

Tuyển chọn chủng vi khuẩn hoạt lực cao về khả năng cố định nitơ và tổng hợp indole-3-acetic acid (IAA) từ đất trồng ngô tại huyện Phú Lương, tỉnh Thái Nguyên

Hoàng Thị Lan Anh¹, Hoàng Thị Thủy², Trần Văn Chí^{1*}

¹Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên

²Chi cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật tỉnh Thái Nguyên

Selection of highly active bacterial strains for fixing nitrogen and synthesizing indole-3-acetic acid (IAA) from maize cultivation soil in Thai Nguyen province

Hoang Thi Lan Anh¹, Hoang Thi Thuy², Tran Van Chi^{1*}

¹Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry

²Department of Crop Production and Plant Protection of Thai Nguyen province

*Corresponding author: tranvanchi@tuaf.edu.vn

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.13.2.2024.014-021>

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu là tuyển chọn được chủng vi khuẩn có hoạt lực cao về khả năng cố định nitơ và tổng hợp Indole-3-acetic acid (IAA) từ đất trồng ngô tại một số địa phương ở tỉnh Thái Nguyên, nhằm hướng tới sử dụng vào phát triển sản phẩm phân hữu cơ vi sinh. Từ 30 mẫu đất trồng ngô thu thập tại Thái Nguyên đã phân lập được 6 chủng vi khuẩn đều thể hiện hai hoạt tính nói trên. Từ đó tuyển chọn được chủng MN7 có hoạt tính cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA tương ứng với 20,165 µg/ml NH₄⁺ khi nuôi cấy trên môi trường Ashby và 115,907 µg/ml IAA trên môi trường Ashby bổ sung 0,1% L-Tryptophan. So sánh trình tự gen 16S rRNA của chủng MN7 với các loài đã công bố trên ExTaxon cho thấy, chủng MN7 có mức độ tương đồng 99,93% với *Azotobacter chroococcum* subsp. *chroococcum* IAM 12666^T (AB175653). Sơ đồ phả hệ của chủng MN7 được sắp xếp thành một nhóm với chi *Azotobacter*. Trong nhóm của chi *Azotobacter*, chủng MN7 gần nhất với loài AB175653. Do vậy, chủng MN7 được đặt tên khoa học là *Azotobacter chroococcum* subsp. *chroococcum* MN7. Khảo sát đặc điểm nuôi cấy cho thấy chủng *Azotobacter chroococcum* subsp. *chroococcum* MN7 có khả năng sinh 11 loại enzyme, có khả năng đồng hóa các nguồn carbon, bao gồm D-glucose, L-arabinose, D-mannose,... và có khả năng sinh Indole và chuyển hóa nitrate thành nitrite.

ABSTRACT

The purpose of the study is to select bacterial strains with high nitrogen fixation and IAA biosynthesis from maize cultivation soil in some localities in Thai Nguyen province, in order to guide for use in developing microbial organic fertilizer products for application in crop production. From 30 maize cultivation soil samples collected in Thai Nguyen, 6 bacterial strains were isolated, all showing the above two activities. The strain MN7 was selected for its strongest nitrogen fixation and IAA biosynthesis activity, corresponding to 20.165 µg/ml NH₄⁺ when grown on Ashby medium and 115.907 µg/ml IAA on Ashby medium supplemented with 0.1% L-Tryptophan. Comparing the 16S rRNA gene sequence of MN7 with species published on ExTaxon shows that, strain MN7 has 99.93% similarity with *Azotobacter chroococcum* subsp. *chroococcum* IAM 12666^T (AB175653). The phylogenetic tree of MN7 is arranged in a group with the genus *Azotobacter* and strain MN7 is closest to the species AB175653. Therefore, strain MN7 was scientifically named *Azotobacter chroococcum* subsp. *chroococcum* MN7. Results of culture characterization showed that strain *Azotobacter chroococcum* subsp. *chroococcum* MN7 was capable of producing 11 enzymes and capable of assimilation of various carbon sources including D-glucose, L-arabinose, D-mannose, and so on; and capable of producing Indole and converting nitrate to nitrite.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 08/01/2024

Ngày phản biện: 11/03/2024

Ngày quyết định đăng: 04/04/2024

Từ khóa:

Azotobacter, cố định nitơ, đất trồng ngô, Thái Nguyên, tổng hợp IAA, vi khuẩn.

Keywords:

Azotobacter, bacteria, IAA biosynthesis, maize cultivation soil, nitrogen fixation, Thai Nguyen.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, sản xuất nông nghiệp đang theo hướng chuyên canh tạo quy mô hàng hóa lớn nhưng lại phụ thuộc rất nhiều vào việc sử dụng phân bón hóa học. Trong đó, phần lớn lượng đạm sử dụng trong trồng trọt được tạo ra từ con đường tổng hợp hóa học. Việc sử dụng loại phân bón này quá mức có thể gây ra những tác động môi trường khó lường như làm ô nhiễm nước ngầm, mất độ phì nhiêu của đất, giảm đa dạng sinh học [1] và tiềm ẩn nhiều rủi ro cho con người [2]. Vì vậy, khai thác được nguồn nitơ dồi dào trong khí quyển dựa vào vi sinh vật phục vụ cho sản xuất nông nghiệp an toàn đang được đặt ra.

Sử dụng 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 20 trong nông nghiệp [3]. Ứng dụng nhóm vi sinh vật cố định nitơ sẽ góp phần làm hạn chế sử dụng các loại phân bón hóa học [4], bởi hai nhóm: (1) vi khuẩn cố định nitơ tự do và (2) vi khuẩn cố định nitơ cộng sinh sống tự do trong đất có thể cố định nitơ lên đến 60 kg N/ha/năm [5]. Trong số vi sinh vật có khả năng cố định nitơ sống tự do trong đất thì vi khuẩn *Azotobacter* có nhiều ứng dụng nhất trong sản xuất phân bón cố định nitơ. Do *Azotobacter* vừa có khả năng cố định nitơ vừa có thể sản sinh chất kích thích IAA, tăng cường khả năng hấp thu lân và các hợp chất hữu cơ từ đất [6].

Để sản xuất phân bón có chứa chủng vi sinh cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA tốt, phải có chủng vi sinh vật có hoạt tính cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA cao, sức cạnh tranh lớn, thích ứng ở pH rộng, thích hợp với loại cây trồng ở nhiều vùng sinh thái khác nhau. Vì vậy, công tác phân lập, tuyển chọn chủng vi sinh vật có hoạt tính cố định nitơ, sinh tổng hợp IAA và đánh giá đặc tính sinh học là việc làm không thể thiếu

được trong quy trình sản xuất.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hóa chất, môi trường

L-Tryptophan, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, FeCl_2 , H_2SO_4 , HCl , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, dung dịch thử Nessler, Mannitol, Glucose, p-dimethylaminobenzaldehyde của hãng Sigma - Mỹ.

Agar, NaCl , CaCO_3 , Methyl đỏ của hãng Biobasic – Canada.

NaOH của hãng Merck - Đức.

Kit API của BioMérieux - Pháp

2.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm và phân tích các chỉ tiêu chất lượng

2.2.1. Phương pháp thu mẫu

Thu mẫu đất ở một số xã trồng ngô tại huyện Phú Lương tỉnh Thái Nguyên theo TCVN 7538-6:2010 [7]. Mẫu đất được thu tại các ruộng trồng ngô 01 vụ trong năm, lấy vào thời điểm cây ngô bắt đầu ra hoa. Mẫu được lấy ở độ sâu 6 - 15cm, sau khi đã loại bỏ khoảng 5 cm phần đất và tàn dư thực vật. Tổng số 30 mẫu, được thu thập tại một số xã, bao gồm: Ôn Lương (8 mẫu), Tứ Tranh (5 mẫu), Vô Tranh (12 mẫu), Phấn Mễ (5 mẫu).

2.2.2. Phương pháp phân 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 [8].

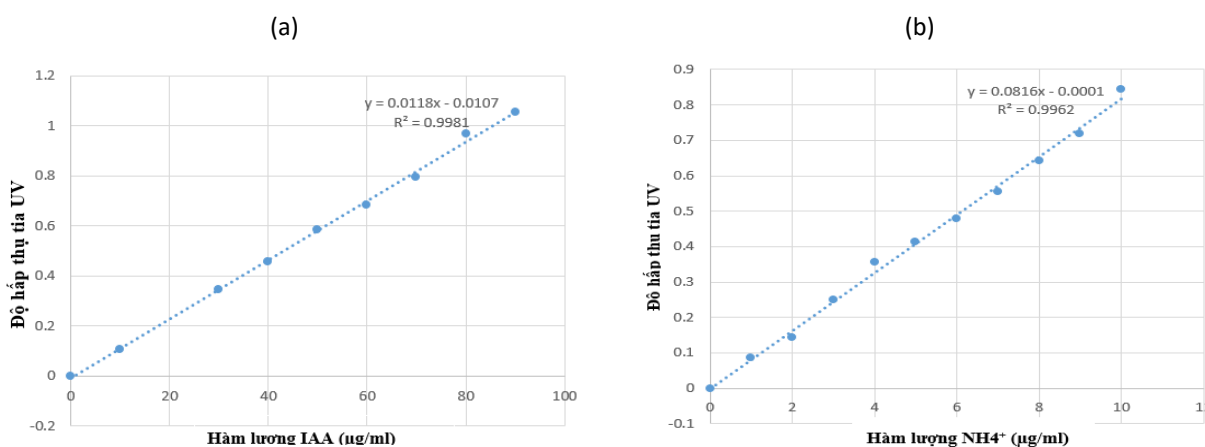
2.2.3. Phân tích chỉ tiêu chất lượng

Định tính khả năng sinh tổng hợp IAA của vi khuẩn theo TCVN 10784:2015 [9]. Theo đó, khi cho thuốc thử Salkowski vào dịch nuôi cấy vi khuẩn, nếu có IAA dịch nuôi sẽ chuyển sang màu đỏ.

Xác định khả năng sinh IAA: Vi khuẩn được nuôi trong môi trường lỏng Ashby có bổ sung 0,1% Tryptophan, nuôi lắc 180 vòng/phút ở 30°C trong 6 ngày. Hàm lượng IAA thô 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 530 nm. Dựa vào đồ thị

chuẩn IAA (Hình 1a) sẽ xác định được hàm lượng IAA [10].



Hình 1. Đồ thị chuẩn
(a) chuẩn IAA; (b) chuẩn NH_4^+

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 [11], sử dụng đường chuẩn ammonium (Hình 1b) để xác định kết quả.

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: Chủng tuyển chọn được hoạt hóa trong môi trường dịch thể Ashby ở 30°C với tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 72 giờ. Thu nhận sinh khối tế bào của chủng tuyển chọn và tách chiết DNA tổng số theo phương pháp của Sambrook & Russell (2001) [12]. Sử dụng cặp mồi 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' và 1492R 5'-TACGGYTACCTGTTACGACTT-3' [13] để nhân trình tự gen 16S rRNA của chủng tuyển chọn. Trình tự gen 16S rRNA của chủng tuyển chọn 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). Trình tự gen 16S rRNA của chủng tuyển chọn được so sánh với dữ liệu công bố trên EzTaxon [14]. Sơ đồ phả hệ của chủng tuyển chọn được xây dựng dựa vào trình tự gen 16S rRNA của chủng và các loài gần nhất thông qua phần mềm MEGA 7 [15].

2.4 Xử lý số liệu

Tất cả các số liệu thu thập là đại diện của 3 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 ngô tại một số xã ở huyện Phú Lương tỉnh Thái Nguyên

Từ 30 mẫu đất trồng ngô thu tại một số xã ở huyện Phú Lương tỉnh Thái Nguyên, tiến hành xử lý mẫu và các bước phân lập trên môi trường Ashby chọn lọc, kết quả phân lập được 6 chủng vi khuẩn. Các chủng vi khuẩn phân lập được 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 6 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.

Bảng 1. Đặc điểm của các chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ và tổng hợp IAA được phân lập từ mẫu đất trồng ngô tại một số xã ở huyện Phú Lương tỉnh Thái Nguyên

STT	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
1	MN2	Ôn Lương	Trong, lồi tròn, bề mặt bóng, không rìa, nhót	Dấu phẩy	-	+	+	+
2	MN3	Ôn Lương	Trắng sữa, lồi tròn, không rìa, trơn	Que ngắn	-	+	+	+
3	MN4	Tức Tranh	Trong, lồi, bề mặt bóng, không rìa	Que ngắn	-	+	+	+
4	MN5	Vô Tranh	Trắng ngà, tròn dẹt, bề mặt ráp, rìa gọn	Que ngắn	-	+	+	+
5	MN6	Vô Tranh	Trong, lồi tròn, có nhân, không rìa	Cầu	-	+	+	+
6	MN7	Phấn Mễ	Trắng đục, lồi tròn, bề mặt thô ráp, không rìa	Ô van	-	+	+	+

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

Kết quả Bảng 1 cho thấy, khuẩn lạc có dạng hình tròn, màu trắng sữa, trong, trắng ngà và đục, bề mặt trơn bóng hoặc thô ráp, không rìa. Tế bào có dạng phẩy, que ngắn, cầu và hình ô van, chúng đều có khả năng di động và thể hiện tính chất Gram âm. Như vậy, 6 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. 6 chủng này sẽ được tiếp tục nghiên cứu để lựa chọn ra 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

Theo mục tiêu của nghiên cứu này, việc tuyển chọn chủng vi sinh vật căn cứ vào 2 tiêu chí: (1) hàm lượng NH_4^+ tạo ra trong môi trường vô đạm - Ashby và (2) hàm lượng IAA được tạo ra trong môi trường Ashby có bổ sung 0,1% L-Tryptophan. Kết quả đánh giá 2 tiêu chí trên của 6 chủng vi sinh vật phân lập được khi nuôi cấy chúng trong môi trường tương ứng sau 6 ngày thể hiện qua Bảng 2.

Bảng 2. Khả năng cố định nitơ và tổng hợp IAA của các chủng đã phân lập được

STT	Ký hiệu chủng	Khả năng tổng hợp IAA ($\mu\text{g/ml}$)	Khả năng cố định nitơ ($\mu\text{g/ml}$)
1	MN2	8,279 ^e	2,335 ^f
2	MN3	92,319 ^b	18,277 ^b
3	MN4	44,833 ^c	11,186 ^c
4	MN5	30,200 ^d	7,366 ^e
5	MN6	42,912 ^c	9,815 ^d
6	MN7	115,907 ^a	20,165 ^a

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

Kết quả Bảng 2 đã khẳng định nhận định ở trên (6 chủng đều có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA) là đúng. Tuy nhiên khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA của 6 chủng là khác nhau. Chủng MN2 có hoạt lực yếu nhất, với khả năng cố định nitơ 2,335 µg/ml, khả năng tổng hợp IAA 8,279 µg/ml. Trong khi đó, hoạt lực mạnh nhất là chủng MN7 với khả năng cố định nitơ 20,165 µg/ml, khả năng tổng hợp IAA 115,907 µg/ml.

Khả năng tổng hợp IAA và cố định nitơ của chủng MN7 cao hơn so với kết quả công bố của Nguyễn Anh Huy & Nguyễn Hữu Hiệp (2018) [16] 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-tôm ở Bạc Liêu với khả năng cố định nitơ đạt 1,78 µg/ml và tổng hợp IAA đạt 35,8 µg/ml sau 6 ngày nuôi. Khả năng cố định nitơ của chủng MN7 tương đương khả năng cố định nitơ của chủng MN26 (20,822 µg/ml) và chủng MN72 (20,132 µg/ml) được công bố bởi Trần Văn Chí et al., (2022, 2023) [17, 18] khi tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA trong đất trồng cà chua và đất trồng chè ở một

số xã, phường tại tỉnh Thái Nguyên. Tuy nhiên khả năng tổng hợp IAA của chủng MN7 cao hơn nhiều so với chủng MN26 (77,234 µg/ml) và MN72 (56,619 µg/ml).

Như vậy, chủng MN7 là chủng có khả năng cố định cao nhất trong 6 chủng đã được phân lập và cao hơn so với một số công bố trước đó. Do vậy, chủng MN7 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

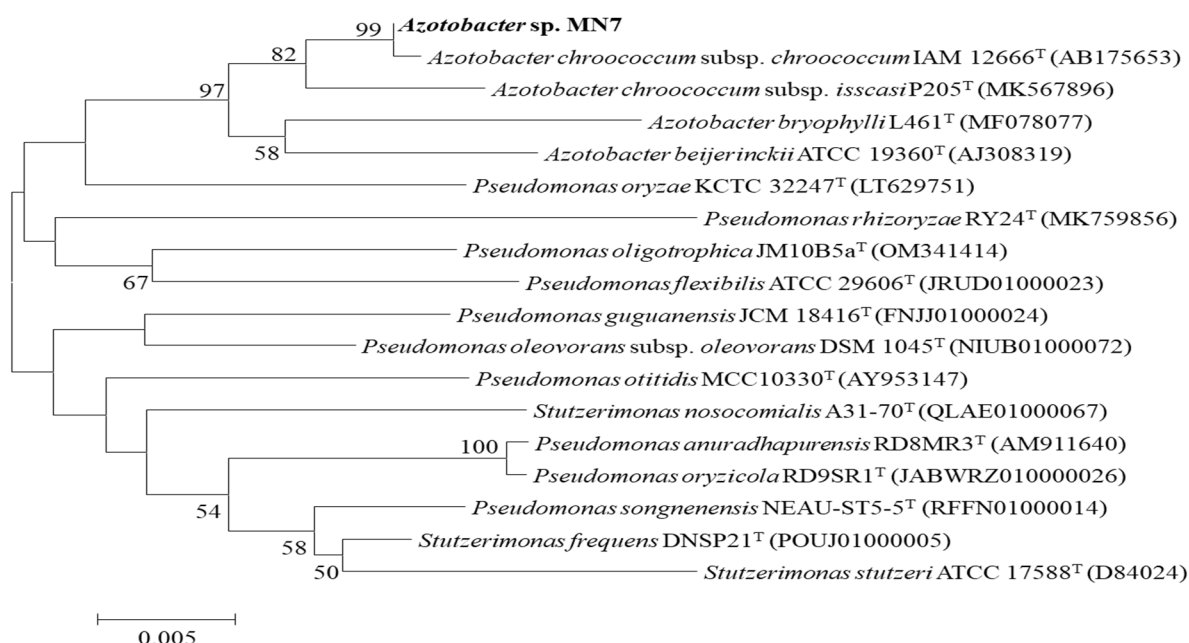
Kết quả so sánh trình tự gen 16S rRNA (kích thước 1522 bp) của chủng MN7 với các loài đã công bố trên ExTaxon cho thấy, chủng MN7 có mức độ tương đồng 99,93% với *Azotobacter chroococcum* subsp. *chroococcum* IAM 12666^T (AB175653), 99,08% với *Azotobacter chroococcum* subsp. *isscasi* P205^T (MK567896), 98,60% với *Azotobacter beijerinckii* ATCC 19360^T (AJ308319) và 96,84-97,66% với các loài khác thuộc chi *Pseudomonas* và *Stutzerimonas* (Bảng 3).

Bảng 3. So sánh sự tương đồng về trình tự gen 16S rRNA của chủng MN7 với các loài gần nhất công bố trên dữ liệu EzTaxon

Loài gần nhất	Sự tương đồng (%)	Số nucleotit sai khác
<i>Azotobacter chroococcum</i> subsp. <i>chroococcum</i> IAM 12666 ^T (AB175653)	99,93	1/1422
<i>Azotobacter chroococcum</i> subsp. <i>isscasi</i> P205 ^T (MK567896)	99,08	13/1410
<i>Azotobacter beijerinckii</i> ATCC 19360 ^T (AJ308319)	98,60	19/1361
<i>Pseudomonas oryzae</i> MAHUQ-58 ^T (MT514506)	97,66	34/1456
<i>Pseudomonas oryzae</i> KCTC 32247 ^T (LT629751)	97,46	37/1458
<i>Azotobacter bryophylli</i> L461 ^T (MF078077)	97,41	36/1392
<i>Pseudomonas oligotrophica</i> JM10B5a ^T (OM341414)	97,26	40/1458
<i>Pseudomonas flexibilis</i> ATCC 29606 ^T (JRUD01000023)	97,12	42/1458
<i>Stutzerimonas frequens</i> DNSP21 ^T (POUJ01000005)	97,12	42/1458
<i>Pseudomonas oleovorans</i> subsp. <i>oleovorans</i> DSM 1045 ^T (NIUB01000072)	97,05	43/1458
<i>Stutzerimonas stutzeri</i> ATCC 17588 ^T (CP002881)	97,05	43/1458
<i>Stutzerimonas nosocomialis</i> A31-70 ^T (QLAE01000067)	97,05	43/1458
<i>Pseudomonas otitidis</i> MCC10330 ^T (AY953147)	96,98	44/1458
<i>Pseudomonas guguanensis</i> JCM 18416 ^T (FNJJ01000024)	96,98	44/1458
<i>Pseudomonas oryzae</i> RD9SR1 ^T (JABWRZ010000026)	96,98	44/1458
<i>Pseudomonas anuradhapurensis</i> RD8MR3 ^T (AM911640)	96,85	43/1363
<i>Pseudomonas songnenensis</i> NEAU-ST5-5 ^T (RFFN01000014)	96,84	46/1458

Đối chiếu với ngưỡng chặn ($\geq 98,7\%$) về sự tương đồng của trình tự 16S rRNA, chủng MN7 là một thành viên của chi *Azotobacter* [19]. Bên cạnh đó, sơ đồ phả hệ thiết lập (Hình 2) cũng cho thấy chủng MN7 được sắp xếp thành một nhóm với chi *Azotobacter*, tách biệt với các loài khác của chi *Pseudomonas* và *Stutzerimonas*. Trong nhóm của chi *Azotobacter*, chủng MN7 gần nhất với loài *Azotobacter chroococcum*

subsp. *chroococcum* IAM 12666^T (=ATCC 9043^T =DSM 2286^T), đây là loài chuẩn của chi *Azotobacter* được mô tả năm 1901 (<https://lpsn.dsmz.de/genus/azotobacter>). Dựa vào các dữ liệu trên, chủng MN7 là thành viên của chi *Azotobacter*, với tên gọi khoa học là *Azotobacter chroococcum* subsp. *chroococcum* MN7.



Hình 2. Sơ đồ phả hệ của chủng MN7 với các loài gần nhất thuộc họ *Pseudomonadaceae*. Các giá trị ở các vị trí phân nhánh với tần số xuất hiện (bootstrap) 1000 phép so sánh (chỉ giữ lại giá trị $\geq 50\%$)

3.3.2 Đánh giá một số đặc điểm nuôi cấy của chủng *Azotobacter chroococcum* subsp. *chroococcum* MN7

Thông tin về đặc điểm nuôi cấy của chủng vi sinh vật sẽ góp phần hỗ trợ cho các nghiên cứu 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 *Azotobacter chroococcum* subsp. *chroococcum* MN7, kết quả được thể hiện qua Bảng 4.

Kết quả Bảng 4 cho thấy chủng *Azotobacter chroococcum* subsp. *chroococcum* MN7 có khả

năng sinh 11 loại enzyme (Phosphatase alkaline, Esterase (C4), Lipase (C14), Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Trypsine, Phosphatase acide, Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase, β -galactosidase, β -glucuronidase và D-glucosidase), có khả năng đồng hóa các nguồn carbon, bao gồm D-glucose, L-arabinose, D-mannose, D-mannitol, D-maltose, Potassium gluconate, Adipic acid, Malic acid, Sodium acetate, Trisodium citrate, Phenylacetic acid, L-rhamnose, D-ribose, Inositol, D-saccharose; có khả năng sinh Indole và chuyển hóa nitrate thành nitrite.

Bảng 4. Một số đặc điểm nuôi cấy của *Azotobacter chroococcum* subsp. *chroococcum* MN7

STT	Đặc điểm hóa sinh khảo sát	Thể hiện của chủng MN7	STT	Đặc điểm hóa sinh khảo sát	Thể hiện của chủng MN7
1	Sinh Phosphatase alkaline	+	20	Đồng hóa D-glucose	+
2	Sinh Esterase (C4)	+	21	Đồng hóa L-arabinose	+
3	Sinh Esterase Lipase (C8)	-	22	Đồng hóa D- mannose	+
4	Sinh Lipase (C14)	+	23	Đồng hóa D-mannitol	+
5	Sinh Leucine arylamidase	+	24	Đồng hóa N-acetyl-glucosamine	-
6	Sinh Valine arylamidase	+	25	Đồng hóa D-maltose	+
7	Sinh Cystine arylamidase	-	26	Đồng hóa Potassium gluconate	+
8	Sinh Trypsine	+	27	Đồng hóa Capric acid	-
9	Sinh D-chymotrypsine	-	28	Đồng hóa Adipic acid	+
10	Sinh Phosphatase acide	+	29	Đồng hóa Malic acid	+
11	Sinh Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	30	Đồng hóa Sodium acetate	+
12	Sinh D-galactosidase	-	31	Đồng hóa Trisodium citrate	+
13	Sinh β -galactosidase	+	32	Đồng hóa Phenylacetic acid	+
14	Sinh β -glucuronidase	+	33	Đồng hóa L-rhamnose	+
15	Sinh D-glucosidase	+	34	Đồng hóa D-ribose	+
16	Sinh β -glucosidase	-	35	Đồng hóa Inositol	+
17	Sinh N-acetyl- β -glucosaminidase	-	36	Đồng hóa D-saccharose	+
18	Sinh D-mannosidase	-	37	Chuyển hóa nitrate thành nitrite	+
19	Sinh D-fucosidase	-	38	Sinh Indole	+

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

Khả năng sinh enzyme của Chủng *Azotobacter chroococcum* subsp. *chroococcum* MN7 khá tương đồng với kết quả nghiên cứu về *Azotobacter* sp. của Yana Evstatieva (2019) [20] cũng như các kết quả nghiên cứu đã được công bố bởi Nguyễn Thị Thu Hằng và Nguyễn Thị Thủy (2015) [11] về đặc điểm các chủng *Azotobacter* AZT1-AZT7, hay công bố của Trần Thị Xuân Phương và cộng sự (2017) [21] về đặc điểm các chủng *Azotobacter* HC21, HC24, TT13. Và so với đặc điểm nuôi cấy của 16 chủng *Azotobacter chroococcum* được công bố bởi Sandeep và cộng sự (2015) [22] thì chủng *Azotobacter chroococcum* subsp. *chroococcum* MN7 có khác biệt là có khả năng đồng hóa Rhamnose.

4. KẾT LUẬN

Đã phân lập được 6 chủng vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA từ 30 mẫu đất trồng ngô thu tại một số xã ở huyện Phú Lương tỉnh Thái Nguyên. Từ đó đã tuyển chọn được 1 chủng có khả năng cố định nitơ và

tổng hợp IAA mạnh nhất, với khả năng cố định nitơ 20,165 $\mu\text{g/ml}$ và khả năng tổng hợp IAA 115,907 $\mu\text{g/ml}$. Chủng vi khuẩn tuyển chọn đã được định danh đến loài, cụ thể đã đưa ra danh pháp khoa học của chủng tuyển chọn là *Azotobacter chroococcum* subsp. *chroococcum* MN7. Chủng *Azotobacter chroococcum* subsp. *chroococcum* MN7 có khả năng sinh 11 loại enzyme (Phosphatase alkaline, Esterase (C4), Lipase (C14), Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Trypsine, Phosphatase acide, Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase, β -galactosidase, β -glucuronidase và D-glucosidase), có khả năng đồng hóa các nguồn carbon, bao gồm bao gồm D-glucose, L-arabinose, D- mannose, D-mannitol, D-maltose, Potassium gluconate, Adipic acid, Malic acid, Sodium acetate, Trisodium citrate, Phenylacetic acid, L-rhamnose, D-ribose, Inositol, D-saccharose. Chủng MN7 có khả năng sinh Indole và 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, mã số NVQG-2021/ĐT.04. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn Chương trình.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Alok Kumar Yadav, Saurabh Saraswat, Preeti Sirohi, Manjoo Rani, Sameer Srivastava, Manish Pratap Singh & Nand K. Singh (2017). Antimicrobial Action of Methanolic Seed Extracts of *Syzygium cumini* Linn. on *Bacillus subtilis*. *AMB Express*, 7, 196. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0500-4>

[2]. Ladha J.K., Himanshu P., Timothy J.K, J. Six & Chris V.K. (2005). Efficiency of fertilizer Nitrogen in cereal production: Retrospects and prospects. *Advances in Agronomy*. 87: 85-156.

[3]. Wagner S.C. (2011). Biological Nitrogen Fixation. *Nature Education Knowledge*. 3(10): 15.

[4]. 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.

[5]. Kahindi J.H.P., Woormer 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.

[6]. Ridvan Kizilkaya (2009). Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter* spp. Strains isolated from soils different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils. *J. Environ. Boil.* 30(1): 78-82.

[7]. TCVN 7538-6:2010, 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 của vi sinh vật trong phòng thí nghiệm.

[8]. 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.

[9]. TCVN10784:2015: Vi sinh vật – Xác định khả năng sinh tổng hợp axit 3-Indol-acetic (IAA).

[10]. 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.

[11]. 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.

[12]. Sambrook J., & Russell D.W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1-170.

[13]. 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. 115-175.

[14]. Chun J., Lee JH., 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(Pt 10): 2259-2261.

[15]. 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.

[16]. 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, Đại học Cần Thơ*. 54(1B): 7 – 12.

[17]. Trần Văn Chí, Nguyễn Mạnh Tuấn, Ngô Xuân Bình, Nguyễn Duy Dũng, Lê Văn Hiền, Nguyễn Đức Tuấn, Nguyễn Xuân Vũ & Phạm Thị Tuyết Mai (2022). Tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng cố định ni tơ và tổng hợp Indole-3-acetic acid (IAA) từ đất trồng cà chua ở một số xã, phường tại tỉnh Thái Nguyên. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 20(12): 1599-1607.

[18]. Trần Văn Chí, Lê Văn Hiền, Nguyễn Mạnh Tuấn, Nguyễn Thị Giang & Hoàng Thị Lan Anh (2023). Tuyển chọn chủng vi khuẩn có hoạt lực cao về khả năng cố định nitơ và tổng hợp indole-3-acetic acid (IAA) từ đất trồng chè tại xã Tức Tranh, tỉnh Thái Nguyên. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm Nghiệp*. 12(6): 3-11. DOI: <https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.12.6.2023.003-011>

[19]. H. P. Browne, S. C. Forster & B. O. (2016). Anonye “Culturing of “unculturable” human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation”. *Nature*. 533: 543-546.

[20]. Yana Evstatieva (2019). Characterization and morphological study of *Azotobacter* sp. Strain. *Annual of Sofia University “St. Kliment Ohridski” Faculty of Biology. Book 4 - Scientific Sessions of the Faculty of Biology*. 104: 383-393.

[21]. 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.

[22]. Sandeep Upadhyay, Narendra Kumar, V. K. Singh & Anshuman Singh (2015). Isolation, characterization and morphological study of *Azotobacter* isolates. *Journal of Applied and Natural Science* 7(2): 984– 990.