

PHÂN LẬP VÀ NHẬN DIỆN VI KHUẨN CÓ ĐỊNH ĐẠM TRONG ĐẤT VÙNG RỄ LÚA TRỒNG TRÊN ĐẤT PHỦ SA TỈNH VĨNH LONG

Ngô Thanh Phong¹, Nguyễn Thị Phương Thảo², Cao Ngọc Diệp³

¹Dại học Cần Thơ

²Trường Trung học phổ thông Phan Ngọc Hiển, tỉnh Cà Mau

³Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Đại học Cần Thơ

TÓM TẮT

Bảy mươi chủng vi khuẩn được phân lập từ 27 mẫu đất trồng lúa của 3 huyện (Tam Bình, Trà Ôn và Vũng Liêm) của tỉnh Vĩnh Long trong đó có 59 chủng có khả năng cố định đạm (phát triển tốt trên môi trường Burk không nitrogen và tổng hợp NH₄⁺). Mười chủng có khả năng khử acetylenase (ARA). Có 21 chủng trong 25 chủng vi khuẩn có bằng tương ứng 475 bp trong phage PCR với cặp mồi đặc hiệu của gen *nif* PolF và PolR; chọn ngẫu nhiên 10 chủng trong 21 chủng vi khuẩn để giải trình tự đoạn 16S-rDNA bằng máy giải trình tự tự động ABI và sử dụng phần mềm BLAST N để so sánh trình tự 10 chủng vi khuẩn này có trong ngân hàng dữ liệu NCBI, kết quả cho thấy chủng TB-1 có mức tương đồng 98% và TB-3 có mức tương đồng 99% với *Burkholderia vietnamiensis* EF158392.1, *B. vietnamiensis* DQ979872.1, *B. vietnamiensis* DQ979870.1 và *B. vietnamiensis* DQ979868.1; chủng vi khuẩn TB-4 có mức tương đồng 100% với *B. vietnamiensis* EU56935.1, chủng vi khuẩn TB-5 có mức tương đồng 98% với *B. vietnamiensis* FJ436055.1; các chủng vi khuẩn TB-6, VL-3, VL-13, VL-16 có mức tương đồng 98% với *B. vietnamiensis* DQ979871.1, *B. vietnamiensis* DQ979867.1; chủng vi khuẩn TB-25 có mức tương đồng 98% với *Agrococcus* sp. GQ504748.1 và *Agrococcus baldri* AB279548.1; chủng vi khuẩn TB-26 có mức tương đồng 97% với *B. kururienensis* AY098590.1.

Từ khóa: *Burkholderia kururienensis*, *B. vietnamiensis*, cây lúa, cố định đạm, đất vùng rễ, 16S rDNA

MỞ ĐẦU

Phân bón nói chung và phân đạm hoá học nói riêng đã góp phần quan trọng trong việc gia tăng năng suất cây trồng, đặc biệt là cây lúa. Thế nhưng sự lạm dụng phân đạm hóa học sẽ dẫn đến những hậu quả như thay đổi lý, hóa tính của đất (chai đất), giảm độ phì, mất cân bằng sinh thái và gây ô nhiễm môi trường do sự thất thoát nitrat. Cây lúa cần nhiều chất dinh dưỡng khác nhau, trong đó, chất đạm là nguồn dinh dưỡng hàng đầu. Tuy nhiên, khi bón phân đạm hóa học cho ruộng lúa, chỉ có khoảng 50-60% lượng đạm bón vào trong đất được cây lúa hấp thu (Võ Minh Kha, 2003). Bón quá nhiều phân đạm hóa học sẽ dẫn đến chi phí cao, không những làm ô nhiễm môi trường mà còn gây tổn hại đến sức khỏe và ảnh hưởng tiêu cực đến hệ sinh thái. Hiện nay, các nhà khoa học tập trung nghiên cứu và sử dụng các chủng vi khuẩn cố định đạm sinh học. Do đó, nghiên cứu và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng cố định đạm hữu hiệu bón cho cây lúa là góp phần nghiên cứu nguồn đạm sinh học và cần cho sự phát triển nông nghiệp bền vững.

Ở Việt Nam, có những nghiên cứu rất sớm về vi khuẩn cố định nitrogen như vi khuẩn nốt rễ cho cây đậu (Trần Phước Đường *et al.*, 1984) và luân canh đậu - lúa (Trần Phước Đường *et al.*, 1999) nhưng nghiên cứu về vi khuẩn sống trong rễ lúa chỉ có những nghiên cứu của Gillis và đồng tác giả (1995) phát hiện vi khuẩn *Burkholderia vietnamiensis* sống trong rễ lúa trồng ở Việt Nam. Chiến lược hướng tới một nền nông nghiệp bền vững sinh thái ở Việt nam đã được thiết lập. Để góp phần thực hiện chiến lược này, các vi khuẩn có ích cho cây lúa ở đồng bằng sông Hồng cũng được quan tâm nghiên cứu trong những năm qua (Nguyễn Ngọc Dũng *et al.*, 2000). Sau đó, các nhà khoa học đã xác định được *B. vietnamiensis* là loài vi khuẩn có khả năng cố định đạm giúp tăng năng suất lúa (Trần Văn Văn *et al.*, 2000), tăng năng suất mía (Baldani *et al.*, 2002). Ngoài ra, các loài *Burkholderia* có khả năng cố định đạm (Yabuuchi *et al.*, 1995) như *B. brasilense*, *B. tropica* ở cây mía (Döbereiner *et al.*, 1993; Baldani, 1996; Baldani *et al.*, 2002), *B. kururienensis* (Zhang *et al.*, 2000), *B. brasilense*, *B. tropicalis* ở khóm và

chuối (Leonardo *et al.*, 2001), *B. unumac* sống nội sinh trong cây ngô (Caballero-Mellado *et al.*, 2004), *B. kururienensis* có thể xâm nhiễm rễ nội sinh ở rễ lúa (Mattos *et al.*, 2008) và *B. vietnamiensis* có trong đất vùng rễ lúa ở Kiên Giang (Ngô Thanh Phong *et al.*, 2010) lần lượt được các nhà khoa học phát hiện.

Trong bài báo này, chúng tôi tiến hành phân lập, nhận diện và đánh giá khả năng cố định đạm ở những loài vi khuẩn từ đất vùng rễ lúa trồng trên đất phù sa tỉnh Vĩnh Long.

NGUYỄN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mẫu đất

Các mẫu đất vùng rễ lúa được thu thập từ các ruộng lúa tại 9 xã trong 3 huyện thuộc tỉnh Vĩnh Long (xã Long Phú, Mỹ Thạnh Trung, Song Phú thuộc huyện Tam Bình; xã Thới Hòa, Vĩnh Xuân, Hòa Bình thuộc huyện Trà Ôn; xã Hiếu Phụng, Hiếu Nghĩa, Hiếu Nhơn thuộc huyện Vũng Liêm).

Phân lập vi khuẩn cố định N

Môi trường phân lập vi khuẩn là môi trường đặc chủng *Pseudomonas isolation Agar* (Difco) (Mirza *et al.*, 2006).

Đất vùng rễ sau khi để khô ở nhiệt độ phòng thì tiến hành phân lập và quan sát khuẩn lạc, kiểm tra độ rỗng (Ngô Thanh Phong *et al.*, 2010). Khi thấy vi khuẩn đã rỗng (thuần nhất) thì cấy chuyển sang ống nghiệm chứa môi trường đặc tương ứng để trừ ở 4°C và được xem như một chủng riêng biệt. Ký hiệu TB, TÔ, VL là các chủng vi khuẩn phân lập ở Tam Bình, Trà Ôn và Vũng Liêm, tỉnh Vĩnh Long.

Đánh giá khả năng cố định đạm của các chủng vi khuẩn

Vi khuẩn được nhân nuôi trong môi trường Burk long không đạm và tiến hành đo lượng NH_4^+ sinh ra sau 2, 4, 6 và 8 ngày bằng phương pháp Phenol Nitroprusside.

Chọn mười chủng trong các chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp NH_4^+ cao và đại diện cho những nơi thu mẫu để tiếp tục kiểm tra khả năng cố định đạm thông qua xác định hoạt tính nitrogenase (lập lại 3 lần) bằng phương pháp khử acetylenec (acetylenec. reduction assay - ARA) (Dilworth, 1966).

Tách chiết DNA và khuếch đại gen *nifH* của vi khuẩn

DNA của các chủng vi khuẩn phát triển tốt trong môi trường Burk không N được trích theo quy trình của Neumann và đồng tác giả (1992), thực hiện các phản ứng PCR để khuếch đại gen *nif* theo quy trình của Poly và đồng tác giả (2001) với cặp mỗi đặc hiệu PolF 5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC -3' và PolR 5'-ATCGCCATCATYTCRCCGGA -3'. Cặp mỗi đặc hiệu đặc hiệu PolF và PolR sẽ khuếch đại phân đoạn 115 - 476 bp của gen *nifH* ở vi khuẩn cố định đạm.

Giải trình tự 16S-rDNA

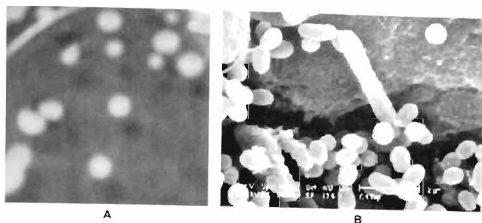
Chọn ngẫu nhiên 10 chủng vi khuẩn có gen *nifH* để giải trình tự đoạn 16S-rDNA (PCR với cặp mỗi FGPS4-281bis 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' và FGPS1509-153 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3') bằng máy giải trình tự tự động ABI và sử dụng phần mềm BLAST N để so sánh trình tự mười chủng vi khuẩn này với các chủng vi khuẩn có trong ngân hàng dữ liệu NCBI.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

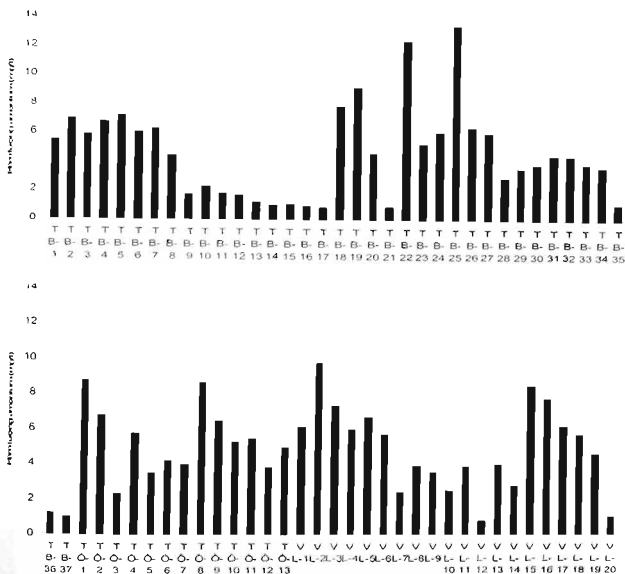
Hình thái của vi khuẩn

Từ 27 mẫu đất vùng rễ lúa tại 9 xã trong 3 huyện thuộc tỉnh Vĩnh Long (huyện Tam Bình, huyện Trà Ôn và huyện Vũng Liêm), đã tiến hành phân lập được 70 chủng vi khuẩn trên môi trường đặc chủng *Pseudomonas isolation Agar* (Difco) (Mirza *et al.*, 2006).

Tất cả 70 chủng vi khuẩn đều có khuẩn lạc hình tròn với đường kính khoảng 0,4 - 1,5 mm sau 2 ngày nuôi cấy. Các chủng vi khuẩn có khuẩn lạc màu trắng đục chiếm đa số (55/70, chiếm 78,6%) (Hình 1A), 9/70 chủng vi khuẩn có khuẩn lạc màu trắng trong (12,8%), 2/70 chủng vi khuẩn có màu xanh (2,9%) và 4/70 chủng vi khuẩn có khuẩn lạc màu vàng (5,7%). Có 62/70 chủng vi khuẩn có khuẩn lạc dạng mô (88,6%) và 8 chủng vi khuẩn có khuẩn lạc dạng lá (11,4%). Có 56/70 chủng vi khuẩn có bia khuẩn lạc dạng nguyên (80%) và 14 chủng vi khuẩn có bia khuẩn lạc dạng răng cưa (20%). Có 68/70 chủng có dạng que ngắn (đài 1,5 - 2,2 μm ; rộng 0,6 - 0,8 μm) chiếm 98,6% (Hình 1B), 2 chủng TB-37 và VL-10 có dạng que dài (đài 2,8 - 3,3 μm ; rộng 1,2 - 1,4 μm) chiếm 1,4%.



Hình 1 Khuẩn lạc (A) và tế bào vi khuẩn của chủng TB-4 (B)



Hình 2. Khả năng tổng hợp NH₄⁺ của các chủng vi khuẩn (LSD = 2,44) TB 1 – 37 là 37 chủng vi khuẩn phân lập từ Tam Bình - Vĩnh Long. T0 1 – 13 là 13 chủng phân lập từ Trà Ôn - Vĩnh Long, VL 1 – 20 là 20 chủng phân lập từ Vũng Liêm - Vĩnh Long

Khả năng tổng hợp NH₄⁺ của các chủng vi khuẩn

Có 59 chủng vi khuẩn trong số 70 chủng có khả năng phát triển tốt trong môi trường Burk không nitrogen. Tiến hành đo lượng NH₄⁺ sinh ra từ 59 chủng vi khuẩn trên bằng phương pháp Phenol - Nitroprusside thì 59 chủng này đều có khả năng tổng hợp NH₄⁺ tốt, đặc biệt hàm lượng NH₄⁺ cao được tổng hợp từ một số chủng như TB-25 (13.56 mg/l), TB-22 (12.49 mg/l), VL-2 (9.76 mg/l), TB-19 (9.17 mg/l), TÔ-1 (8.78 mg/l), TÔ-8 (8.67 mg/l), khác biệt có ý nghĩa thống kê với các chủng vi khuẩn còn lại (Hình 2).

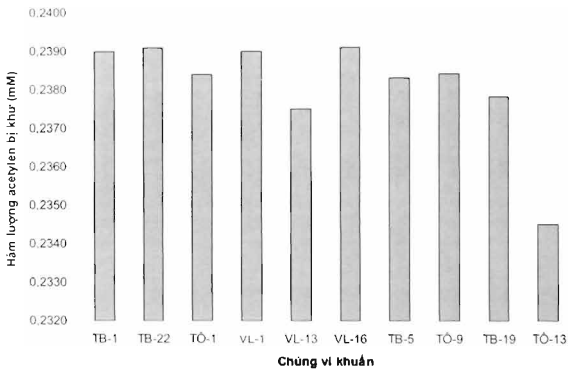
Hoạt tính nitrogenase của các chủng vi khuẩn

Chọn 10 chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp

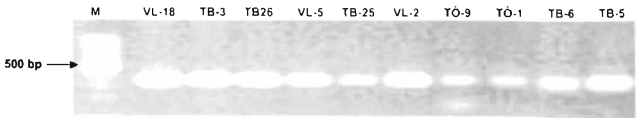
NH₄⁺ cao và đại diện cho những nơi thu mẫu để tiếp tục kiểm tra khả năng cố định đạm thông qua xác định hoạt tính nitrogenase bằng phương pháp khử acetylenee (acetylenee reduction assay - ARA) (Dilworth, 1966). Kết quả cho thấy, có 9 trong 10 chủng có hoạt tính nitrogenase cao (0,2375 mM - 0,2391 mM) và khác biệt không có ý nghĩa thống kê, chỉ có 1/10 chủng (TÔ-13) có hoạt tính nitrogenase thấp nhất (0,2345 mM) và khác biệt có ý nghĩa thống kê với 9 chủng còn lại (Hình 3).

Nhận diện các chủng vi khuẩn

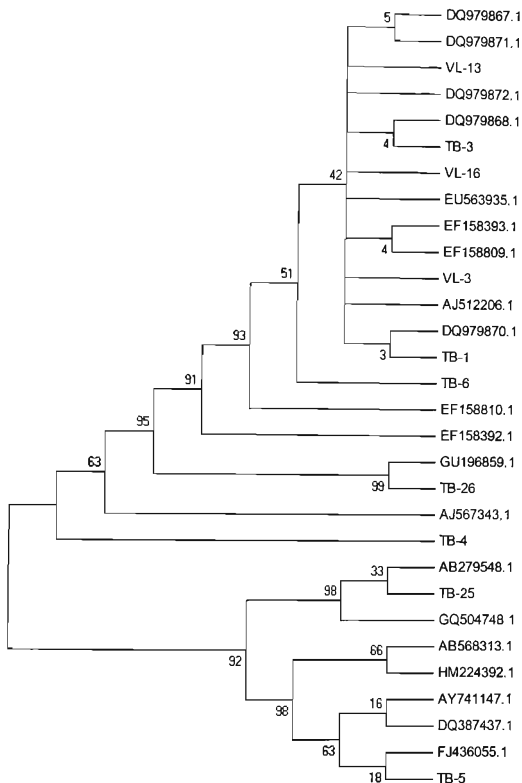
Kết quả kiểm tra trên gel agarose 1% cho thấy có 21 chủng có băng (band) tương ứng 475 bp là phù hợp với vị trí của gen *nif* (Poly *et al.*, 2001) (Hình 4)



Hình 3. Hoạt tính nitrogenase (mM) của 10 chủng vi khuẩn thông qua khả năng khử acetylenee.



Hình 4. Sản phẩm PCR được nhận lên từ DNA của các chủng vi khuẩn phân lập trong môi trường Burk không đạm (M: thang chuẩn 100 bp).



Hình 5. Cây phát sinh chủng loại theo kết quả so sánh trình tự nucleotide đoạn 16S-rDNA của 10 chủng vi khuẩn VL-3, TB-3, VL-15, VL-13, TB-1, TB-6, TB-25, TB-5, TB-4 và TB-26 với các chủng *Burkholderia* và 1 chủng *Agrococcus* sp. đã công bố thông qua phần mềm BLAST N và xử lý bằng phần mềm MEGA 4.1.

Chọn ngẫu nhiên 10 trong tổng số 21 chủng vi khuẩn có gen *nif* để giải trình tự đoạn 16S-rDNA bằng máy giải trình tự tự động ABI và sử dụng phần mềm BLAST N để so sánh trình tự mười chủng vi khuẩn này với các chủng đã công bố trong NCBI, kết quả cho thấy chủng vi khuẩn TB-1 có tổng số nucleotide được giải là 718 nucleotide có mức tương đồng 98% và TB-3 có tổng số nucleotide được giải là 720 nucleotide có mức tương đồng 99% với *Burkholderia vietnamiensis* JC 4.18, *Burkholderia vietnamiensis* AU 0913 và *Burkholderia vietnamiensis* JC 2.10; chủng vi khuẩn TB-4 có tổng số nucleotide được giải là 950 nucleotide có mức tương đồng 100% với *Burkholderia vietnamiensis* G4; chủng vi khuẩn TB-5 có tổng số nucleotide được giải là 949 nucleotide có mức tương đồng 98% với *Burkholderia vietnamiensis* SYe 6386.; chủng vi khuẩn TB-6 có tổng số nucleotide được giải là 950 nucleotide, VL-3 có tổng số nucleotide được giải là 752 nucleotide, VL-13 có tổng số nucleotide được giải là 728 nucleotide, VL-16 có tổng số nucleotide được giải là 784 nucleotide có mức tương đồng 98% với *Burkholderia vietnamiensis* TVV75, *Burkholderia vietnamiensis* AU 0829, *Burkholderia vietnamiensis* LMG 16232; chủng vi khuẩn TB-26 có tổng số nucleotide được giải là 950 nucleotide có mức tương đồng 97% với *Burkholderia kururienensis*. Riêng chủng vi khuẩn TB-25 có tổng số nucleotide được giải là 950 nucleotide có mức tương đồng 98% với *Agrococcus* sp., thuộc xạ khuẩn. Theo Nguyễn Lân Dũng và Nguyễn Kim Nữ Thảo (2006), xạ khuẩn phần bù chủ yếu trong đất và có vai trò quan trọng trong chu trình tuần hoàn vật chất trong tự nhiên.

Theo cây phát sinh chủng loại (Hình 5), 5 chủng VL13, TB-3, VL-16, VL-3 và TB-1 có tương quan di truyền gần nhau và cùng với chủng TB-6, TB-26 và TB-4 tạo thành một nhóm riêng trên cây phát sinh chủng loại. Nhóm này cũng có tương quan di truyền gần với nhóm *Burkholderia* đã công bố (*B. vietnamiensis* DQ979871.1; *B. vietnamiensis* EF158392.1; *B. vietnamiensis* GU196859.1; *B. vietnamiensis* AJ512206.1) hình thành một nhánh lớn riêng biệt (Hình 4). Hai chủng vi khuẩn còn lại (TB-25 và TB-5) đứng trong một nhánh lớn khác của cây phát sinh chủng loại và có tương quan gần với các chủng *Burkholderia vietnamiensis*, chủng *Agrococcus* sp G4 GQ504748 và *Agrococcus baldri* AB279548.1 đã công bố trong ngân hàng dữ liệu NCBI.

KẾT LUẬN

Từ 27 mẫu đất vùng rễ lúa, phân lập được 70 chủng vi khuẩn và xác định 59 chủng vi khuẩn có khả năng phát triển tốt trong môi trường Burk không nitơ và có khả năng tổng hợp NH_4^+ , trong đó có 6 chủng tổng hợp NH_4^+ rất cao.

Nhận diện được 21 chủng có gen *nif* trong tổng số 25 chủng, trong đó có 10 chủng vi khuẩn được chọn ngẫu nhiên (trong số 21 chủng vi khuẩn có bằng tương ứng với vị trí của gen *nif*) đều tạo nitrogenase có hoạt tính thông qua kết quả khử acetylene.

Đã giải trình tự DNA của đoạn gen 16S, rRNA ở 10 chủng vi khuẩn và xác định mức độ tương đồng của các chủng vi khuẩn cố định đạm này với các chủng vi khuẩn có trong ngân hàng dữ liệu của NCBI, có 9/10 chủng vi khuẩn có mức tương đồng từ 97% đến 100% với *Burkholderia*, trong đó có 8 chủng vi khuẩn có mức tương đồng 98, 99 và 100% với *Burkholderia vietnamiensis* và 1 chủng vi khuẩn có mức tương đồng 97% với *B. kururienensis*. Một chủng có tỷ lệ tương đồng 98% với *Agrococcus* sp.

Lời cảm ơn. Các tác giả chân thành Bộ Giáo dục và Đào tạo đã hỗ trợ kinh phí thực hiện đề tài. Đồng thời, cảm ơn ThS. Quách Ngọc Truyền, Đại học Missouri. Hoa Kỳ đã giúp phân tích và so sánh trình tự nucleotide tạo cây phát sinh chủng loại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baldani VLD (1996) Caracterizac parcial de uma nova bacteria diazotrofica e endofitica do genero *Burkholderia*. PhD Thesis. Um. Federal Rual no Rio de Janeiro, Brazil.
- Baldani JI, Reis VM, Baldani VLD, Goi SR, Döbereiner J (2002) A brief story of nitrogen fixation in sugarcane - reasons for success in Brasil. *Func Plant Biol* 29, 417-423.
- Caballero-Mellado J, Martinez-Aguilar L, Paredes-Valdez G, Santos PE (2004) *Burkholderia imamae* sp. var., an N_2 -fixing rhizospheric and endophytic species *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 1165-1172.
- Dilworth MJ (1966) Acetylene reduction by nitrogen fixing preparation from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem Biophys Acta* 127: 285-294.
- Döbereiner J, Reis VM, Paula MA, Olivares F (1993) Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereal and tuber plants. *The Netherlands: Kluwer Academic Publishers*. 671-676.
- Gillis M, Tran Van V, Bardin R, Goor M, Hebbar P, William A, Segers P, Kersters, Heulin T, Fernandez MP

(1995) Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int J Syst Bacteriol* 45: 274-289.

Leonardo MC, Souza EM, Weber OB, Baldani JJ, Döbereiner J, Pedrosa FO (2001) 16S Ribosome DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa* spp.) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril) *Appl Environ Microbiol* 67(5): 2375-2379.

Mattos KA, Pádua LM, Romeiro A, Hallack LF, Neves BC, Ulisses MU, Barros CF, Todeschini AR, Previato JO, Mendocça-Previato L (2008) Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the diazotrophic bacterium *Burkholderia kururiensis* and its ability to enhance plant growth. *Ana Acad Bras Ciên* 80(3): 477-493.

Mirza S, Mehnaz MS, Normand P, Prigent-Combaret C, Moenne-Loccoz Y, Bally R, Malik KA (2006) Molecular characterization and PCR detection of a nitrogen-fixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth. *Biol Fertil Soils* 43: 163-170.

Neumann P, Pospiech A, Schairrer HU (1992) Rapid isolation of genome DNA from Gram negative bacteria. *Trends Genet* 8: 332-333.

Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Kim Nữ Thảo (2006) Những nhóm vi khuẩn chủ yếu. *Vietsciences*, 15-02-2006.

Nguyễn Ngọc Dũng, Hồ Thị Kim Anh, Vũ Thanh (2000) Vi khuẩn cố định nitrogen vi hiếu khí khu trú trong rễ lúa ở một số địa điểm thuộc đồng bằng sông Hồng. *Tuyển tập Nghiên cứu về Nghiên cứu cơ bản trong sinh học Hội Nghị Sinh học quốc gia. Hà Nội. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội*

Ngô Thanh Phong, Nguyễn Thị Minh Thư, Cao Ngọc Diệp (2010) Phân lập và nhận diện vi khuẩn cố định đạm trong

đất vùng rễ lúa trồng trên đất phù sa tỉnh Kiên Giang. *Tap chí Công nghệ Sinh học* 8(3A): 1015-1020.

Poly F, Joteur ML, Bally R (2001) Improvement in RELP procedure to study the community of nitrogen fixers in soil through the diversity of *nifH* gene. *Res Microbiol* 152: 95-103

Tran Phuoc Duong, Cao Ngoc Diep, Nguyen Tri Khiem, Nguyen Huu Hiep, Nguyen Van Toi, Nguyen Van Lich, Le Thi Kieu Nhan (1984) *Rhizobium* inoculant for soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in Mekong Delta. I. Response of soybean to *Rhizobium* inoculant. *Plant Soil* 79: 235-240.

Tran Phuoc Duong, Cao Ngoc Diep, Vo Huy Dang, Nguyen Huu Hiep, Tong Huu Thuan (1999) Evaluation of Nitrogen fixation by soybean-Rhizobium symbiosis on rotation cropping system soybean-rice using ¹⁵N technique. *Proceedings of Applied Nuclear technique conference at Dalat* from 14-15 March, 1999.

Tran Van V, Berge O, Ngo Ke S, Balandreau J, Heulin T (2000) Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid of Vietnam. *Plant Soil* 218:273-284.

Võ Minh Kha (2003) Sử dụng phân bón phối hợp cân đối: nguyên lý và giải pháp. *Nxb Nghệ An*

Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y (1995) Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gene nov. Proposal of *Ralstonia pickettii*. *Microbiol Immunol* 39: 897-904.

Zhang H, Hanada S, Shigematsu T, Shibuya K, Kamagata Y, Kanagawa T, Kuran R (2000) *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:743-9.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF NITROGEN-FIXING BACTERIA ISOLATED FROM RHIZOSPHERE SOILS OF RICE GROWN ON ALLUVIAL SOIL OF VINH LONG PROVINCE

Ngô Thanh Phong^{1,*}, Nguyễn Thị Phương Thảo², Cao Ngọc Diệp³

¹Can Tho University

²Phanngochien High School, Ca Mau Province

³Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University

SUMMARY

Seventy nitrogen-fixing bacteria were isolated from 27 rice rhizosphere soil samples of three districts (Tam Binh, Tra On and Vung Liem) in Vinh Long province, there were 59 among 70 isolates having high

* Author for correspondence: Tel: 84-918203249; Fax: 84-710-3832062; E-mail: ngophong@ctu.edu.vn

nitrogen-fixing ability (they grew well in Burk N-free and high ARA). In 25 isolates, 21 isolates had band at 475 bp in agarose gel of PCRs with specific primers *nif* gene PolF and PolR and 10 among 21 isolates were analysed to sequence for 16S rRNA gene sequence randomly by ABI sequencer and DNA sequences were compared with GenBank sequences database by BLAST N software, the results showed that TB-1 isolate had the similarity by 98% and TB-3 isolate had the similarity by 99% with *Burkholderia vietnamiensis* EF158392.1, *B. vietnamiensis* DQ979872.1, *B. vietnamiensis* DQ979870.1 and *B. vietnamiensis* DQ979868.1; TB-4 isolate was 100% of the identify with *B. vietnamiensis* EU56935.1; TB-5 isolate was 98% of the identify with and *B. vietnamiensis* FJ436055.1 about *nifH* gene, TB-6, VL-3, VL-13, VL-16 isolate were 98% of the identify with *B. vietnamiensis* EF158810.1, *B. vietnamiensis* DQ979871.1, *B. vietnamiensis* DQ979867.1; TB-25 isolate had the identity rate 98% with *Agrococcus* sp. GQ504748 and *Agrococcus baldri* AB279548.1; TB-26 isolate had the identity rate 97% with *B. kururiensis* AY098590.1.

Keywords: Biological nitrogen fixation, *Burkholderia kururiensis*, *B. vietnamiensis*, rhizosphere soil, 16S rDNA, rice