



PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN NỘI SINH HÒA TAN LÂN VÀ CỐ ĐỊNH ĐẠM TRÊN CÂY ĐÌNH LĂNG LÁ NHỎ (*Polyscias fruticosa* L. Harms)

Lê Thị Mỹ Thu¹, Trần Ngọc Hữu¹, Nguyễn Hồng Huế¹, Trần Chí Nhân²,
Lý Ngọc Thanh Xuân², Trần Thanh Thảo³, Lê Vĩnh Thúc¹, Nguyễn Quốc Khương^{1*}

¹ Trường Đại học Cần Thơ, Đường 3/2, Tp. Cần Thơ, Việt Nam

² Trường Đại học An Giang, ĐHQG Tp. Hồ Chí Minh, 18 Ung Văn Khiêm, Tp. Long Xuyên, An Giang, Việt Nam

³ Trường Đại học Cửu Long, Long Hồ, Vĩnh Long, Việt Nam

* Tác giả liên hệ: Nguyễn Quốc Khương <nqkhuong@ctu.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 25-9-2021; Ngày chấp nhận đăng: 26-2-2022)

Tóm tắt. Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định dòng vi khuẩn nội sinh hòa tan lân và cố định đạm trên cây Đình lăng. Mười ba mẫu lá và mười một mẫu rễ Đình lăng thu thập tại huyện Tri Tôn, tỉnh An Giang, được sử dụng để phân lập vi khuẩn nội sinh trên môi trường LGI. Ba mươi lăm dòng vi khuẩn nội sinh trên cây Đình lăng đã được phân lập. Các dòng vi khuẩn đều có khả năng chịu đựng được pH 5. Hai trong số các dòng vi khuẩn có khả năng hòa tan lân cao, với hàm lượng 29,5 và 29,7 mg·L⁻¹. Hai dòng vi khuẩn khác có khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA cao nhất, với hàm lượng 23,0 và 6,87 mg·L⁻¹. Một dòng vi khuẩn hòa tan lân và một dòng vi khuẩn cố định đạm được định danh dựa trên đoạn gene 16S rDNA là *Bacillus cereus* và *B. circulans*, hoàn toàn tương đồng với chủng vi khuẩn *Bacillus cereus* S5 (KU927490.1) và *B. circulans* H170 (MH671645.1) trên ngân hàng gen.

Từ khóa: đạm, Đình lăng, lân, *Polyscias fruticosa* L., vi khuẩn nội sinh

Isolation, selection and identification of phosphorus-solubilizing and nitrogen-fixing endophytic bacteria in *Ming aralia* (*Polyscias fruticosa* L. Harms)

Le Thi My Thu¹, Tran Ngoc Huu¹, Nguyen Hong Hue¹, Tran Chi Nhan²,
Ly Ngoc Thanh Xuan², Tran Thanh Thao³, Le Vinh Thuc¹, Nguyen Quoc Khuong^{1*}

¹ Can Tho University, 3/2 St., Can Tho City, Vietnam

² An Giang University, VNU Ho Chi Minh City, 18 Ung Van Khiem St., Long Xuyen City, An Giang, Vietnam

³ Mekong University, Long Ho, Vinh Long, Vietnam

* Correspondence to Nguyen Quoc Khuong <nqkhuong@ctu.edu.vn>

(Submitted: September 25, 2021; Accepted: February 26, 2022)

Abstract. This study aimed to determine phosphorus-solubilizing and nitrogen-fixing endophytic bacteria from *Ming aralia*. Thirteen leaf and 11 root samples collected in Tri Ton district, An Giang province, were used for isolating endophytic bacteria on the LGI medium. Thirty-five strains were isolated from *Ming aralia*. All isolates are resistant to pH 5. Two strains have the highest phosphorus-solubilizing activity at 29.5 and 29.7 mg·L⁻¹. Two others have the highest nitrogen-fixing ability and IAA synthesis at 23.0 and 6.87 mg·L⁻¹. One of the strains solubilizing phosphorus and one fixing nitrogen were identified as *Bacillus cereus* and *B. circulans* by 16S rDNA sequences with complete similarity to *Bacillus cereus* S5 (KU927490.1) and *B. circulans* H170 (MH671645.1) in Genbank.

Keywords: endophytic bacteria, *Ming aralia*, nitrogen, phosphorus, *Polyscias fruticosa* L. Harms

1 Đặt vấn đề

Cây Đinh lăng (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms) là một loại dược liệu truyền thống thuộc họ Araliaceae và được trồng rộng rãi ở Việt Nam. Loại cây này có chức năng như nhân sâm và khả năng chống oxy hóa [1, 2]. Gần đây, Đinh lăng được đánh giá cao do các chức năng chữa bệnh đa dạng; tất cả các bộ phận, bao gồm rễ, vỏ và lá, đều được sử dụng để làm thuốc [2]. Trong nông nghiệp, lân (P) là dưỡng chất cần thiết cho phát triển và tăng năng suất cây trồng. Thông thường, P bị cố định dưới các dạng khó hòa tan khác nhau trong đất, dẫn đến hàm lượng lân mà cây trồng hấp thu được là rất thấp [3, 4]. Tuy nhiên, các dạng lân khó tan này lại có thể hòa tan được nhờ các dòng vi khuẩn nội sinh để cung cấp chất dinh dưỡng cho cây trồng [5]. Một trong những cơ chế chính của vi khuẩn nội sinh thực vật thúc đẩy sinh trưởng cây trồng là chúng tiết ra acid hữu cơ vào trong đất để chuyển các dạng lân khó tan trong thành lân dạng ortho-phosphate mà cây trồng có thể hấp thu được [6]. Thêm vào đó, đạm là yếu tố chính để nâng cao sinh khối cây trồng,

nhưng việc bón đạm gây ra những bất lợi về môi trường và sức khỏe [7]. Đồng thời, Đinh lăng là cây dược liệu nên sinh khối cây trồng được sử dụng trực tiếp nên việc hạn chế sử dụng phân hóa học là cần thiết [8]. Ngoài ra, indole-3-acetic acid (IAA) là hormone thực vật phổ biến nhất của lớp auxin, thúc đẩy sự tăng trưởng và phát triển của thực vật [9]. IAA cũng tăng cường sự hấp thu chất dinh dưỡng bằng cách tạo ra rễ dài hơn và tăng số lượng lông hút ở rễ [10]. Chính vì vậy, các nguồn dưỡng chất thay thế có nguồn gốc sinh học có thể giảm thiểu việc sử dụng phân hóa học, mà vi sinh vật là một trong những nguồn tiềm năng. Vi khuẩn có nhiều tác động đến cây trồng trong việc hỗ trợ sinh trưởng hoặc đối kháng sinh học để phòng bệnh [11, 12]. Trong đó, vi khuẩn nội sinh góp phần quan trọng trong tiến trình sinh trưởng và phát triển của cây trồng [13]. Điều này cho thấy vai trò quan trọng của vi khuẩn nội sinh trong nền nông nghiệp bền vững cũng như hạn chế phân bón hóa học cho cây dược liệu.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Môi trường LGI với thành phần gồm: 10 g sucrose, 0,6 g KH_2PO_4 , 0,2 g K_2HPO_4 , 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g CaCl_2 , 0,01 g FeCl_3 , 0,002 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 mL bromothmol blue 0,5% trong KOH 0,2 N và 20 g agar cho 1 L dung dịch.

Thành phần của môi trường Burk's gồm: 10 g sucrose, 0,41 g KH_2PO_4 , 0,52 g K_2HPO_4 , 0,05 g Na_2SO_4 , 0,2 g CaCl_2 , 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,005 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0025 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ và 20 g agar trong 1 L môi trường cho 1 L dung dịch.

Hóa chất để pha 1 L môi trường NBRIP gồm: 10 g glucose, 5 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KCl và 0,1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Thành phần của môi trường TYGA cho 1 L gồm: 5 g trypton, 3 g men chiết xuất, 1 g glucose và 15 g agar.

Tất cả các môi trường được điều chỉnh về pH 5 để hướng đến áp dụng các vi khuẩn tuyển chọn được trong điều kiện đất có pH thấp.

2.2 Phạm vi nghiên cứu

Tiến hành thu 13 mẫu lá và 11 mẫu rễ Đinh lăng 10 tháng tuổi tại các xã Châu Lăng, An Cư và Lương Phi, huyện Tri Tôn, tỉnh An Giang, vào tháng 2 năm 2019 (vào giai đoạn phát triển lá).

2.3 Phương pháp

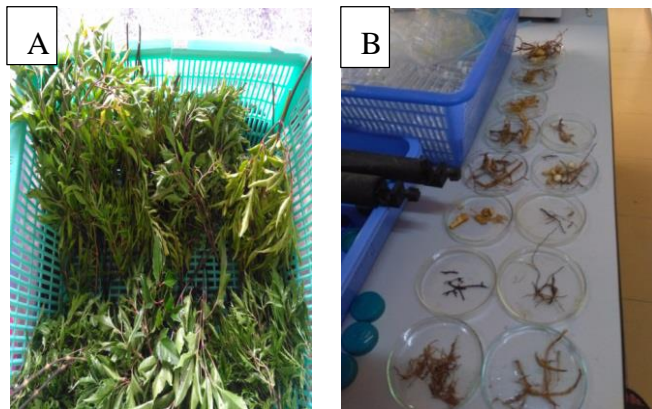
Thu mẫu rễ và lá

Chọn mẫu lá từ nhánh của cành cấp 3 có nhiều lá thật, không bị bệnh và phát triển tốt. Sau đó, tiến hành đào lấy rễ tương ứng trên cây vừa thu mẫu lá, chọn các rễ lớn của rễ cấp 3 có nhiều rễ nhánh. Tất cả mẫu thu được trữ lạnh ở 4 °C để phân lập vi khuẩn trong phòng thí nghiệm. Mẫu lá và mẫu rễ thu thập được trình bày trên Hình 1.

Phân lập và đặc điểm hình thái của vi khuẩn nội sinh

Phân lập vi khuẩn nội sinh

Cân 2 g mỗi mẫu rễ và mẫu lá đã được rửa sạch bằng nước máy. Sau đó, cho mẫu đã được cắt thành đoạn nhỏ khoảng 1 cm vào bình tam giác 250 mL, thêm 10 mL cồn 96%, lắc nhẹ trong 10 phút, rửa sạch mẫu bằng nước cất vô trùng ba lần (5 phút/lần), bổ sung 5 mL calcium hypochloride 2%, lắc nhẹ trong 10 phút. Mẫu được rửa sạch bằng nước cất vô trùng bốn lần (5 phút/lần). Tiếp theo, hút 200 µL của nước rửa lần thứ tư trải đều trên các đĩa chứa môi trường TYGA, ủ ở 30 °C trong 48 giờ. Mẫu khử đã đạt yêu cầu khi trên đĩa môi trường này không xuất hiện khuẩn lạc. Tiến hành giã nhuyễn các mẫu bằng cối chày vô trùng. Kế đến, thêm 1 mL nước cất vô trùng vào cối, khuấy đều và hút 500 µL dịch trích mẫu cho vào các ống nghiệm chứa môi trường LGI bán đặc (mỗi mẫu rễ hoặc mẫu cây lặp lại ba lần). Các ống nghiệm được đậy kín và ủ ở 30 °C khoảng 2–4 ngày. Nếu các mẫu có lớp màng mỏng gần bề mặt môi trường thì chứng tỏ vi khuẩn nội sinh đã xuất hiện. Lớp môi trường bán đặc chứa vi khuẩn nội sinh được trải sang môi trường tương ứng và ủ ở 30 °C trong 48 giờ. Tiếp tục cấy truyền các khuẩn lạc khác nhau xuất hiện trên bề mặt môi trường 2–3 lần sang các đĩa môi trường tương ứng cho đến khi các khuẩn lạc đạt thuần.



Hình 1. Mẫu lá (A) và rễ (B) Đinh lăng

Đặc điểm hình thái khuẩn lạc

Hình thái khuẩn lạc gồm màu sắc, hình dạng, dạng bìa khuẩn lạc, độ nổi và kích thước khuẩn lạc được mô tả theo phương pháp của Cao Ngọc Điệp và Nguyễn Thị Mộng Huyền [14].

Tuyển chọn vi khuẩn nội sinh

Nguồn vi khuẩn

Ba mươi lăm dòng vi khuẩn nội sinh phân lập trên môi trường LGI được trữ ở 4 °C và sử dụng để đánh giá khả năng chịu môi trường chua (pH 5), cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA.

Khảo sát khả năng sinh trưởng của vi khuẩn trong môi trường pH 5

Khả năng thích nghi của các dòng vi khuẩn trong môi trường chua được thực hiện theo phương pháp của Nguyễn Quốc Khương và cs. [15]. Các dòng vi khuẩn được đánh giá trong điều kiện pH thấp tương ứng với đất trồng cây Đinh lăng. Tất cả 35 dòng vi khuẩn được điều chỉnh OD₆₆₀ đạt giá trị 0,5 để sử dụng cho đánh giá sinh trưởng. Kế tiếp, 1 mL dung dịch của mỗi dòng vi khuẩn đã điều chỉnh OD₆₆₀ = 0,5 được cho vào ống nghiệm chứa 9 mL môi trường LGI với ba lần lặp lại cho mỗi dòng vi khuẩn. Sau 48 giờ ủ trên máy lắc, độ đục của dung dịch khuẩn được đo trên máy quang phổ ở bước sóng 660 nm. Dòng vi khuẩn có OD₆₆₀ = 0,6 được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Xác định hàm lượng lân hòa tan từ vi khuẩn

Định lượng khả năng hòa tan lân theo phương pháp của Cao Ngọc Điệp và Nguyễn Thị Mộng Huyền [14]. Hàm lượng lân hòa tan được xác định trong môi trường NBRIP ở pH 5 chứa lân khó tan 1 g·L⁻¹ Ca₃(PO₄)₂. Hút 0,5 mL dung dịch của mỗi khuẩn lạc có OD₆₆₀ = 0,5 và cho vào ống nghiệm chứa 5 mL môi trường NBRIP lỏng; sau lắc mẫu với tốc độ 120 vòng/phút trong 72 giờ. Mẫu đối chứng là dung dịch môi trường NBRIP không có vi khuẩn. Dung dịch sau ly tâm được định lượng lân hòa tan bằng phương pháp acid ascorbic trên máy quang phổ ở bước sóng 880 nm.

Đánh giá khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA của vi khuẩn nội sinh

Xác định hàm lượng đạm tổng hợp từ vi khuẩn

Định lượng khả năng cố định đạm theo phương pháp của Nguyễn Quốc Khương và cs. [15]. Các dòng vi khuẩn được nuôi trong môi trường Burk's lỏng không chứa đạm để đánh giá khả năng cố định đạm. Mỗi dòng vi khuẩn đều được điều chỉnh về OD₆₆₀ = 0,5. Hút 1 mL dung dịch vi khuẩn cho vào ống nghiệm chứa 9 mL môi trường Burk's lỏng không chứa đạm, sau đó lắc ở tốc độ 120 vòng/phút trong bóng tối với ba lần lặp lại cho mỗi dòng vi khuẩn. Dung dịch

môi trường Burk's không có vi khuẩn được sử dụng làm mẫu đối chứng. Sau 48 giờ ủ, hút 1 mL dung dịch vi khuẩn để ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 15 phút. Hàm lượng đạm được xác định bằng phương pháp hiện màu xanh phenol [16] trên máy quang phổ ở bước sóng 640 nm.

Xác định hàm lượng IAA tổng hợp từ vi khuẩn

Hàm lượng IAA tổng hợp được xác định theo phương pháp của Nguyễn Quốc Khương và cs. [15]. Tất cả các dòng vi khuẩn được sử dụng để đánh giá khả năng cung cấp IAA trong môi trường LGI với pH 5. Bổ sung tiền chất tryptophan nhằm hỗ trợ tổng hợp IAA ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Hút 1 mL dung dịch các dòng vi khuẩn có giá trị $\text{OD}_{660} = 0,5$ cho vào ống nghiệm chứa sẵn 9 mL môi trường LGI đã có tryptophan và ủ trong 48 giờ; mỗi dòng vi khuẩn được thực hiện với ba lần lặp lại. Dung dịch môi trường có tryptophan không bổ sung vi khuẩn là mẫu đối chứng. Sau đó, 1 mL dung dịch vi khuẩn được hút để ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 15 phút. Hàm lượng IAA được xác định bằng phương pháp so màu Salkowski theo quy trình như sau: 0,75 mL dung dịch trích đã được ly tâm trộn với 3 mL tác chất Salkowski ($4,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ FeCl}_3$ trong $10,8 \text{ M H}_2\text{SO}_4$) và ủ trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Hàm lượng IAA được xác định ở bước sóng 535 nm [17].

Định danh vi khuẩn nội sinh hòa tan lân

Hai dòng vi khuẩn LP3-R3 và LP1-R3 được nuôi trong 48 giờ trong môi trường LGI. Sau đó, hút 2 mL khuẩn lạc để ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút để lấy tế bào cho trích ly DNA bằng Genomic DNA Prep Kit (BioFACT™) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ và độ thuần được kiểm tra trên 1% w/v agarose gel bằng điện di. Sản phẩm DNA được khuếch đại gen mã hóa 16S rRNA bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi P515FPL và P13B [18] như mô tả trong iProof™ High-Fidelity PCR Kit-Bio-Rad (BioRad, Hercules, CA) bằng T100™ thermo cycler (BioRad) cho vi khuẩn nội sinh. So sánh kích thước của sản phẩm PCR với thang DNA chuẩn để xác nhận vị trí các band kích thước 1500 bp đối với vi khuẩn nội sinh. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng TIANquick Midi Purification Kit (Tiangen Biotech Ltd., Beijing, China) theo hướng dẫn nhà sản xuất. Sau đó kiểm tra lại độ thuần trên 1% w/v agarose gel bằng điện di. Sản phẩm PCR đã tinh sạch được giải trình tự bằng máy giải trình tự tự động tại Macrogen DNA Sequencing Service (Macrogen, Seoul, Korea). Kết quả giải trình tự với sắc phổ được phân tích bằng phần mềm BioEdit, phiên bản 7.0.5.3 [19] và phần mềm ChromasPro version 1.7 (<http://technelysium.com.au/wp/chromaspro>). Giải trình tự của các dòng vi khuẩn được so sánh với các trình tự có sẵn trong ngân hàng gen bằng công cụ Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) của National Center for Biotechnology Information (NCBI) để xác định mức độ tương đồng.

Xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phân tích phương sai trên phần mềm SPSS 16.0. Các giá trị trung bình được so sánh bằng kiểm định Duncan.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Phân lập và đặc điểm hình thái của vi khuẩn nội sinh hòa tan lân từ cây Đinh lăng

Kết quả phân lập vi khuẩn nội sinh

Chúng tôi đã phân lập và làm thuần được 35 dòng vi khuẩn trên môi trường LGI ở pH 5 từ 13 mẫu lá và 11 mẫu rễ Đinh lăng thu tại huyện Tri Tôn. Trong đó, 13 dòng vi khuẩn được phân lập từ lá và 22 dòng vi khuẩn có nguồn gốc từ rễ. Tất cả các chủng vi khuẩn này được lưu trữ trên đĩa và trong glycerol 20% ở -80°C .

Đặc tính hình thái của tất cả các khuẩn lạc được mô tả trong Bảng 1. Các khuẩn lạc có màu trắng đục (62,9%), trắng trong (8,57%), vàng (5,7%) và hồng (2,86%). Dạng bìa nguyên của khuẩn lạc chiếm ưu thế (91,4%) trong khi đó khuẩn lạc có bìa răng cưa chiếm 8,60%. Khuẩn lạc có dạng tròn (74,3%) và ovan (25,7%) và kích thước trong khoảng 1–2 mm chiếm ưu thế (68,6%). Tất cả 35 dòng vi khuẩn thuần đều có độ nổi mô ở mức ít đến vừa. Các nghiên cứu trước đây cũng cho thấy vi khuẩn nội sinh phân lập từ rễ cây mía có màu sắc trắng đục, bìa nguyên và có khả năng chuyển động chiếm ưu thế [20, 21].

3.2 Tuyển chọn vi khuẩn nội sinh hòa tan lân trên cây Đinh lăng

Khả năng chịu đựng môi trường pH thấp của các dòng vi khuẩn nội sinh từ cây Đinh lăng

Tất cả 35 dòng vi khuẩn phân lập đều chịu được môi trường pH 5, với OD_{660} lớn hơn 0,5. Cụ thể, 21 dòng có giá trị OD_{660} trong khoảng 0,5–1,0 và 14 dòng có OD_{660} lớn hơn 1 (Bảng 2). Trong nghiên cứu này, giá trị pH 5 được chọn vì ở ngưỡng này, lân trong đất hình thành ở các dạng khó hòa tan [22]. Vì vậy, lân dễ tiêu mà cây trồng có thể hấp thu nằm ở ngưỡng thấp [23]. Khuong và cs. [24, 25] đã tuyển chọn được các dòng vi khuẩn *Rhodopsedomonas* spp. có khả năng chịu được môi trường chua của đất phèn ngập nước. Tuy nhiên, các dòng vi khuẩn trong nghiên cứu này thích nghi được trong điều kiện thoáng khí trong quá trình ủ.

Bảng 1. Đánh giá đặc tính khuẩn lạc vi khuẩn nội sinh trên môi trường LGI

	Đặc tính	Số dòng vi khuẩn nội sinh (dòng)	Tỷ lệ (%)
Màu sắc	Trắng đục	22	62,9
	Trắng trong	3	8,57
	Vàng	9	25,7
	Hồng	1	2,86
Dạng bìa	Bìa nguyên	32	91,4
	Bìa răng cưa	3	8,6
Độ nổi mô	Ít mô	20	57,1
	Mô vừa	15	42,9
Hình dạng khuẩn lạc	Tròn	26	74,3
	Ovan	9	25,7
Kích thước (mm)	<1	8	22,9
	1–2	24	68,6
	>2	3	8,57

Bảng 2. Giá trị OD₆₆₀ của các dòng vi khuẩn trong điều kiện pH 5

Giá trị OD ₆₆₀	Số dòng vi khuẩn nội sinh (dòng)	Tỷ lệ (%)
0,5–1	21	60
1–1,5	8	22,9
>1,5	6	17,1

Khả năng hòa tan lân của các dòng vi khuẩn nội sinh từ cây Đinh lăng

Khả năng hòa tan lân của 35 dòng vi khuẩn khác biệt có ý nghĩa thống kê 5% (Bảng 3). Dòng vi khuẩn LP3-R3 và LP3-R5 có khả năng hòa tan lân cao với hàm lượng $29,5 \pm 1,23$ và $29,7 \pm 1,12$ mg·L⁻¹. Kế đến, dòng vi khuẩn AC1-R1 có hàm lượng lân hòa tan $6,4 \pm 0,58$ mg·L⁻¹. Các dòng vi khuẩn nội sinh CL3-R1, CL2-L3 và AC4-R1 có khả năng hòa tan lân thấp, lần lượt là $6,64 \pm 0,25$, $8,29 \pm 0,07$ và $12,0 \pm 0,19$ mg·L⁻¹. Dòng vi khuẩn CL1-R2 có khả năng hòa tan lân thấp nhất ($3,82 \pm 1,08$ mg·L⁻¹). Các dòng vi khuẩn còn lại có khả năng hòa tan lân trong khoảng $13,3 \pm 0,34$ đến $24,1 \pm 0,83$ mg·L⁻¹. Trên đất cây trồng cạn, khả năng hòa tan lân từ lân can xi của vi khuẩn nội sinh phân lập từ cây Ngô là $51,3$ mg·L⁻¹ và từ rễ cây mía là $73,9$ – $86,4$ mg·L⁻¹ [21, 26]. Do đó, hàm lượng lân hòa tan trong nghiên cứu này có giá trị thấp hơn.

Bảng 3. Khả năng hòa tan lân và tổng hợp IAA của các dòng vi khuẩn nội sinh từ cây Đinh lăng trong môi trường lỏng

TT	Ký hiệu dòng vi khuẩn	Hàm lượng lân (mg·L ⁻¹)	Hàm lượng IAA (mg·L ⁻¹)
1	AC1-R1	26,4 ^b ± 0,58	3,92 ^e ± 0,03
2	AC4-L1	22,0 ^{e-h} ± 0,99	1,24 ^{i-m} ± 0,03
3	AC4-L2	21,0 ^{s-i} ± 0,83	5,76 ^c ± 0,33
4	AC4-L3	22,5 ^{def} ± 0,58	1,62 ^{ij} ± 0,29
5	AC4-R1	12,0 ^q ± 0,19	1,15 ^{klm} ± 0,14
6	AC4-R4	14,7 ^{op} ± 0,02	1,20 ^{klm} ± 0,16
7	AC4-R5	22,6 ^{de} ± 0,66	2,45 ^{gh} ± 0,17
8	CL1-L1	22,9 ^{cde} ± 0,15	6,87 ^a ± 0,62
9	CL1-L2	18,6 ^{lm} ± 1,32	1,24 ^{i-m} ± 0,09
10	CL1-R2	3,82 ^t ± 1,08	4,62 ^d ± 0,46
11	CL2-L1	15,1 ^{no} ± 0,58	2,24 ^h ± 0,10
12	CL2-L3	8,29 ^r ± 0,07	1,49 ^{ijk} ± 0,25
13	CL2-R1	20,5 ^{h-k} ± 0,58	1,49 ^{ijk} ± 0,01
14	CL3-L4	17,6 ^m ± 0,91	2,61 ^g ± 0,04
15	CL3-L5	14,6 ^{op} ± 1,24	1,29 ^{i-m} ± 0,02
16	CL3-R1	6,64 ^s ± 0,25	1,07 ^{lm} ± 0,09
17	CL3-R2	19,8 ^{ijkl} ± 0,15	1,21 ^{klm} ± 0,20
18	CL3-R4	19,7 ^{ijkl} ± 0,41	1,31 ^{i-m} ± 0,25
19	CL3-R5	21,9 ^{e-h} ± 0,91	1,33 ^{i-m} ± 0,06
20	CL3-R6	20,4 ^{ijk} ± 0,90	6,19 ^b ± 0,04
21	CL3-R7	23,9 ^{cd} ± 0,66	3,15 ^f ± 0,03
22	LP1-L1	21,7 ^{e-l} ± 1,24	1,18 ^{klm} ± 0,01
23	LP1-R1	22,2 ^{efg} ± 0,58	1,27 ^{i-m} ± 0,06
24	LP1-R2	21,5 ^{e-i} ± 0,83	3,26 ^f ± 0,09
25	LP1-R3	20,3 ^{ijk} ± 0,81	0,98 ^m ± 0,03
26	LP3-L1	21,6 ^{e-i} ± 0,64	1,66 ⁱ ± 0,16
27	LP3-L2	23,8 ^{cd} ± 0,17	2,96 ^f ± 0,13
28	LP3-L5	24,1 ^c ± 0,83	1,44 ^{i-l} ± 0,06
29	LP3-R2	13,3 ^p ± 0,34	3,60 ^e ± 0,23
30	LP3-R3	29,5 ^a ± 1,23	3,17 ^f ± 0,32

TT	Ký hiệu dòng vi khuẩn	Hàm lượng lân ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Hàm lượng IAA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
31	LP3-R5	$29,7^a \pm 1,12$	$1,40^{i-1} \pm 0,10$
32	LP5-R1	$19,1^{kl} \pm 1,15$	$1,24^{i-m} \pm 0,14$
33	LP5-R2	$22,9^{cde} \pm 0,32$	$3,71^e \pm 0,17$
34	LP5-R3	$21,1^{fj} \pm 1,16$	$3,61^e \pm 0,08$
35	LP5-R4	$16,2^n \pm 0,41$	$1,00^m \pm 0,01$
Mức ý nghĩa		5%	5%
CV (%)		4,00	8,13

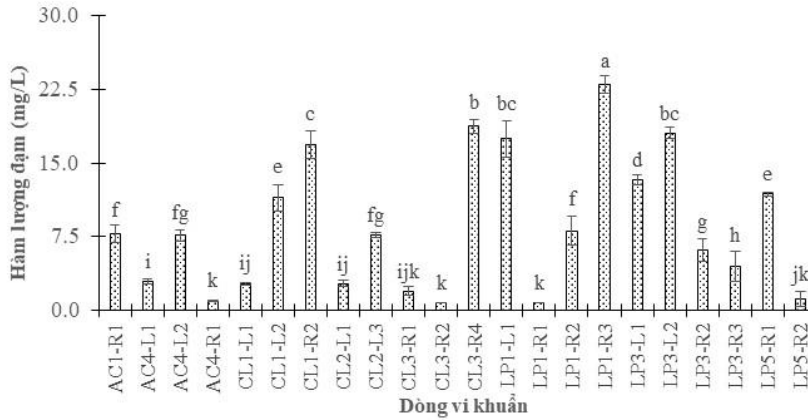
Ghi chú: Các số có chữ cái giống nhau trong cùng một cột không khác biệt có ý nghĩa thống kê theo kiểm định Duncan. Giá trị sau dấu \pm là độ lệch chuẩn.

3.3 Đánh giá khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA của các dòng vi khuẩn nội sinh từ cây Đinh lăng

Khả năng cố định đạm của các dòng vi khuẩn nội sinh từ cây Đinh lăng

Hai mươi hai dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm cao hơn $0,75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Hình 2). Khả năng cố định đạm giữa các dòng vi khuẩn khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%. Trong đó, LP1-R3 là dòng có khả năng cố định đạm cao nhất ($23,0 \pm 0,90 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Các dòng vi khuẩn CL3-R4, LP1-L1, LP3-L2 và CL1-R2 có khả năng cố định đạm dao động từ $16,9 \pm 1,41$ đến $18,8 \pm 0,90 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Kế đến, dòng vi khuẩn LP3-L1 có khả năng cố định đạm $13,3 \pm 0,50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, cao hơn so với hai dòng vi khuẩn LP5-R1 và CL1-L2 ($11,8 \pm 0,22$ và $11,5 \pm 1,34 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Các dòng vi khuẩn AC1-R4, CL3-R2 và LP1-R1 có khả năng cố định đạm thấp, lần lượt là $0,97 \pm 0,01$, $0,77 \pm 0,01$ và $0,76 \pm 0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ và khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với dòng CL3-R1 và LP5-R2 ($1,98 \pm 0,41$ và $1,19 \pm 0,80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Các dòng vi khuẩn nội sinh còn lại có khả năng cố định đạm dao động từ $2,73 \pm 0,30$ đến $8,12 \pm 1,51 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Khả năng cố định đạm của dòng vi khuẩn AGNSB48 phân lập từ cây Ngô là $148,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [24]. Tương tự, các dòng KC1c, PB3b, KC1f, KC2d, KC1b1 có khả năng cố định đạm $12,1$ – $18,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [20]. Điều này cho thấy khả năng cố định đạm của các dòng vi khuẩn phân lập từ cây Ngô, cây Mía và cây Đinh lăng là rất khác nhau.

Hàm lượng IAA được tổng hợp giữa các dòng vi khuẩn khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% (Bảng 3). Dòng vi khuẩn nội sinh CL1-L1 có khả năng tổng hợp IAA cao nhất ($6,87 \pm 0,62 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Các dòng vi khuẩn CL3-R6, AC4-L2 và CL1-R2 cũng có khả năng tổng hợp IAA cao, lần lượt là $6,19 \pm 0,04$, $5,76 \pm 0,33$ và $4,62 \pm 0,46 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Dòng vi khuẩn nội sinh LP5-R4 và LP1-R3 có khả năng tổng hợp IAA thấp ($1,00 \pm 0,01$ và $0,98 \pm 0,03 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Dòng vi khuẩn AGNSB40 phân lập từ cây Ngô lai có hàm lượng IAA là $54,25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [26] trong khi đó các dòng HA1e, PB2e và KC1d phân lập từ rễ cây Mía có hàm lượng IAA $12,1$ – $29,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [20].



Hình 2. Khả năng cố định đạm của các dòng vi khuẩn nội sinh cây Đinh lăng

3.4 Định danh vi khuẩn nội sinh từ cây Đinh lăng

Hai dòng vi khuẩn được chọn để định danh là LP3-R3 và LP1-R3. Chúng thuộc chi *Bacillus* và loài *cereus* và *circulans*, với tỷ lệ tương đồng 100% với chủng vi khuẩn *Bacillus cereus* S5 (KU927490.1) và *B. circulans* H170 (MH671645.1) trên Genbank và được đặt tên *B. cereus* LP3-R3 và *B. circulans* LP1-R3 (Hình 3), với nucleotide tương đồng là 603 và 838. Hai dòng vi khuẩn được tuyển thuộc hai chi khác nhau nên thuộc cùng một nhánh. Vi khuẩn *Pseudomonas kribbensis* được sử dụng như nhóm ngoài. Kết quả tuyển chọn vi khuẩn nội sinh kích thích sinh trưởng cây được liệu như cây *Teucrium polium* L. cũng tìm thấy vi khuẩn *B. cereus* and *B. subtilis* có khả năng hòa tan lân và tổng hợp IAA [27]. Bên cạnh đó, chi *Bacillus* cũng được phân lập từ cây *Tinospora cordifolia* để sử dụng trong chế phẩm vi sinh [28]. Ngoài ra, chi *Bacillus* là một trong những vi khuẩn phổ biến nhất được tìm thấy nội sinh trong cây trồng [29]. Chi *Bacillus* còn tồn tại trong một số cây dược liệu như *Glycyrrhiza* spp., *Pinellia ternate*, *Lycium chinense*, *Digitalis purpureae*, *Leonurus heterophyllus*, *Bletilla striata*, *Belamcanda chinenses*, *P. pedatisecta*, và *Taxus yunnanensis* [30–32]. Những dòng vi khuẩn tuyển chọn được từ cây *Handroanthus impetiginosus*, trong đó có chi *Bacillus*, có khả năng cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA [8].



Hình 3. Cây phả hệ về mối quan hệ di truyền của dòng vi khuẩn nội sinh hòa tan lân và cố định đạm được tuyển chọn dựa vào trình tự gene 16S-rDNA

4 Kết luận

Chúng tôi đã phân lập được 35 dòng vi khuẩn nội sinh từ lá và rễ cây Đinh lăng trồng tại huyện Tri Tôn, tỉnh An Giang, trên môi trường LGI. Trong đó, dòng vi khuẩn LP3-R3 và LP3-R5 có khả năng hòa tan lân cao với hàm lượng $29,5 \pm 1,23$ và $29,7 \pm 1,12$ mg·L⁻¹. Khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA cao nhất được ghi nhận ở dòng vi khuẩn LP1-R3 và CL1-L1 với $23,0 \pm 0,90$ và $6,87 \pm 0,62$ mg·L⁻¹. Đây là chủng vi khuẩn *Bacillus cereus* LP3-R3 và *B. circulans* LP1-R3 với tỷ lệ tương đồng 100% với chủng vi khuẩn *Bacillus cereus* S5 (KU927490.1) và *B. circulans* H170 (MH671645.1) trên ngân hàng gen.

Tài liệu tham khảo

1. Thu N. M., Son H. L. (2019), Effect of storage temperature and preservatives on the stability and quality of *Polyscias fruticosa* (L.) Harms herbal health drinks, *Journal of Pharmaceutical Research International*, 1–7.
2. Nguyen M. P. (2020), Impact of roasting to total phenolic, flavonoid and antioxidant activities in root, bark and leaf of *Polyscias fruticosa*, *Journal of Pharmaceutical Research International*, 13–17.
3. Bindraban P. S., Dimkpa C. O., Pandey R. (2020), Exploring phosphorus fertilizers and fertilization strategies for improved human and environmental health, *Biology and Fertility of Soils*, 56(3), 299–317.
4. Mardamootoo T., du Preez C. C., Barnard J. H. (2021), Phosphorus management issues for crop production: A review, *African Journal of Agricultural Research*, 17(7), 939–952.
5. Varga T., Hixson K. K., Ahkami A. H., Sher A. W., Barnes M. E., Chu R. K., Battu A. K., Nicora C. D., Winkler T. E., Reno L. R., Fakra S. C., Antipova O., Parkinson D. Y., Hall J. R., Doty S. L. (2020), Endophyte-promoted phosphorus solubilization in *Populus*, *Frontiers in Plant Science*, 11, 1585.
6. Otieno N., Lally R. D., Kiwanuka S., Lloyd A., Ryan D., Germaine K. J., Dowling D. N. (2015), Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates, *Frontiers in Microbiology*, 6, 745.
7. Ahmed M., Rauf M., Mukhtar Z., Saeed N. A. (2017), Excessive use of nitrogenous fertilizers: an unawareness causing serious threats to environment and human health. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(35), 26983–26987.
8. Yarte M. E., Gismondi M. I., Llorente B. E., Larraburu E. E. (2020), Isolation of endophytic bacteria from the medicinal, forestal and ornamental tree *Handroanthus impetiginosus*. *Environmental Technology*, 1–11.

9. Bunsangiam S., Thongpae N., Limtong S., Srisuk N. (2021), Large scale production of indole-3-acetic acid and evaluation of the inhibitory effect of indole-3-acetic acid on weed growth, *Scientific Reports*, 11(1), 1–13.
10. Mohite B. (2013), Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(3), 638–649.
11. Ke J., Wang B., Yoshikuni Y. (2021), Microbiome engineering: synthetic biology of plant-associated microbiomes in sustainable agriculture, *Trends in Biotechnology*, 39(3), 244–261.
12. Müller T., Behrendt U. (2021), Exploiting the biocontrol potential of plant-associated pseudomonads—a step towards pesticide-free agriculture?, *Biological Control*, 104538.
13. Herrera H., Sanhueza T., Novotná A., Charles T. C., Arriagada C. (2020), Isolation and identification of endophytic bacteria from mycorrhizal tissues of terrestrial orchids from southern Chile, *Diversity*, 12(2), 55.
14. Cao Ngọc Diệp, Nguyễn Thị Mộng Huyền (2015), Phân lập và xác định đặc tính vi khuẩn nội sinh trong rễ cây khoai lang (*Ipomoea batatas*) trồng trên đất phèn ở huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học, 36, 6–13.
15. Nguyễn Quốc Khương, Lê Vĩnh Thúc, Nguyễn Thị Thái Lê, Trần Hoàng Em, Lâm Dư Mẫn, Trần Ngọc Hữu, Nguyễn Thị Thanh Xuân, Trần Chí Nhân, Lý Ngọc Thanh Xuân (2019), Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn có khả năng cố định đạm, phân giải lân, kích thích sinh trưởng cây trồng từ đất vùng rễ cây Ngô lai, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 23, 17–23.
16. Nelson D. W. (1983), Determination of ammonium in KCl extracts of soils by the salicylate method, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 14(11), 1051–1062.
17. Glickman E., Dessaux, Y. (1995), A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 793–796.
18. Turner J. T., Backman P. A. (1999), Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*, *Plant Disease*, 75, 347–353.
19. Hall T. A. (1999), BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
20. Nguyễn Quốc Khương, Lê Vĩnh Thúc, Lê Thị Mỹ Thu, Lưu Thị Yến Nhi, Võ Văn Ợng, Trần Chí Nhân, Lý Ngọc Thanh Xuân và Nguyễn Thị Thanh Xuân (2020), Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn nội sinh rễ cây mía đường có khả năng cố định đạm và tổng hợp Indole Acetic Acid, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 14, 110–116.

21. Nguyễn Quốc Khương, Lê Vĩnh Thúc, Lê Thị Mỹ Thu, Lưu Thị Yến Nhi, Võ Văn Ứng, Trần Chí Nhân, Lý Ngọc Thanh Xuân và Nguyễn Thị Thanh Xuân (2020), Tuyển chọn vi khuẩn nội sinh rễ cây mía đường có khả năng hòa tan lân, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 20, 35–41.
22. Ahmed W., Jing H., Kaillou L., Qaswar M., Khan M. N., Jin C., Geng S., Qinghai H., Liu Yiren, Guangrong L., Mei S., Chao L., Dongchu L., Ali S., Normatov Y., Mehmood S., Zhang H. (2019), Changes in phosphorus fractions associated with soil chemical properties under long-term organic and inorganic fertilization in paddy soils of southern China, *PloS one*, 14(5), e0216881.
23. Mahmood M., Tian Y., Ma Q., Ahmed W., Mehmood S., Hui X., Wang Z. (2020), Changes in phosphorus fractions and its availability status in relation to long term P fertilization in Loess Plateau of China, *Agronomy*, 10(11), 1818.
24. Khuong, N. Q., Kantachote, D., Onthong, J., and Sukhoom, A. (2017), The potential of acid-resistant purple nonsulfur bacteria isolated from acid sulfate soils for reducing toxicity of Al³⁺ and Fe²⁺ using biosorption for agricultural application, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, 329–340.
25. Khuong, N. Q., Kantachote, D., Nookongbut, P., Onthong, J., Xuan, L. N. T., & Sukhoom, A. (2020), Mechanisms of acid-resistant *Rhodopseudomonas palustris* strains to ameliorate acidic stress and promote plant growth, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 101520.
26. Nguyễn Quốc Khương, Trần Ngọc Hữu, Lê Vĩnh Thúc, Trần Hoàng Em, Hứa Hữu Đức, Lâm Dư Mẫn, Nguyễn Kim Quyên, Trần Chí Nhân, Lý Ngọc Thanh Xuân (2020), Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn nội sinh cây Ngô lai có khả năng cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, Số 3 + 4, 13–18.
27. Hassan S. E. D. (2017), Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L, *Journal of advanced Research*, 8(6), 687–695.
28. Duhan P., Bansal P., Rani S. (2020), Isolation, identification and characterization of endophytic bacteria from medicinal plant *Tinospora cordifolia*, *South African Journal of Botany*, 134, 43–49.
29. Romero F. M., Marina M., Pieckenstain F. L. (2014), The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing, *FEMS Microbiology Letters*, 351(2), 187–194.
30. Venieraki A., Dimou M., Pergalis P., Kefalogianni I., Chatzipavlidis I., Katinakis P. (2011), The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat, *Microbial Ecology*, 61(2), 277–285.

31. Wulff E. G., Van Vuurde J. W. L., Hockenhull J. (2003), The ability of the biological control agent *Bacillus subtilis*, strain BB, to colonise vegetable brassicas endophytically following seed inoculation, *Plant and Soil*, 255(2), 463–474.
32. Miller K. I., Qing C., Sze D. M. Y., Roufogalis B. D., Neilan B. A. (2012), Culturable endophytes of medicinal plants and the genetic basis for their bioactivity, *Microbial Ecology*, 64(2), 431–449.