

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN CÓ ĐỊNH NITROGEN TỪ ĐẤT CHUYÊN CANH RAU Ở TỈNH THỪA THIÊN HUẾ

Phạm Thị Ngọc Lan, Nguyễn Thị Việt, Lê Thị Hoa Sen
Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

Việc lạm dụng phân bón hóa học, thuốc bảo vệ thực vật đã làm giảm khả năng chống chịu của cây trồng dẫn đến bùng nổ dịch bệnh, đây cũng là nguyên nhân tất yếu dẫn đến thoái hóa đất canh tác, gây ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng không tốt đến chất lượng nông sản và sức khỏe con người. Trong khi đó, phân bón hữu cơ vi sinh là sản phẩm chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật sống được tuyển chọn với mật độ đạt tiêu chuẩn quy định, kết hợp với các nguồn nguyên liệu hữu cơ khác nhau, nhằm tăng khả năng hấp thu và cung cấp chất dinh dưỡng cho cây trồng, góp phần cải tạo đất. Phân bón hữu cơ vi sinh góp phần nâng cao năng suất cây trồng và chất lượng nông sản, đóng góp quan trọng trong sự phát triển “kinh tế xanh”, xây dựng nền nông nghiệp bền vững. Trong khuôn khổ bài báo này chúng tôi đề cập đến các nghiên cứu phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn cố định N, với mong muốn tìm ra được các chủng có hoạt lực cố định N mạnh phù hợp với vùng sinh thái hẹp của địa phương để tạo chế phẩm sinh học và đưa trở lại đất trồng rau.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Các chủng vi khuẩn có khả năng cố định N được phân lập từ đất vùng rễ của các loại cây xà lách, rau thơm, hành lá, rau dền, cải, rau má, ngô,... trên địa bàn phường Hương Hồ, thị xã Hương Trà, tỉnh Thừa Thiên-Huế.

2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp thu mẫu: chọn vùng đất gần rễ cây, gạt bỏ lớp đất bề mặt 2-3 cm, thu mẫu đất tại nhiều vị trí theo quy tắc đường chéo góc.

- Phương pháp phân lập và đếm số lượng tế bào: sử dụng phương pháp Koch để phân lập vi khuẩn cố định N trên môi trường Ashby. Số lượng tế bào vi khuẩn xác định bằng phương pháp đếm gián tiếp thông qua số lượng khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch đĩa [1].

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

- Phương pháp tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng cố định N: nuôi cấy lác (120 vòng/phút) chủng vi khuẩn trong môi trường dịch thể Ashby ở nhiệt độ 30°C sau thời gian 4 ngày. Thu dịch nuôi cấy, xác định hàm lượng N-NH₄⁺ tạo thành bằng phương pháp so màu với thuốc thử Nessler (Phạm Thị Ngọc lan (2012)). Phần cặn được sấy khô để xác định sinh khối vi khuẩn.

- Xác định một số đặc điểm hình thái, sinh hóa và phân loại chủng vi khuẩn: quan sát khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường Ashby thạch đĩa. Quan sát hình thái tế bào bằng phương pháp nhuộm Gram (Phạm Thị Ngọc lan (2012)). Phân loại chủng vi khuẩn bằng giải trình tự 16S rRNA và tra cứu trên GenBank để định danh loài vi khuẩn.

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

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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

Tiến hành phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng cố định N trên môi trường Ashby thạch đĩa từ 10 đợt thu mẫu đất ở các vùng chuyên canh rau. Đã phân lập được 199 chủng vi khuẩn cố định N. Kết quả xác định số lượng vi khuẩn cố định N trong đất trồng rau được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1

Số lượng vi khuẩn cố định N trong các mẫu đất chuyên canh rau

TT	Đất trồng	pH _{KCl}	CFU/g khô (x10 ⁶)	TT	Đất trồng	pH _{KCl}	CFU/g khô (x10 ⁶)
1	Đậu đỏ	4,5	1,25	6	Rau dền	6,15	1,48
	Đậu phụng	5,41	1,35		Sắn	5,85	0,48
	Hành lá	3,75	0,17		Ớt	6,14	1,33
	Khoai lang	4,15	0,45		Hành lá	3,39	0,50
	Rau thơm	5,42	0,57				
2	Rau thơm	4,52	0,24	7	Rau muống	3,57	9,26
	Hành lá	4,08	0,13		Cải	5,83	0,28
	Ngô	4,52	1,56		Hành lá	4,15	0,16
	Đậu đỏ	5,83	1,25		Ngô	5,57	2,13
3	Cải	4,9	0,17	8	Rau thơm	6,12	1,26
	Rau thơm	4,5	0,44		Khoai lang	5,04	12,49
	Rau má	4,79	0,43		Cải	5,87	3,33
	Rau dền	5,29	0,27		Hành tằm	4,72	0,35
			Đậu phụng		5,37	22,95	
4	Khoai lang	5,35	0,77	9	Hành lá	4,55	0,85
	Khoai lang	6,10	1,00		Ngô	4,72	2,31
	Ngô	5,45	8,43		Khoai lang	4,12	2,99
			Rau dền		5,98	1,81	
			Sả		5,02	1,01	
5	Đậu phụng	5,35	2,01	10	Cải	4,70	0,38
	Đậu ngự	4,16	1,66		Khoai lang	4,67	2,82
	Hành lá	4,35	0,11		Hành lá	4,07	0,78
	Rau muống	3,66	1,66		Hoa huệ	5,83	0,98
	Sả	4,65	2,01		Ngô	5,71	1,23
	Khoai lang	4,05	0,49				

Theo Lê Thị Hương Xuân (2005) khi nghiên cứu trên nền đất canh tác bạc màu số lượng vi khuẩn cố định N cao nhất đạt $265,5 \times 10^6$ CFU/g và thấp nhất là $3,3 \times 10^6$ CFU/g, là cao hơn nhiều so với kết quả nghiên cứu của chúng tôi [Lê Thị Hương Xuân, Phạm Thị Ngọc lan (2005)]. Nguyên nhân số lượng vi khuẩn cố định nitrogen trên đất trồng rau màu ở phường Hương Hồ, thị xã Hương Trà giảm có thể là do sử dụng thuốc bảo vệ thực vật quá nhiều, sử dụng nhiều phân bón hóa học,... làm cho hệ vi sinh vật có ích trong đất giảm đáng kể.



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

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

Khả năng sinh trưởng và phát triển của các chủng vi khuẩn phân lập được thể hiện trên môi trường Ashby thạch đĩa vô đạm. Các chủng vi khuẩn muốn sinh trưởng và phát triển được thì bắt buộc phải cố định N từ không khí, đường kính và bề dày khuẩn lạc phản ánh sơ bộ khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn. Kết quả sàng lọc được trình bày ở bảng 2 và hình 2.

Bảng 2

Khả năng sinh trưởng và phát triển của các chủng vi khuẩn phân lập

Sinh trưởng và phát triển	Kích thước khuẩn lạc (mm)	Số chủng	Tỷ lệ (%)
Yếu	≤ 4	42	21,1
Trung bình	5 – 7	86	43,26
Mạnh	8 – 11	56	28,10
Rất mạnh	≥ 12	15	7,54

Qua bảng 2 chúng tôi nhận thấy, khả năng sinh trưởng phát triển của các chủng vi khuẩn trên môi trường là không đều. Số chủng vi khuẩn có khả năng sinh trưởng phát triển trung bình và mạnh chiếm tỷ lệ cao (trung bình: 43,26%; mạnh: 28,10%), còn các chủng rất mạnh chiếm tỷ lệ khá thấp (7,54%).

Theo kết quả nghiên cứu của Phạm Thị Ngọc lan và cộng sự (1999), trong số 137 chủng vi khuẩn cố định N phân lập từ đất vùng gò đồi tỉnh Thừa Thiên-Huế chỉ có 6 chủng với khả năng cố định N mạnh (chiếm tỷ lệ 4,4%) (Phạm Thị Ngọc lan, Trương Văn Lung (1999)). Theo Đỗ Kim Nhung và Vũ Thành Công (2011), trong số 16 chủng vi khuẩn cố định N phân lập từ đất trồng mía chỉ có 2 chủng vi khuẩn có khả năng cố định N mạnh (Đỗ Kim Nhung, Vũ Thành Công (2011)).

Để tuyển chọn chủng vi khuẩn cố định N mạnh, chúng tôi lựa chọn 11 chủng có đường kính và bề dày khuẩn lạc lớn nuôi cấy lác trong môi trường Ashby dịch thể. Sau 4 ngày, xác định sinh khối khô và hàm lượng N-NH₄⁺ trong môi trường nuôi cấy bằng phương pháp so màu với thuốc thử Nessler ở bước sóng 425 nm. Kết quả được trình bày ở bảng 3.



Hình 2: Một số chủng VK cố định N sinh trưởng phát triển mạnh trên môi trường Ashby thạch đĩa

Bảng 3

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

Chủng vi khuẩn	Sinh khối khô (mg/mL)	Hàm lượng N-NH ₄ ⁺ (mg/L)
N40	27,18 ^b	4,84 ^c
N49	29,42^b	33,6^b
N112	24,15 ^{bc}	4,41 ^c
N123	29,41 ^b	7,8 ^c
N128	25,13 ^{bc}	31,23 ^b
N155	18,08 ^c	2,4 ^c
N157	23,43 ^{bc}	4,21 ^c
N161	37,45^a	43,41^a
N177	27,07 ^b	6,62 ^c
N184	24,15 ^{bc}	33,82 ^b

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

Qua kết quả phân tích cho thấy, trong số 11 chủng vi khuẩn nghiên cứu có hai chủng có khả năng sinh trưởng phát triển mạnh ở môi trường Ashby dịch thể là N49 và N161. Trong đó, chủng N161 có sinh khối tích lũy mạnh nhất (37,45 mg/mL) và hàm lượng N-NH₄⁺ là cao nhất (43,41 mg/L). Chủng N49 cũng có khả năng tạo sinh khối khá lớn (29,42 mg/mL) và hàm lượng N-NH₄⁺ cũng khá cao (33,82 mg/L).

Theo nghiên cứu của Đỗ Kim Nhung và Vũ Thành Công (2011), trong số 16 chủng vi khuẩn cố định N phân lập từ đất trồng mía, chủng A1 có khả năng cố định N với hàm lượng N-NH₄⁺ là 8,09 mg/L sau 4 ngày nuôi cấy (Đỗ Kim Nhung, Vũ Thành Công (2011)). Theo Đỗ Hoàn Quân (2011) khi nghiên cứu đặc tính cố định N của vi khuẩn *Azotobacter* từ các mẫu đất lấy ở các địa điểm khác nhau (Hà Nội, Lâm Đồng, Đồng Nai, Long An, Tiền Giang, Bến Tre), hàm lượng N-NH₄⁺ cố định được của chủng Az 07 trong điều kiện nuôi cấy tối ưu lên tới 164,27 mg/L (Đỗ

Hoành Quân (2011)).

3. Phân loại

Hai chủng vi khuẩn N49 và N161 được phân loại bằng giải trình tự gen 16S rRNA và tra cứu trên GenBank để định danh loài.

3.1. Chủng N49

Chủng N49 được nuôi cấy trên môi trường Ashby thạch đĩa, hình thái khuẩn lạc có đặc điểm như sau: khuẩn lạc màu vàng đậm, dày, mép không đều, không tiết sắc tố ra môi trường, đường kính đạt 18 mm sau 4 ngày nuôi cấy. Trong điều kiện nuôi cấy lỏng môi trường Ashby dịch thể, chủng N49 phát triển làm dịch nuôi cấy từ dạng lỏng chuyển sang dạng quánh sệt, có mùi thơm. Quan sát tiêu bản nhuộm Gram chủng N49: tế bào có hình tròn, bắt màu Gram âm. Kết quả giải trình tự gen của chủng vi khuẩn N49 được trình bày ở hình 3 và bảng 4.

Query	1	TGATCCTGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGC	60
Sbjct	5	TGATCCTGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGC	64
Query	61	ACAGGAGAGCTTGTCTCTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCT	120
Sbjct	65	ACAGGAGAGCTTGTCTCTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCT	124
Query	121	ACTTTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTACGGGT	180
Sbjct	125	ACTTTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTACGGGT	184
Query	181	GAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGC GCGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTT	240
Sbjct	185	GAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGC GCGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTT	244
Query	241	GGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCA	300
Sbjct	245	GGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCA	304
Query	301	CACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACA	360
Sbjct	305	CACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACA	364
Query	361	ATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAG	420
Sbjct	365	ATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAG	424
Query	421	CCCTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCTGGCTAATACCCGGTTGGGATGACGGTACCCAAA	480
Sbjct	425	CCCTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCTGGCTAATACCCGGTTGGGATGACGGTACCCAAA	484
Query	481	GAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGC 505	
Sbjct	485	GAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGC 509	

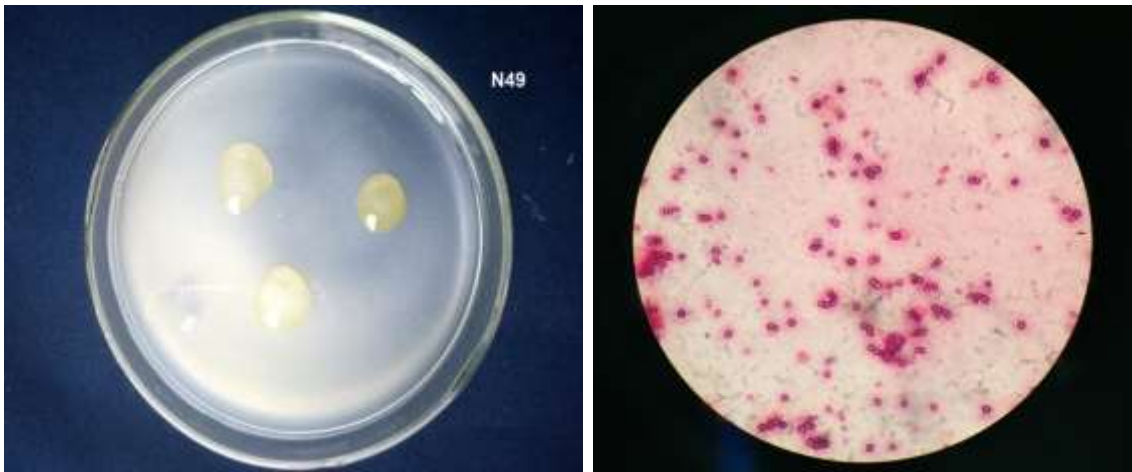
Hình 3: Trình tự nucleotide đoạn gen 16S rARN của chủng N49

Bảng 4

Đánh giá mức độ tương đồng trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng N49

Tên loài	Tên chủng	Mã số truy cập	Độ tương đồng (%)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ACA8	JN703732.1	100

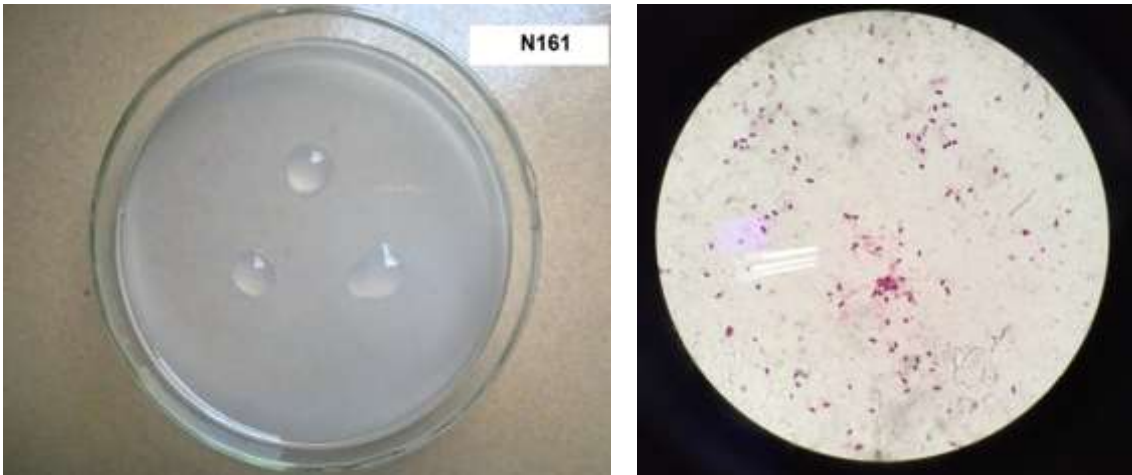
Qua kết quả nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn N49 tương đồng 100% với trình tự đoạn gen 16S rRNA ở chủng *Stenotrophomonas maltophilia* ACA8, JN703732.1. Chủng N49 được xếp vào chi *Stenotrophomonas*, loài *Stenotrophomonas maltophilia*.



Hình 4: Chủng N49 trên môi trường thạch đĩa và ảnh chụp tiêu bản (x100)

3.2. Chủng N161

Chủng vi khuẩn N161 được nuôi cấy trên môi trường Ashby thạch đĩa, hình thái khuẩn lạc có đặc điểm như sau: khuẩn lạc màu trắng đục, tròn, mép đều, dày, không tiết sắc tố ra môi trường. Đường kính khuẩn lạc đạt 17 mm sau 4 ngày nuôi cấy. Trong điều kiện nuôi cấy lắc môi trường Ashby dịch thể, chủng N161 phát triển làm dịch nuôi cấy từ dạng lỏng chuyển sang dạng quánh sệt. Quan sát tiêu bản nhuộm chủng N161: bắt màu Gram âm, tế bào có hình que ngắn.



Hình 5: Chủng N161 trên môi trường thạch đĩa và ảnh chụp tiêu bản (x100)

Kết quả giải trình tự gen 16S rARN của chủng N161 được trình bày ở hình 6 và bảng 5.

Query	1	CCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGAGCACTTC	60
Sbjct	181723	CCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGAGCACTTC	181782
Query	61	GGTGCTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTAAGATCGGGATAA	120
Sbjct	181783	GGTGCTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTAAGATCGGGATAA	181842
Query	121	CTACCGGAAACGGTAGCTAAGACCGGATAGCTGGTTTCGGTGCATGCCGGAATCATGAAA	180
Sbjct	181843	CTACCGGAAACGGTAGCTAAGACCGGATAGCTGGTTTCGGTGCATGCCGGAATCATGAAA	181902
Query	181	CACGGGGCAACCTGTGGCTTACGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGCGGGGTAA	240
Sbjct	181903	CACGGGGCAACCTGTGGCTTACGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGCGGGGTAA	181962
Query	241	TGGCCCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT	300
Sbjct	181963	TGGCCCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT	182022
Query	301	GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGCAA	360
Sbjct	182023	GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGCAA	182082
Query	361	GCCTGACGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCA	420
Sbjct	182083	GCCTGACGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCA	182142
Query	421	AGGGAAGAATGTCGTGGAGAGTAACTGCTCTGCGAATGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCC	480
Sbjct	182143	AGGGAAGAATGTCGTGGAGAGTAACTGCTCTGCGAATGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCC	182202
Query	481	CGGCTAACTACGTGCCA 497	
Sbjct	182203	CGGCTAACTACGTGCCA 182219	

Hình 6: Trình tự nucleotide đoạn gen 16S rARN của chủng N161

Qua kết quả nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng N161 tương đồng 100% với trình tự đoạn gen 16S rRNA ở chủng *Paenibacillus mucilaginosus* KNP414, CP002869.1 cũng như chủng *Paenibacillus mucilaginosus* VKPM B-7519, NR 116536.1. Chủng N161 được xếp vào chi *Paenibacillus*, loài *Paenibacillus mucilaginosus*.

Bảng 5

Đánh giá mức độ tương đồng trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng N161

Tên loài	Tên chủng	Mã số truy cập	Độ tương đồng (%)
<i>Paenibacillus mucilaginosus</i>	KNP414	CP002869.1	100
<i>Paenibacillus mucilaginosus</i>	VKPM B-7519	NR 116536.1	100

III. KẾT LUẬN

1. Số lượng vi khuẩn cố định N trong các mẫu đất dao động trong khoảng $0,11 \times 10^6$ - $22,95 \times 10^6$ CFU/g đất khô. Tuyển chọn được 02 chủng vi khuẩn cố định N mạnh là N49, N161:

- Chủng N49: đường kính khuẩn lạc 18 mm, sinh khối khô 29,42 mg/mL, hàm lượng N-NH₄⁺ tích lũy là 33,6 mg/L.

- Chủng N161: đường kính khuẩn lạc 17 mm, sinh khối khô 37,45 mg/mL, hàm lượng N-NH₄⁺ tích lũy là 43,41 mg/L.

2. Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA: Chủng N49 là *Stenotrophomonas maltophilia* và chủng N161 là *Paenibacillus mucilaginosus*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Phạm Thị Ngọc Lan.**, 2012. *Thực tập Vi sinh vật học*. Nxb.. Đại học Huế.
2. **Phạm Thị Ngọc Lan, Trương Văn Lung.**, 1999. Bước đầu nghiên cứu vi khuẩn *Azotobacter* trong đất vùng gò đồi tỉnh Thừa Thiên - Huế, *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, Nxb. Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, tr. 406-410.
3. **Đỗ Kim Nhung, Vũ Thành Công.**, 2011. “Khảo sát khả năng sinh tổng hợp IAA và cố định đạm của vi khuẩn *Gluconacetobacter* sp. và *Azospirillum* sp. được phân lập từ cây mía”. *Tạp chí Khoa học*. Đại học Cần Thơ, tr. 161-167.
4. **Đỗ Hoàn Quân.**, 2011. *Phân lập, tuyển chọn và nghiên cứu các đặc tính tăng trưởng, cố định đạm của VK Azotobacter - thử nghiệm trên cây trồng*, Luận văn Thạc sỹ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên. Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh.
5. **Lê Thị Hương Xuân, Phạm Thị Ngọc Lan.**, 2005. Tìm hiểu vi khuẩn cố định nitơ sống tự do trong đất canh tác bạc màu ở Thừa Thiên - Huế, *Báo cáo khoa học hội thảo toàn quốc Đa dạng Sinh học Việt Nam*, Hà Nội, tr.120-125.
6. **Kamlesh Kukreja, Sunita Suneja, Sneha Goyal and Neeni Narula.**, 2004. Phytohormone production by *Azotobacter*- A review, *Agric. Rev.*, 25(1): 70-75.

ISOLATION AND SELECTION OF NITROGEN FIXING BACTERIA FROM SOILS CULTIVATED WITH VEGETABLES IN THUA THIEN-HUE

Pham Thi Ngoc Lan, Nguyen Thi Viet, Le Thi Hoa Sen

SUMMARY

For the basis of biological products contribute to increasing stability and effective use of microbial organic fertilizer for soil area of vegetables cultivation, in order to improve vegetable production, green economic development and keep ecological environment unshakeable, strains of nitrogen fixing bacteria were isolated and selected. The research results showed that the number of bacteria in soil samples of vegetables garden was rather high, from 0.66×10^6 to 26.34×10^6 CFU/ g. There were 199 strains of nitrogen fixing bacteria isolated, and two strains N49 and N161 with strong nitrogen fixation were chosen. The results of DNA sequencing indicated that strain N49 was *Stenotrophomonas maltophilia* and strain N161 was *Paenibacillus mucilaginosus*.