.

Khử trùng: 10 g mẫu (thân hoặc rễ) lắ 30 phút trong nước cất 2 lần (250 ml nước + 25 g bi thuỷ tinh), chuyển sang beaker vô trùng, rửa 2 lần bằng nước vô trùng rồi khử trùng bằng HgCl<sub>2</sub> 0,2% hay bằng dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% và cồn 75%. Rửa 6 lần bằng nước vô trùng, cắt mẫu thành những miếng thật nhỏ và nghiền trong 90 ml nước cất vô trùng. Thực hiện một loạt pha loãng và cấy trên đĩa hay ống môi

trường chứa agar bán đặc như mô tả bởi Malarvithi (1995) và Barraquio *et al* (1997) (môi trường chứa malate hay chất trích từ lúa).

### 2.2.2 Nhận diện các dòng vi khuẩn *Azospirillum* bằng kỹ thuật PCR

(a) Sau khi có các dòng vi khuẩn *Azospirillum* ròng chúng tôi tiến hành nhận diện các dòng vi khuẩn này bằng kỹ thuật PCR với các môi chuyên biệt quy định gen nifH của vi khuẩn *Azospirillum* có trình tự như sau: *A. lipoferum*,  
Môi xuôi: 5'- GTA AAT CCA CCA CCT CCC -3', Môi ngược: 5'- TGT AGA TTT CCT GGG CCT -3'.

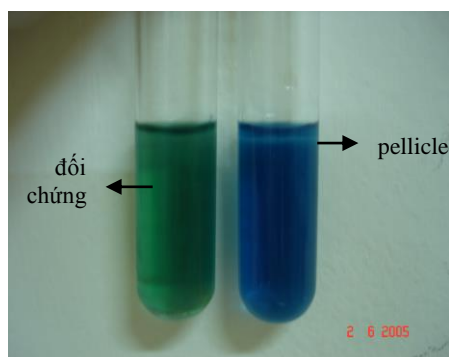
(b) Qui trình chạy PCR:

- Biến tính ADN ở 95<sup>0</sup>C trong 1 phút.
- Tiếp theo là 35 chu kỳ được gia nhiệt như sau: 95<sup>0</sup>C/1 phút, 54<sup>0</sup>C/1 phút, 72<sup>0</sup>C/1 phút.
- Bước cuối cùng là 72<sup>0</sup>C trong 10 phút.
- Sản phẩm PCR sau đó được chạy điện di 30 phút ở 50V và chụp hình gel bằng máy chụp hình gel Bio-Rad.

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả cho thấy có thể sử dụng dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% và cồn 75% trong việc khử trùng mẫu thay vì sử dụng HgCl<sub>2</sub> nhằm giảm ô nhiễm môi trường và ít gây tác hại cho người sử dụng.

Trong môi trường NFb bán đặc không có đạm, các dòng vi khuẩn phát triển ở môi trường vi hiếu khí tập trung thành một màng mỏng trắng cách mặt môi trường nuôi 0,5-1,5cm (pellicle). Kết quả này phù hợp với kết quả của Bashan (1985), Rodrihuez-Caceres (1982), Thakuria (2004), Hiệp *et al* (2005) và Loan (2005). Khi vi khuẩn tăng trưởng chúng làm biến đổi màu của bromothymol blue nên môi trường chuyển từ màu xanh lá cây (trung tính) sang màu xanh dương đậm (Hình 1)



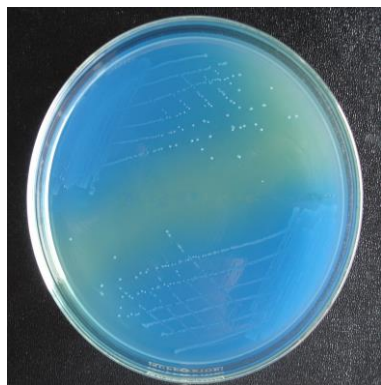
**Hình 1: *Azospirillum* sau khi cấy 3 ngày trên môi trường bán đặc NFb không đạm**

Chúng tôi đã phân lập được 20 dòng *Azospirillum* trên các giống lúa trồng, lúa hoang và cỏ dại (Bảng 1)

### Bảng 1: Xuất xứ các dòng vi khuẩn *Azospirillum* phân lập được

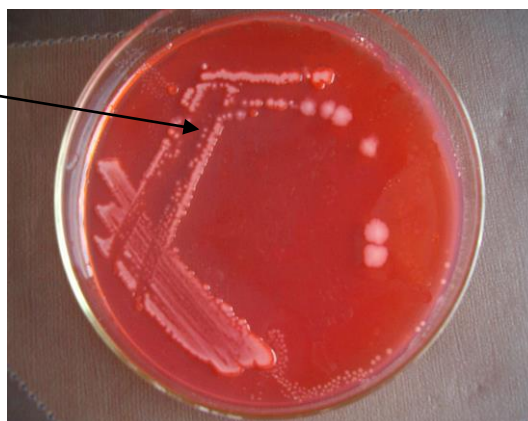
STT	Dòng	Cây chủ	Vị trí phân lập	Nguồn gốc cây chủ
1	A1	Lúa hoang	rễ	Nông trại khu II, ĐHCT
2	A6	Lúa mùa MTL7	rễ	Nông trại khu II, ĐHCT
3	A7.1	Lúa hoang	Thân	Nông trại khu II, ĐHCT
4	A7.2	Lúa hoang	Thân	Nông trại khu II, ĐHCT
5	A9	Lúa hoang	Thân	Nông trại khu II, ĐHCT
6	A10	Lúa hoang	Thân	Nông trại khu II, ĐHCT
7	A11.2	Cỏ màn trâu	Thân	Trà Vinh
8	A12	Cỏ màn trâu	Thân	Trà Vinh
9	A13.1	Cỏ màn trâu	Thân	Trà Vinh
10	A15	Cỏ màn trâu	Thân	Trà Vinh
11	A17	Cỏ mồm	Rễ	Cty giống Ô Môn, Cần Thơ
12	A18	Lúa một bụi đỏ	Thân	Bạc Liêu
13	A20.1	Lúa đuôi trâu lùn	Thân	Bạc Liêu
14	A21	Cỏ mồm	Thân	Cty giống Ô Môn, Cần Thơ
15	A22	Lúa đuôi trâu lùn	Thân	Bạc Liêu
16	A16	Lúa hoang	Thân	Nông trại khu II, ĐHCT
17	A28	Lúa MTL 405	Rễ	Viện NCPT ĐBSCL
18	A31.1	Lúa MTL309	Rễ	Viện NCPT ĐBSCL
19	A31.2	Lúa MTL309	Thân	Viện NCPT ĐBSCL
20	A33	Lúa hoang	Thân	Quận Cái Răng, TP Cần Thơ

Dùng micropipet hút lấy vi khuẩn ở lớp màng (pellicle) phân lập trên môi trường đặc NFb. Chúng tôi nhận thấy các dòng vi khuẩn có khuẩn lạc tròn, bìa nguyên, độ nổi lồi và một số đặc điểm khác được mô tả trong Bảng 2 và Hình 2. Kiểm tra lại trên môi trường Congo red, các khuẩn lạc tròn có màu hồng nhạt và những khuẩn lạc không màu xuất hiện sau khi cấy 2 ngày. Sau khi cấy 3 ngày, những khuẩn lạc hồng nhạt trở nên hồng đậm hay đỏ, đây chính là các khuẩn lạc *Azospirillum* (Hình 3). Rodriguez-Caceres (1982) cũng có các phát hiện tương tự khi ông nghiên cứu các dòng vi khuẩn *Azospirillum* trên môi trường Congo red.



Hình 2: Khuẩn lạc *Azospirillum* trên môi trường đặc NFb

Khuẩn lạc *Azospirillum* (màu đỏ)



Hình 3: Khuẩn lạc *Azospirillum* trên môi trường đặc Congo red

**Bảng 2: Đặc điểm của một số khuẩn lạc vi khuẩn *Azospirillum***

STT	Dòng	Đường kính khuẩn lạc (cm)	Đặc điểm khuẩn lạc	Màu sắc khuẩn lạc trên môi trường NFb	Màu sắc khuẩn lạc trên môi trường Congo red
1	A1	0,2000	tròn, nhầy, bìa nguyên, độ nổi lồi	trắng đục	đỏ
2	A6	0,2167	tròn, ít nhầy, bìa nguyên, độ nổi lồi	vàng	đỏ
3	A7.1	0,2500	tròn, nhầy, bìa nguyên, độ nổi lồi	trắng trong	hồng nhạt
4	A7.2	0,1667	tròn, nhầy, bìa nguyên, độ nổi lồi	trắng đục	hồng đậm
5	A9	0,1933	tròn, ít nhầy, bìa nguyên, độ nổi lồi	trắng trong	hồng đậm
6	A10	0,2000	tròn, nhầy, bìa nguyên, độ nổi lồi	trắng trong	đỏ
7	A11.2	0,2167	tròn, ít nhầy, bìa nguyên, độ nổi lồi	vàng	đỏ cam
8	A12	0,1000	tròn, nhầy, bìa nguyên, độ nổi lồi	vàng	đỏ cam
9	A13.1	0,0833	tròn, nhầy, bìa nguyên, độ nổi lồi	trắng đục	đỏ
10	A15	0,2500	tròn, ít nhầy, bìa nguyên, độ nổi lồi	vàng	hồng đậm

Quan sát mẫu vi khuẩn dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 1000 lần chúng tôi nhận thấy chúng có khả năng chuyển động và thuộc gram âm. Kết quả này phù hợp với phát hiện của Bashan (2004), Krieg (1984) và Okon (1994) khi họ nghiên cứu các dòng *Azospirillum*. Các dòng vi khuẩn này có dạng hình que ngắn, kích thước biến thiên trong khoảng 0,8-1,7µm (chiều rộng) và 1,4-3,7µm (chiều dài) (Hình 4).

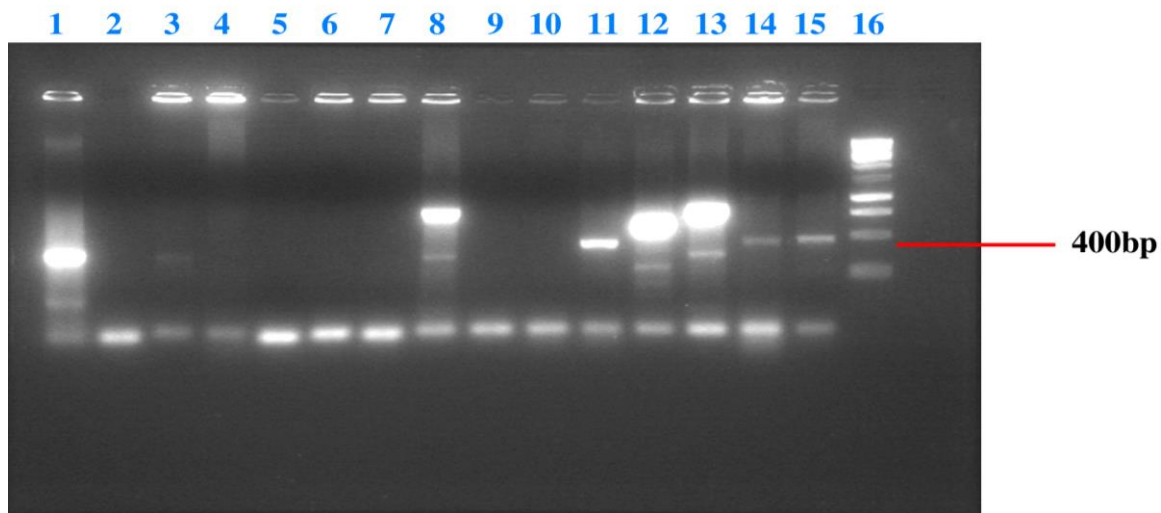


**Hình 4: Hình dạng một số dòng *Azospirillum* chụp dưới kính hiển vi độ phóng đại 1000 lần**

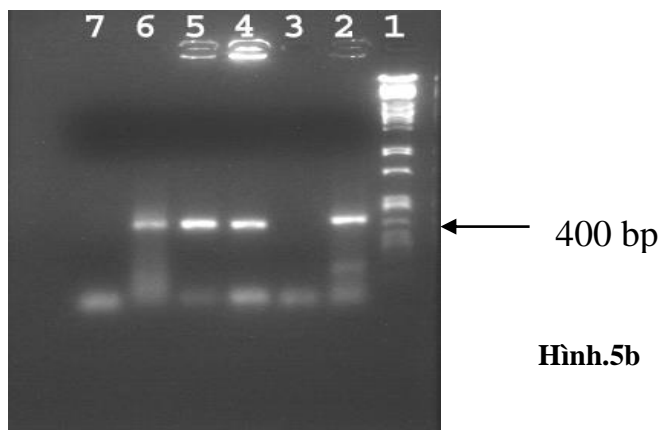
Đặc tính của các dòng vi khuẩn phân lập được trong nghiên cứu này giống như mô tả các dòng *Azospirillum* mà Okon (1994), Bashan (2004) và Krieg (1984) đã tìm thấy. Do đó những dòng vi khuẩn trên được chúng tôi tiếp tục kiểm tra bằng kỹ thuật PCR.

Dùng cặp mồi chuyên biệt thiết kế dựa trên trình tự của gene NifH, mồi xuôi: 5'-GTA AAT CCA CCA CCT CCC -3' và mồi ngược: 5'- TGT AGA TTT CCT GGG CCT -3' để khuếch đại đoạn ADN của các dòng vi khuẩn phân lập được và

đem sản phẩm PCR chạy điện di trên gel agarose, chúng tôi phát hiện được 8 dòng vi khuẩn có các băng ADN ở vị trí 400bp giống như dòng *Azospirillum lipoferum* đối chứng (Hình 5a và 5b) phù hợp với vị trí gene cố định đạm NifH được nhân lên bởi môi *Azospirillum lipoferum*. Như vậy, các dòng vi khuẩn này thuộc loài *Azospirillum lipoferum*. Kết quả của chúng tôi phù hợp với các kết quả của Blaha *et al* (2005) và Lovell *et al* (2000) đã tìm ra khi nghiên cứu các loài *Azospirillum lipoferum*. Các dòng còn lại không cho băng ADN tương ứng với cặp môi chuyên biệt trên nên chúng không phải là *Azospirillum lipoferum*. Do kinh phí và thời gian hạn chế chúng tôi chưa xác định được các dòng vi khuẩn còn lại này thuộc loài *Azospirillum* nào tuy rằng chúng có những đặc điểm giống như các dòng vi khuẩn mà chúng tôi đã nhận diện bằng kỹ thuật PCR.



Hình.5a



Hình.5b

**Hình 5a, 5b: Phẫu diện điện di ADN của các dòng vi khuẩn phân lập được**

Hình 5a: 1: dòng vi khuẩn đối chứng dương *Azospirillum lipoferum*, 2: đối chứng âm, 3-15 là các dòng A1, A6, A7.1, A7.2, A9, A10, A13, A15, A17, A18, A20, A21, A22 và 16: thang chuẩn 1kb,

Hình 5b: 1: thang chuẩn 1kb, 2: đối chứng dương *Azospirillum lipoferum*, 3: đối chứng âm, 4: dòng A16, 5: dòng A28, 6: dòng A31 và 7: dòng A33

## 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 4.1 Kết luận

- Có thể sử dụng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10%) và cồn (75%) trong khâu khử trùng vật liệu thí nghiệm thay cho HgCl<sub>2</sub> để giảm gây ô nhiễm môi trường và tác hại đến người thực hiện.
- Xác định được 8 dòng vi khuẩn phân lập thuộc loài *Azospirillum lipoferum*.

### 4.2 Đề nghị

Sử dụng kỹ thuật PCR với các đoạn mồi khác để xác định các dòng vi khuẩn còn lại trước khi ứng dụng vào thực tiễn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baldani, J.I, Caruso, L., Baldani, V.L.D., Goi, S.R. and Döbereiner, J. 1997 Recent advances in BNF with non-legume plants Soil. Biol. Biochem. **29**:911-922.
- Bashan, Y., Holguin, G. and de-Bashan, L. E. 2004 *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Can. J. Microbiol. **50**:521-577.
- Blaha, D., Sanguin, H., Robe, P., Nalin, R., Bally, R. and Moenne-Loccoz, Y. 2000 Physical organization of phytobeneficial genes nifH and ipdC in the plant growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum lipoferum* 4V(I). FEMS Microbiol. Lett. **244** (1): 157-163
- Chabot, R., Antoun, H. and Cescas, M. P. 1993 Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. Can. J. Microbiol. **39**:943-947
- Döbereiner, J. 1991 The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In: The Prokaryotes. Vol. 3. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Scheifer, K.H. (Eds.). 2<sup>nd</sup> edition. Springer-Verlag, New York.
- Döbereiner, J.; Baldani, V. L. D. and Reis, V. M. 1995 Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: *Azospirillum* VI and related microorganisms. Fendrik, I ; M. del Gallo, J. Vanderleyden and M de Zamaroc (eds.) pp. 3-14. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Illmer, P. and Schinner, F. 1992 Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. Soil. Biol. Biochem. **24**:389-395.
- Krieg, N.R. and Döbereiner, J. 1984 The genus *Azospirillum*. In: Bergey's Manual for Systematic Bacteriology. Krieg, N.R. and Holt, J.D. (Eds.). 1<sup>st</sup> edition. The Williams and Wilkins, Baltimore.
- Kundu, B. S. and Gaur, A. C. 1984 Rice response to inoculation with N<sub>2</sub>-fixing and P-solubilizing microorganisms. Plant and Soil **79**:227-234.
- Nguyễn Hữu Hiệp, Cao Ngọc Diệp and David F. Herridge 2002 Nitrogen Fixation of Soybean and Groundnut in the Mekong Delta, Vietnam. In: Inoculants and Nitrogen Fixation in Vietnam pp: 10-18 edited by D. F. Herridge, ACIAR Proceedings 109e at 17-18 Feb. 2001 Hanoi
- Nguyễn Hữu Hiệp and Cao Ngọc Diệp 2003 Effects of rhizobial inoculation techniques and phosphate solubilized microorganisms on soybean cultivated in acid paddy soil in Mekong Delta. Proceedings in workshop on Biological Nitrogen Fixation on soybean at Malaysia. Biotechnology for Sustainable Utilization of Biological Resources in the Tropics. Vol 16. Proceedings of Project Seminar in 2002 – 2003 for JSPS-NRCT/DOST/LIPI/VCC. Published by The International Center for Biotechnology, Osaka University, Osaka, Japan

- Nguyễn Hữu Hiệp, Trần Văn Chiêu, Đào Thanh Hoàng và Nguyễn Khắc Minh Loan 2005 *Azospirillum*: vi sinh vật cố định đạm với cây không thuộc họ đậu. Tạp chí Khoa học Cần Thơ. 2: 4-6.
- Nguyễn Khắc Minh Loan, 2005 Phân lập một số dòng vi khuẩn *Azospirillum* trên lúa. Luận văn tốt nghiệp Cử nhân ngành Công nghệ Sinh học. Đại học Cần Thơ.
- Lovell, C.R., Piceno, Y.M., Quattro, J.M., and Bagwell, C.E. 2000 Molecular analysis of diazotroph diversity in the rhizosphere of the smooth cordgrass, *Spartina alterniflora*. Appl. Environ. Microbiol. **66** (9): 3814-3822.
- Okon, Y. 1994 *Azospirillum*/Plant associations. CRC Press, Inc. USA
- Okon, Y. and Labandera-Gonzalez, C. A. 1994 Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil. Biol. Biochem. **26**:1591-1601.
- Omar, N., Heulin, Th.; Weinhard, P.; Alaa El-Din, M. N. and Balandreau, J. 1989 Field inoculation of rice with in vitro selected plant/growth promoting-rhizobacteria. Agronomie **9**:803-808.
- Sergeeva, E.; Liaimer, A. and Bergman, B. 2002 Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. Planta **215**:229-238
- Sumner, M. E. 1990 Crop responses to *Azospirillum* inoculation. Advances in Soil Science **12**:53-123.