

SELECTION OF ENDOPHYTIC MICROORGANISMS FROM SOME INDIGENOUS PLANTS IN COASTAL AREA

Nguyen Thi Tam Thu^{1*}, Bui Thi Thu Ha¹, Nghiem Ngoc Hoa¹,
Nguyen Ha Trung¹, Nguyen Thi Kim Linh², Pham Kien Cuong¹

¹Institute of New Technology - Academy of Military Science and Technology

²Northern Mountainous Agriculture and Forestry Science Institute

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 08/01/2025	Microbial fertilizers have the advantage of helping plants adapt quickly during the transition to the nursery, increasing crop productivity and being environmentally friendly. Endophytic microorganisms from coastal plants can be suitable as microbial fertilizers for salt-affected soils. This study presents the results of isolating and screening endophytic microbial strains beneficial to plant growth from the Banyan tree and Tra tree in Navy Zone 4. Bacterial strains were screened through evaluating the ability to produce IAA, synthesize NH_4^+ , solubilize inorganic phosphorus and the ability to tolerate salt. Among the endophytic microbial strains isolated on LB nutrient medium, 3 strains were screened that produced extracellular enzymes with strong phosphate-solubilizing activity, 2 strains that produced IAA (indole acetic acid) - a plant growth stimulant chemical and 4 strains that were capable of synthesizing NH_4^+ . Rhizobial endophytes show potential for using in the development of new products to promote plant growth, potentially replacing chemical fertilizers.
Revised: 27/3/2025	
Published: 28/3/2025	
KEYWORDS	
Endophytic microorganisms	
Plant growth	
IAA	
Synthesize NH_4^+	
Decompose inorganic phosphate	

TUYỂN CHỌN VI SINH VẬT NỘI SINH TỪ MỘT SỐ CÂY BẢN ĐỊA THUỘC VÙNG VEN BIỂN

Nguyễn Thị Tâm Thu^{1*}, Bùi Thị Thu Hà¹, NghiêM Ngọc Hoa¹,
Nguyễn Hà Trung¹, Nguyễn Thị Kim Linh², Phạm Kiên Cường¹

¹Viện Công nghệ mới - Viện Khoa học và Công nghệ quân sự

²Viện Khoa học kỹ thuật Nông lâm nghiệp miền núi phía Bắc

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 08/01/2025	Phân bón vi sinh có ưu điểm giúp cây trồng thích nghi nhanh trong giai đoạn chuyển ra vườn ươm, tăng năng suất cây trồng và thân thiện với môi trường. Các vi sinh vật nội sinh từ các cây vùng ven biển có thể phù hợp làm phân bón vi sinh cho các vùng đất chịu mặn, nhiễm mặn. Nghiên cứu này trình bày kết quả phân lập và sàng lọc các chủng vi sinh vật nội sinh có lợi cho sinh trưởng của thực vật từ cây bàng vuông và cây Tra thuộc vùng 4 Hải quân. Các chủng vi khuẩn được sàng lọc thông qua đánh giá khả năng sinh IAA, tổng hợp NH_4^+ , phân giải lân vô cơ và khả năng chịu mặn. Trong số các chủng vi sinh vật nội sinh phân lập trên môi trường dinh dưỡng LB, đã sàng lọc được 3 chủng sinh enzym ngoại bào có hoạt tính phân giải lân mạnh, 2 chủng sinh IAA (axit indole axetic) chất kích thích sinh trưởng cây trồng và 4 chủng có khả năng tổng hợp NH_4^+ . Các vi khuẩn nội sinh rẽ cho thấy tiềm năng được sử dụng trong việc phát triển các sản phẩm mới để thúc đẩy tăng trưởng thực vật, có tiềm năng thay thế phân bón hóa học.
Ngày hoàn thiện: 27/3/2025	
Ngày đăng: 28/3/2025	
TỪ KHÓA	
Vi khuẩn nội sinh	
Tăng trưởng thực vật	
IAA	
Cố định đạm	
Phân giải lân	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.11836>

* Corresponding author. Email: thu.3t.cnm@gmail.com

1. Mở đầu

Vi khuẩn nội sinh trong các mô của thực vật được biết như tác nhân kích thích sinh trưởng cây trồng. Các vi khuẩn nội sinh tiết enzyme chuyển hóa các hợp chất khó tan trong đất về dạng hòa tan giúp cây dễ hấp thu; giúp cây tự cố định đạm hay tổng hợp các chất kích thích sinh trưởng ở mức cần thiết. Gần đây, việc sử dụng chế phẩm từ vi khuẩn nội sinh để thúc đẩy tăng trưởng thực vật đã chứng minh hiệu quả trong việc cải thiện các đặc tính tăng trưởng của thực vật [1]-[3]. Các vi khuẩn gián tiếp hoặc trực tiếp thúc đẩy tăng trưởng thực vật thông qua quá trình cố định nitơ, tiết enzyme phân giải phosphat khó tan trong đất, tiết các phytohormone như axit indole axetic (IAA), cytokinin và gibberellin [1], hỗ trợ thực vật tiếp nhận nguồn đạm, lân, khoáng chất cần thiết. Nhiều kết quả nghiên cứu cho thấy vi khuẩn nội sinh thúc đẩy sinh trưởng và năng suất trên cây ớt ngọt [2], cà chua [3], cây khoai tây [4], cây lúa, cây nghệ, cây bưởi [7]-[9] và tăng enzyme bảo vệ ở lúa mì [5].

Tác động của biến đổi khí hậu ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng và năng suất cây trồng, một số diện tích đất ở một số vùng trồng cây ăn quả bị xâm nhập mặn ngày càng tăng, một số nơi ven biển xảy ra hiện tượng sa mạc hóa cục bộ làm cho đất cằn cỗi, cây không hấp thụ được chất dinh dưỡng. Đặc biệt ở đảo Trường Sa, đất bị san hô hóa và bị nhiễm mặn do sóng gió làm nước biển tràn vào đất trồng. Việc sử dụng nhiều phân bón hóa học gây hậu quả ô nhiễm đất và nguồn nước. Đã có những nghiên cứu về vai trò của vi khuẩn nội sinh trong việc cải tạo đất, kích thích sinh trưởng của thực vật [6], [7], [10], [11]. Nghiên cứu bổ sung chế phẩm sinh học từ vi khuẩn nội sinh đáp ứng môi trường khắc nghiệt về pH, độ mặn, nhiệt độ, sự sa mạc hóa đất trồng giúp tăng khả năng thích nghi của thực vật với các điều kiện môi trường đã được công bố khá nhiều với các đối tượng khác nhau [6], [7], [11], [12]. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào về các vi sinh vật nội sinh từ các thực vật chịu mặn, chịu hạn để ứng dụng cho các vùng sinh thái có độ mặn cao (rừng ngập mặn, vùng đất trồng bị xâm ngập mặn hay các cây vùng ven biển, hải đảo). Do đó, nghiên cứu này phân lập và đánh giá khả năng phân hủy photphat khó tan, khả năng cố định đạm cũng như tạo ra chất kích thích sinh trưởng IAA của các vi sinh vật nội sinh từ các cây bản địa chịu mặn chịu hạn (cây Bàng vuông, cây Tra là các cây đặc trưng ở đảo Trường Sa, có khả năng sống trên đất nhiễm mặn và nhiệt độ cao của đảo) với mục đích tạo ra chế phẩm sinh học cải tạo đất nhiễm mặn vùng ven biển, hải đảo.

2. Nguyên vật liệu và phương pháp

2.1. Nguyên vật liệu

Mẫu thân, rễ của cây Bàng vuông, cây Tra được lấy từ vùng 4 Hải quân (Cam Ranh, Khánh Hòa), bảo quản trong túi zip, để mát ở 4 °C đến khi sử dụng.

Môi trường sử dụng cho phân lập và nuôi cấy vi sinh vật bao gồm: Môi trường thạch dinh dưỡng LB để phân lập các vi sinh vật nội sinh (g/l): Pepton: 10; Cao nấm men: 5; NaCl: 5; agar: 20 [6]. Môi trường sinh tổng hợp IAA: môi trường LB bổ sung 1 g/l Tryptophan. Môi trường Burk (g/l): Glucose: 10; KH_2PO_4 : 0,41; K_2HPO_4 : 0,52; Na_2SO_4 : 0,05; CaCl_2 : 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,005; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,0025. Môi trường NBRIP (g/l): Glucose: 10; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: 5; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,25; KCl: 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 0,1.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phân lập

Mẫu thân, rễ cây Tra, cây Bàng vuông sau khi thu thập được rửa dưới vòi nước chảy để làm sạch đất bám trên bề mặt. Mẫu được cắt thành các đoạn nhỏ 1 cm và được ngâm trong dung dịch karbedazin 2% để loại bỏ nấm mốc, rửa lại bằng nước vô trùng và tiến hành khử trùng bằng dung dịch HgCl_2 0,1% trong 10 phút, rửa mẫu 3 lần bằng nước cất vô trùng mỗi lần 3 phút, ngâm mẫu trong ethanol 70° trong khoảng 1 phút, rửa mẫu 3 lần bằng nước cất vô trùng. Kiểm tra mẫu sau

khí khử trùng bằng cách lấy 0,1 ml dịch rửa cuối cấy trên đĩa petri có môi trường LB, ủ đĩa ở 30 °C trong 48 giờ, quan sát sự phát triển của vi sinh vật. Nếu không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm chứng tỏ đã loại hoàn toàn vi sinh vật trên bề mặt rễ. Mẫu thân, rễ sau khử trùng ở trên được nghiền trong cối sứ vô trùng với 1 ml nước cất vô trùng, thu dịch và cấy trên môi trường thạch LB để phân lập vi khuẩn nội sinh [7].

2.2.2. Khảo sát đặc tính sinh học của các chủng vi khuẩn

- Đánh giá khả năng phân giải photphat khó tan: Các chủng vi khuẩn được cấy trên môi trường NBRIP [8] chứa $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ là hợp chất photphat khó tan, độ tan là 1,2 mg/L. Để chọn lọc các chủng có hoạt tính, nuôi cấy các chủng trên thạch đĩa có chứa môi trường NBRIP, chủng có hoạt tính phân hủy photphat khó tan sẽ tạo vòng phân giải (vùng sáng) trên đĩa thạch [9]. Để xác định khả năng tạo thành photphat dễ tan, các chủng được nuôi cấy lắc 150 vòng/phút ở 30 °C trong 3 ngày, lấy dịch nuôi cấy ly tâm bỏ sinh khối và phần dịch lọc dùng để xác định lượng photphat hòa tan (PO_4^{3-}). Định lượng photphat hòa tan bằng thuốc thử axit ascorbic-ammonimolipdate-potassium antinomol tartarate [10], so sánh với đường chuẩn, so màu ở bước sóng 700 nm.

- Đánh giá khả năng tổng hợp NH_4^+ (cổ định đạm): Các chủng nuôi trong môi trường dịch thể Burk không chứa N. Tiến hành nuôi cấy lắc 150 vòng/phút trong 3 ngày ở 30 °C, sau đó thu dịch nuôi, ly tâm lấy dịch trong để phân tích hàm lượng NH_4^+ tạo thành. Hàm lượng NH_4^+ trong dịch nuôi được xác định bằng cách tạo màu với thuốc thử Nessler [11], so màu ở bước sóng 640 nm và tính toán theo đường chuẩn.

- Đánh giá khả năng sinh tổng hợp hormone sinh trưởng indol-3-acetic acid (IAA): Các vi khuẩn được nuôi trong môi trường bổ sung 0,1% tryptophan ở điều kiện lắc 150 vòng/phút ở 30 °C trong 3 ngày. Dịch nuôi được ly tâm loại bỏ sinh khối, phần dịch trong được sử dụng để định lượng IAA sinh ra bằng thuốc thử Salkowski [11], so màu ở bước sóng 530 nm và tính toán theo đường chuẩn.

- Đánh giá khả năng chịu mặn của các chủng: Các chủng được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung NaCl từ 2-4%. Đánh giá khả năng chịu mặn của các chủng thông qua khả năng sinh trưởng bằng phương pháp đo độ đục ở bước sóng 600 nm [10] sau 4 ngày nuôi cấy.

2.2.3. Định danh chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi cấy trên môi trường thạch LB để quan sát hình thái khuẩn lạc sau 48 giờ, đồng thời lấy sinh khối làm tiêu bản nhuộm Gram quan sát hình thái tế bào, tách DNA tổng số theo kit Genomic DNA extraction. DNA tổng số được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% trong đệm TAE 1X. Các đoạn DNA tổng số đủ điều kiện được sử dụng làm khuôn để nhân đoạn gen 16S rRNA. Thành phần phản ứng PCR (μl): ADN tổng số 1; Mastermix 2x 12,5; Primer 27f (AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG) và 1492R (GGTTACCTTGTTACGA CTT) 1/1; dH_2O 9,5. Chu trình nhiệt của phản ứng nhân đoạn gen 16S rRNA (khoảng 1.500 bp) như sau: 95 °C - 10 phút; 35 chu kỳ (95 °C - 1 phút, 55 °C - 1 phút, 72 °C - 2 phút), 72 °C - 7 phút; giữ nhiệt độ ở 4 °C sau khi phản ứng kết thúc. Các sản phẩm PCR được làm sạch bằng kit làm sạch RNA và gửi đi giải trình tự trên hệ thống Illumina. Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự các chủng tương đồng trên ngân hàng dữ liệu gen bằng công cụ Nucleotide BLAST, sử dụng phần mềm Clustal W để xây dựng cây phát sinh chủng loại. Các chủng được đăng ký mã số trên ngân hàng gen NCBI.

3. Kết quả

3.1. Một số đặc điểm của các chủng vi khuẩn phân lập được

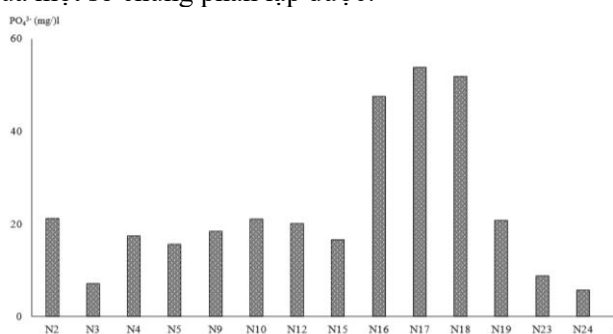
Từ các mẫu thân, rễ cây Tra, cây Bàng vuông ở Vùng 4 Hải quân đã phân lập được 25 chủng vi khuẩn nội sinh có hình thái, kích thước khuẩn lạc khác nhau. Các chủng có hình dạng khuẩn lạc và màu sắc đa dạng. Chủng vi khuẩn Gram âm chiếm 24% (6/25 chủng), chủng Gram dương chiếm 76% (19/25 chủng). Kết quả cho thấy các chủng vi khuẩn nội sinh từ các mẫu thân, rễ của cây Bàng

vuông và cây Tra thuộc Vùng 4 Hải quân khá đa dạng và hầu hết thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương. Các chủng phân lập được có khuẩn lạc dạng tròn, màu kem, trắng chiếm đa số. Các chủng có khả năng tạo ra các chất kích thích sinh trưởng như IAA, khả năng phân giải photphat khó tan hay tổng hợp amoni để cải tạo đất như thế nào được nghiên cứu tiếp.

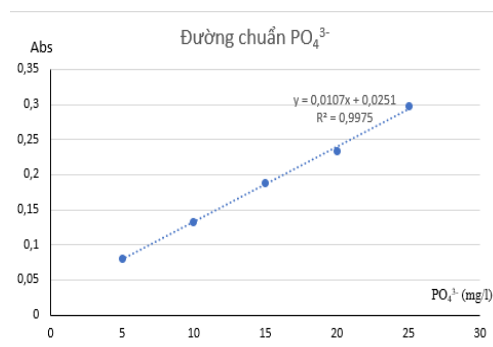
3.2. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn phân lập được

3.2.1. Khả năng phân giải photphat khó tan

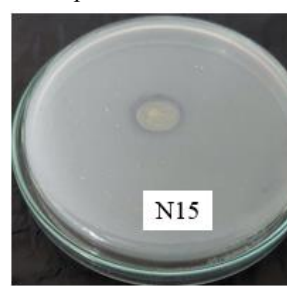
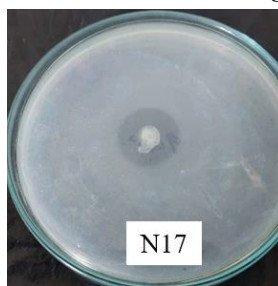
Khả năng phân giải photphat khó tan là một đặc tính quan trọng của vi khuẩn giúp tăng trưởng thực vật do tăng cường nguồn dinh dưỡng cho cây trồng. Tiến hành sàng lọc 25 chủng phân lập được trên môi trường NBRIP thạch đĩa, các chủng tạo vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc được tiếp tục đánh giá hoạt tính trong môi trường dịch thể NBRIP thông qua lượng PO_4^{3-} tạo thành trong dung dịch [8]. Trong số 25 chủng vi khuẩn phân lập được có 15 chủng có hoạt tính phân giải photphat khó tan với hàm lượng PO_4^{3-} tạo thành khác nhau sau 3 ngày nuôi cấy (Hình 1). Trong 15 chủng phân giải P khó tan được chia thành 3 nhóm rõ rệt: 3 chủng có hoạt tính cao > 40 mg/L (chiếm 20%); 9 chủng có hoạt tính trung bình 10 - 20 mg/L (chiếm 60%) và 3 chủng có hoạt tính thấp < 10 mg/L (chiếm 20%). Các chủng có hoạt tính cao nhất gồm chủng N17, N18 và N16 với hàm lượng photphat hòa tan tương ứng 53,8; 51,9 và 47,5 mg/L (tính theo đường chuẩn với phương trình $y = 0,0107x + 0,0251$ với $R^2 = 0,9975$, Hình 2). Kết quả này cho thấy chủng N16, N17 và N18 có khả năng phân giải photphat khó tan cao hơn nhiều lần so với các chủng phân lập từ rễ cây hồ tiêu là 3,59 mg/L [11] và cây được liệu [12]. Hình 3 thể hiện hoạt tính phân giải photphat khó tan của một số chủng phân lập được.



Hình 1. Khả năng phân giải P khó tan



Hình 2. Đường chuẩn phân tích PO_4^{3-}

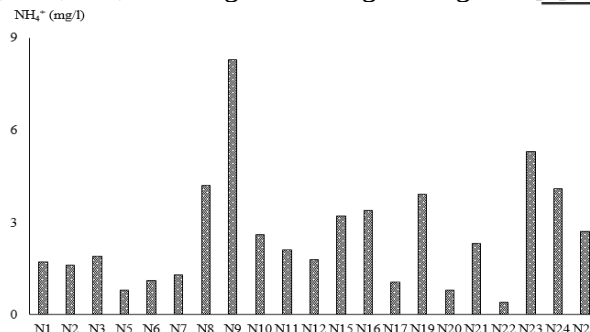


Hình 3. Khả năng tạo vòng phân giải photphat khó tan của một số chủng

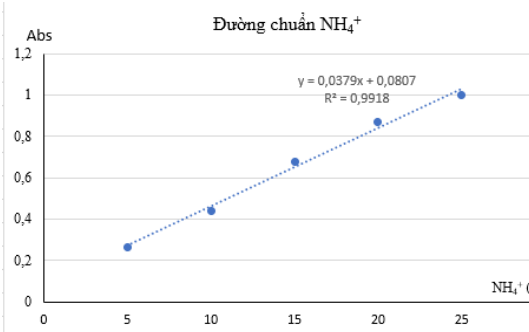
3.2.2. Khả năng cố định đạm

Vi khuẩn có khả năng cố định đạm là vi khuẩn có thể phát triển trên môi trường không chứa nitơ (môi trường Burk) thạch đĩa. Các chủng này được đánh giá hoạt tính tổng hợp NH_4^+ bằng cách nuôi cấy dạng dịch thể trong môi trường Burk và đo lượng NH_4^+ tạo thành. Trong 25 chủng phân lập được có 21 chủng sinh tổng hợp NH_4^+ (Hình 4) với hàm lượng khác nhau (chiếm 84%). Hàm lượng NH_4^+ trong dịch nuôi sau 3 ngày được xác định thông qua đường chuẩn sử dụng chất chuẩn

là NH_4Cl (Merck) với dải nồng độ là 5, 10, 15, 20, 25 mg/L. Phương trình đường chuẩn $y = 0,0379x + 0,0807$, $R^2 = 0,9918$ (Hình 5). Có 7/21 chủng có hoạt tính sinh tổng hợp $\text{NH}_4^+ > 3,2$ mg/L (chiếm 33%), tương đồng với kết quả nghiên cứu của 28 chủng phân lập từ rễ khoai tây với khả năng cố định đạm đạt 3,59 mg/L của tác giả Hồng Vân [4].



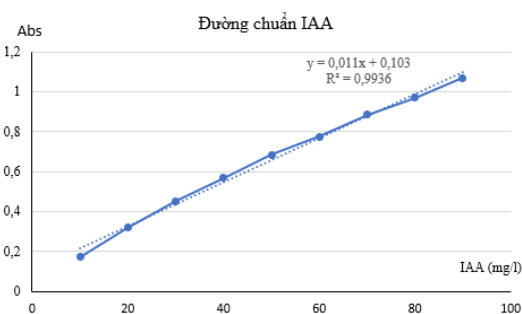
Hình 4. Khả năng sinh tổng hợp NH_4^+



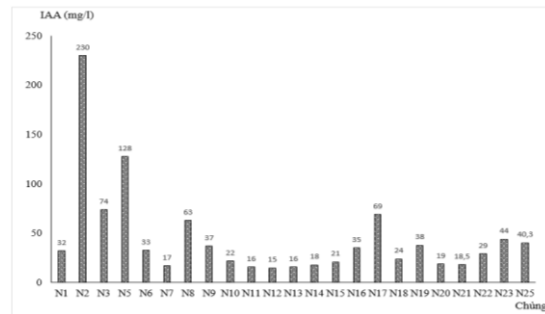
Hình 5. Đường chuẩn phân tích NH_4^+

Các chủng vi khuẩn N8, N9, N19, N23 và N24 là các chủng có hoạt tính tổng hợp NH_4^+ trên 4,1 mg/L (chiếm 24%), cao hơn so với kết quả nghiên cứu của chủng phân lập từ rễ khoai tây [4] và cũng là các chủng có khả năng phân hủy photphat khó tan. Trong số đó, chủng N9 là chủng có hoạt tính sinh tổng hợp NH_4^+ cao nhất (8,3 mg/L). Hàm lượng NH_4^+ tạo thành là chưa cao so với lượng NH_4^+ cần cung cấp cho cây sinh trưởng. Tuy nhiên, khả năng cố định đạm này của các chủng trong môi trường không chứa nitơ nhưng trong đất luôn có một nguồn nitơ nhất định (có thể không phải ở dạng NH_4^+ dễ hấp thu). Vì vậy, khả năng cố định đạm và chuyển hóa thành dạng NH_4^+ cho cây sinh trưởng của các vi sinh vật này sẽ cao hơn, có hiệu quả kích thích thực vật phát triển.

3.2.3. Khả năng sinh tổng hợp IAA



Hình 6. Đường chuẩn phân tích IAA



Hình 7. Khả năng sinh tổng hợp IAA

IAA là hormone sinh trưởng ở thực vật thuộc nhóm auxin, có vai trò kích thích sinh trưởng thực vật bằng cách thúc đẩy tăng trưởng chiều dài rễ và số lượng rễ [13]. Hàm lượng IAA trong dịch nuôi được xác định thông qua đường chuẩn sử dụng chất chuẩn là IAA (Merck) với dải nồng độ là 10, 20, 30 40, 50, và 90 mg/L. Phương trình đường chuẩn $y = 0,011x + 0,103$, $R^2 = 0,9936$ (Hình 6). Kết quả sàng lọc cho thấy có 23/25 chủng có khả năng tổng hợp IAA. Lượng IAA của các chủng sinh tổng hợp trong môi trường có bổ sung tryptophan với nồng độ 0,1% đạt trong khoảng 14,7 - 230,8 mg/L. Nồng độ IAA cao nhất ở chủng N2 với hàm lượng 230 mg/L, tiếp đến là chủng N5 với 128 mg/L, chủng N3, N8, N17 có khả năng tổng hợp IAA với mức độ tương tự nhau sau 3 ngày nuôi cấy, dao động trong khoảng 63 - 74 mg/L IAA (Hình 7). Đây là các chủng có khả năng sinh tổng hợp IAA khá cao so với các nghiên cứu trước đây [7]-[9]. Chủng N2 và N5 là 2 chủng có khả năng sinh tổng hợp IAA cao so với các chủng vi khuẩn nội sinh đã được nghiên cứu như chủng *K. cryocrescens* tổng hợp IAA cao nhất là 97,71 mg/L phân lập từ cây sù [14], chủng Burk 5 tổng hợp IAA đạt 98,54 mg/l được phân lập từ cây dứa [15], chủng Av30 là 60 mg/L phân lập từ cây được liệu [12].

Như vậy, các chủng có hoạt tính sinh IAA, phân giải P và cố định đạm cao nhất được lựa chọn gồm các chủng trên Bảng 1, trong đó những chủng có đa hoạt tính được lựa chọn gồm 4 chủng có cả 3 hoạt tính, chủng N8 có hoạt tính sinh tổng hợp IAA và NH_4^+ . Đánh giá khả năng chịu mặn của các chủng thông qua khả năng sinh trưởng (dựa vào kết quả đo độ đục $\text{OD}_{600\text{nm}}$) [10] cho thấy các chủng lựa chọn đều có khả năng sinh trưởng ở nồng độ NaCl từ 20 đến 40 g/l trong đó sinh trưởng tốt nhất ở nồng độ 20-25 g NaCl/lít. Các chủng này có tiềm năng ứng dụng cho tạo chế phẩm kích thích sinh học cho các cây vùng đất nhiễm mặn, chịu mặn. Dựa trên kết quả tổng hợp các hoạt tính, 5 chủng N2, N5, N8, N9, N17 được lựa chọn để phân loại bằng giải trình tự đoạn gen 16S rRNA.

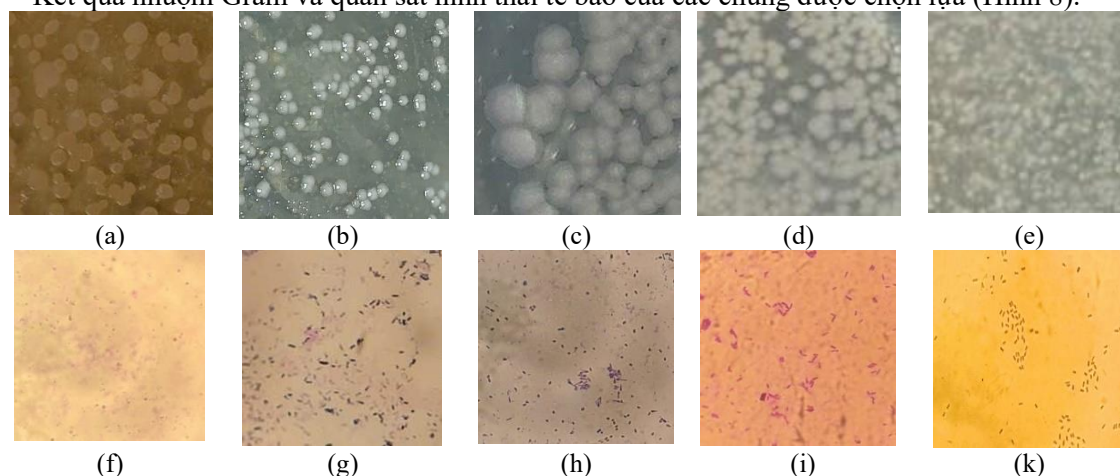
Bảng 1. Khả năng sinh trưởng và hoạt tính của các chủng phân lập được

Ký hiệu chủng	Hoạt tính (mg/L)			Khả năng sinh trưởng với các nồng độ NaCl (Đo $\text{OD}_{600\text{nm}}$)				
	Sinh tổng hợp IAA	Sinh tổng hợp NH_4^+	Hoạt tính phân giải P	NaCl (20 g/L)	NaCl (25 g/L)	NaCl (30 g/L)	NaCl (35 g/L)	NaCl (40 g/L)
N2	230,8 ± 1,25	1,6 ± 0,011	21,3 ± 1,24	2,42 ± 0,014	2,44 ± 0,014	2,05 ± 0,01	2,09 ± 0,012	1,94 ± 0,016
N5	128,1 ± 2,22	0,8 ± 0,008	15,6 ± 0,21	1,81 ± 0,012	1,86 ± 0,015	1,82 ± 0,012	1,83 ± 0,015	1,72 ± 0,018
N8	63 ± 1,31	4,2 ± 0,011	-	2,45 ± 0,019	2,46 ± 0,012	2,31 ± 0,011	2,10 ± 0,018	2,04 ± 0,019
N9	37 ± 1,34	8,3 ± 0,01	18,45 ± 0,19	1,62 ± 0,011	1,87 ± 0,013	1,76 ± 0,015	1,71 ± 0,01	1,60 ± 0,012
N16	35 ± 1,27	3,4 ± 0,012	47,5 ± 0,23	1,36 ± 0,013	1,42 ± 0,008	1,18 ± 0,013	1,15 ± 0,014	1,02 ± 0,013
N17	69 ± 1,25	1,05 ± 0,014	53,8 ± 0,18	2,37 ± 0,018	2,48 ± 0,011	2,26 ± 0,021	2,29 ± 0,016	2,04 ± 0,017
N18	24 ± 1,09	-	51,9 ± 0,28	1,10 ± 0,017	1,43 ± 0,014	1,78 ± 0,024	1,69 ± 0,012	1,49 ± 0,014
N19	38 ± 1,12	3,9 ± 0,018	20,8 ± 0,24	1,25 ± 0,011	1,32 ± 0,012	1,21 ± 0,014	1,11 ± 0,011	0,98 ± 0,013
N23	44 ± 1,18	5,3 ± 0,016	8,8 ± 0,11	1,35 ± 0,011	1,32 ± 0,009	1,19 ± 0,011	1,08 ± 0,012	0,92 ± 0,014
N24	-	4,1 ± 0,013	5,8 ± 0,15	1,48 ± 0,012	1,45 ± 0,011	1,31 ± 0,01	1,22 ± 0,011	1,14 ± 0,012

Ghi chú: (-) không có hoạt tính

3.3. Định danh một số chủng vi khuẩn

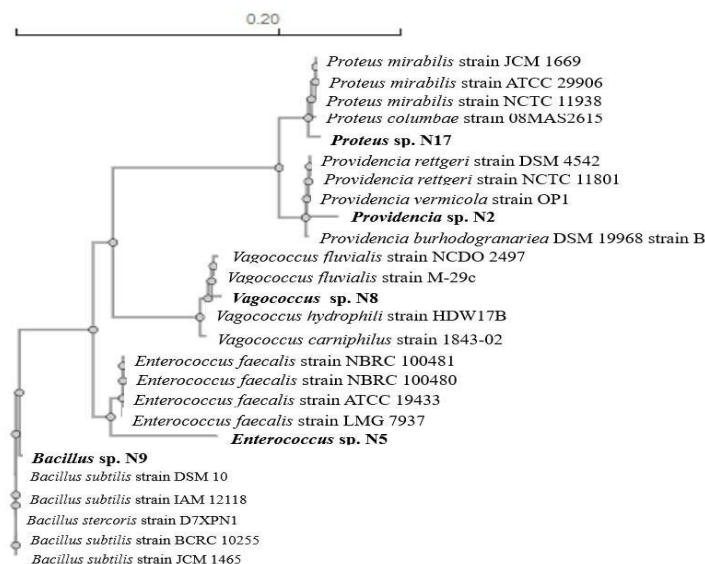
Kết quả nhuộm Gram và quan sát hình thái tế bào của các chủng được chọn lựa (Hình 8).



Hình 8. Hình thái khuẩn lạc và nhuộm Gram chủng N2 (a, f), chủng N5 (b, g), chủng N8 (c, h), chủng N9 (d, i), chủng N17 (e, k)

Việc định danh các chủng dựa vào kết quả nhuộm Gram, quan sát hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào kết hợp với giải trình tự đoạn gen 16S rRNA. Sau khi giải trình tự đoạn gen 16S rRNA, so sánh trên ngân hàng gen NCBI bằng công cụ Blast cho thấy kết quả trình tự đoạn gen 16S rRNA của 5 chủng lựa chọn thuộc 5 chi khác nhau với độ tương đồng với các chủng đã công bố không cao, chỉ đạt 89-98%. Chủng N2 tương đồng trên 96% với các chủng thuộc chi *Providencia* nên được đặt tên là *Providencia* sp. N2, với mã số đăng ký trên Genbank là PQ219506. Chủng N5 tương đồng trên 89% với các chủng thuộc chi *Enterococcus* nên được đặt tên là *Enterococcus* sp. N5, với mã số đăng ký trên Genbank là PQ219504. Chủng N8 tương đồng trên 97% với các chủng thuộc chi *Vagococcus* nên được đặt tên là *Vagococcus* sp. N8, với mã số đăng ký trên Genbank là

PQ219517. Chủng N9 tương đồng trên 98% với các chủng thuộc chi *Bacillus* nên được đặt tên là *Bacillus* sp. N9, với mã số đăng ký trên Genbank là PQ219502. Chủng N17 tương đồng trên 98% với các chủng thuộc chi *Proteus* nên được đặt tên là *Proteus* sp. N17, với mã số đăng ký trên Genbank là PQ219516. Cây phát sinh chủng loại của các chủng phân lập được và các chủng liên quan gần gũi được trình bày trên Hình 9.



Hình 9. Cây phát sinh chủng loại của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Các chủng phân lập được trong nghiên cứu này tương đồng với các chủng vi khuẩn điển hình ở vùng rễ trong các nghiên cứu trước đây như *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas putida*, *Proteus vulgaris*, *Providencia rettgeri*, *Serratia marcescens* và *Myroides* sp., trong đó chủng *Providencia* sp. và *Myroides* sp. sản xuất IAA ở nồng độ cao nhất [16], *Bacillus* sp., *Vagococcus* sp. [15]. Các thông số sinh lý của cây ớt ngọt *Capsicum annum* được cải thiện đánh kể khi bổ sung vi khuẩn nội sinh [2]. 5 chủng *Proteus mirabilis* được phân lập từ cây cà chua làm gia tăng đáng kể sinh khối rễ, thân và năng suất của cây [3]. Chủng *Providencia* sp. AW5 sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp với chủng *Bacillus* sp. AW1 và *Brevundimonas* sp. AW7 hỗ trợ tăng cường tổng hợp các enzyme bảo vệ cây lúa mì ở điều kiện trên đồng ruộng [5]. Chủng *Bacillus tequilensis* GYLH001 giúp kiểm soát bệnh ở lúa [17]. Kết quả sàng lọc và định danh cho thấy các vi khuẩn nội sinh có tiềm năng kích thích sinh trưởng, tăng sinh khối của thực vật, đáp ứng tiêu chí làm phân bón sinh học.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập được 25 chủng vi khuẩn nội sinh từ thân, rễ cây Tra, cây Bàng vuông thuộc vùng 4 Hải quân. Các chủng được đánh giá khả năng phân giải photphat khó tan, cố định đạm và sinh tổng hợp IAA. Các chủng có đồng thời các hoạt tính tăng trưởng thực vật, phân giải photphat khó tan và cố định đạm được định danh và đăng ký mã số trên Genbank. Các chủng được đặt tên là *Providencia* sp. N2, *Enterococcus* sp. N5, *Vagococcus* sp. N8, *Bacillus* sp. N9 và *Proteus* sp. N17 với các mã số tương ứng là PQ219506, PQ219504, PQ219517, PQ219502, PQ219516. Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng sử dụng các vi khuẩn nội sinh làm chế phẩm kích thích sinh trưởng của cây trồng, tăng khả năng thích nghi, cải thiện năng suất cây trồng và làm phân sinh học cải tạo những vùng đất nghèo dinh dưỡng. Cần tiếp tục nghiên cứu để tạo ra các dạng phân bón sinh học phù hợp với những vùng đất ven biển và hải đảo.

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ về kinh phí của Đề tài cấp Viện Công nghệ mới: “Nghiên cứu thăm dò công nghệ nhân giống in vitro cây Bàng vuông (*Barringtonia asiatica*)”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/REFERENCES

- [1] K. B. Kuan, R. Othman, K. A. Rahim, and Z. H. Shamsuddin, "Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of Maize under greenhouse conditions," *PLOS One*, vol. 11, no. 3, pp. 23-29, 2016.
- [2] L. Shen, Y. Nishimura, F. Matsuda, J. Ishii, and A. Kondo, "Overexpressing enzymes of the Ehrlich pathway and deleting genes of the competing pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing 2-phenylethanol production from glucose," *J. Biosci. Bioengin.*, vol. 122, no. 1, pp. 34-39, 2016.
- [3] M. Suleman, S. Yasmin, M. Rasul, M. Yahya, B. M. Atta, and M. S. Mirza, "Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat," *PLOS One*, vol. 13, no. 9, pp. 1-28, 2018.
- [4] R. Backer, J. S. Rokem, G. Ilangumaran, J. Lamont, D. Praslickova, E. Ricci, S. Subramanian, and D. L. Smith, "Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture," *Front Plant Sci.*, vol. 9, pp. 1473-1479, 2018.
- [5] A. Natarajan, V. Jayakumar, K. Kumar, and N. Thajuddin, "Plant growth-promoting effects of *Proteus mirabilis* isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) plants," *National Academy Science Letters*, vol. 44, no. 5, pp. 453-455, 2021.
- [6] V. H. T. Dao, K. P. Do, H. V. Nguyen, C. M. Nguyen, D. T. T. Tran, T. T. T. Dang, T. X. Nguyen, and S. T. Dinh, "Identification and Evaluation of the Growth Promotion of Endophytic Bacteria on in vitro Potato Plants," *Pak J. Biol. Sci.*, vol. 26, no. 7, pp. 371-379, 2021.
- [7] H. V. Tran, T. V. Le, L. V. Nguyen, N. T. Nguyen, T. T. T. Ha, and Q. T. N. Nguyen, "Bio-characteristics and development of potential fungus species *Paecilomyces ciadae* in controlling of *Casidae* damaging coffee," *Vietnam Journal of Agricultural Science and Technology*, vol. 9, no. 82, pp. 76-81, 2017.
- [8] T. T. T. Hoang, N. D. Nguyen, L. N. T. Nguyen, H. M. Tu, and P. T. X. Tran, "Isolation and selection of endophytic bacteria strain on rice in Thua Thien Hue," *HUAF Journal of Agricultural Science and Technology*, vol. 6, no. 1, pp. 2859-2870, 2022.
- [9] H. T. T. Nguyen, T. Q. Do, and T. T. Tran, "Antagonistic and plant growth-promoting effects of endophytic bacteria isolated from pomelo trees," *Journal of Forestry Science and Technology*, vol. 4, pp. 22-29, 2022.
- [10] R. Anuj, B. Saharan, S. R. Kabi, R. Prasanna, and L. Nain, "*Providencia*, a PGPR with biocontrol potential elicits defense enzymes in wheat," *Ann. Pl. Protec. Sci.*, vol. 19, no. 1, pp. 138-141, 2011.
- [11] H. Li, H. Li, Y. Guan, Y. Dong, L. Zhao, S. Rong, W. Chen, L. Miaomiao, H. Xu, X. Gao, R. Chen, L. Li, and Z. Xu, "Isolation and evaluation of endophytic *Bacillus tequilensis* GYLH001 with potential application for biological control of *Magnaporthe oryzae*," *PLOS One*, vol. 13, no. 10, 2018, Art. no. e0203505.
- [12] G. V. Nguyen, T. V. Vu, L. T. Vu, and H. H. Pham, "Effects of culture media and condition on IAA producing ability of endophytic bacteria isolated from roots of river mangrove (*Aegiceras corniculatum*)," *Journal of Vietnam Agricultural Science Technology*, vol. 6, no. 127, pp. 49-55, 2021.
- [13] C. N. Diep, *Monograph of Plant Endophytic Bacteria*. Can Tho: Can Tho University Publishing House, 2011.
- [14] T. M. D. Vu, *Microbiology Practice*. Ha Noi: Hanoi National University Publishing House, 2001.
- [15] C. S. Nautiya, "An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms," *FEMS Microbiology Letter*, vol. 170, pp. 265-270, 1999.
- [16] T. T. Nguyen, H. T. T. Tran, X. T. Nguyen, and V. G. Nguyen, "Isolation and characterization of endophytic bacteria from roots of black pepper," *Journal of Vietnam Agricultural Science Technology*, vol. 10, no. 95, pp. 85-90, 2018.
- [17] D. Malleswari and G. Bagyanarayana, "Plant growth-promoting activities and molecular characterization of rhizobacterial strains isolated from medicinal and aromatic plants," *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, vol. 6, no. 6, pp. 30-37, 2013.
- [18] N. N. Dhanya and S. Padmavathy, "Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans," *The Scientific World Journal*, vol. 2014, pp. 1-11, 2014.
- [19] M. R. Mwajita, H. Murage, A. Tani, E. M. Kahang, and A. Tani, "Evaluation of rhizosphere, rhizoplane and phyllosphere bacteria and fungi isolated from rice in Kenya for plant growth promoters," *Springer Plus*, vol. 2, no. 606, pp. 1-9, 2013.
- [20] M. M. S. Alves, A. E. G. Sant'Ana, C. S. J. Maria, S. Ferreira, P. Junior, K. F. Junior, V. X. Nascimento, A. S. Medeiros, and S. J. C. Silv, "IAA production of indigenous isolate of plant growth promoting rhizobacteria in the presence of tryptophan," *Australia Journal of Crop Science*, vol. 14, no. 3, pp. 537-544, 2020.