Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên
Tập 133, Số 1C, 179–191, 2024

pISSN 1859-1388
eISSN 2615-9678

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VI KHUẨN NỘI SINH TỪ MỘT SỐ GIỐNG LAN RỪNG

Nguyễn Hữu Thọ[1,4], Trương Thị Bích Phượng[2], Hồ Thị Xuân Tuý[1], Phạm Thành[3], Nguyễn Thị Kim Cúc[1]*

[1] Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tỉnh lộ 10, Phú Thượng, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam
[2] Trường Đại học khoa học, Đại học Huế, Số 77 Nguyễn Huệ, TP Huế, Thừa Thiên Huế
[3] Trường Đại học sư phạm, Đại học Huế, Số 34 Lê Lợi, TP Huế, Thừa Thiên Huế
[4] Khoa Nông Lâm nghiệp, Trường Cao đẳng Cơ điện, Xây dựng và Nông lâm Trung Bộ, TP. Quy Nhơn, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Nguyễn Thị Kim Cúc <ntkcuc.huib@hueuni.edu.vn>
(*Ngày nhận bài: 20-03-2023; Hoàn thành phản biện: 03-06-2023; Ngày chấp nhận đăng: 22-04-2024*)

Tóm tắt. Vi khuẩn nội sinh là các vi khuẩn cư trú trong các mô thực vật mà không gây ra những tổn thương cho cây chủ, chúng có vai trò tăng cường hỗ trợ sinh trưởng thực vật trong cả điều kiện bình thường và những điều kiện bất lợi. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân lập được 30 chủng vi khuẩn nội sinh từ các giống lan rừng Giả hạc (*Dendrobium anosmum*), Giáng hương tam bảo sắc (*Aerides falcata*), Kiều vàng *(Dendrobium thyrsiflorum),* Hoàng thảo vảy rồng (*Dendrobium lindleyi*), lan kiếm *(Cymbidium finlaysonianum).* Hình thái khuẩn lạc của các chủng được phân lập chủ yếu có màu trắng (73,4%), trơn nhầy (60%), mép tròn đều (63,3%), một số ít có bề mặt khô ráp hoặc bóng nhẵn, viền mép dạng gợn sóng. Kết quả nghiên cứu đặc điểm hóa sinh cho thấy 18/30 chủng có khả năng phân giải lân; 15/30 chủng có khả năng sinh IAA; 16/30 chủng có khả năng cố định đạm; và 18/30 chủng có khả năng sinh NH_3. Trong đó, 3 chủng vi sinh vật được ký hiệu là L4, L6, C4, có đặc điểm trội hơn các chủng khác đã được lựa chọn để định danh, và được lần lượt xác định là *Burkholderia* sp., *Bacillus cereus và Pseudomonas boreopolis.* Đây là những chủng vi sinh vật tiềm năng có thể ứng dụng trong nghiên cứu phát triển các chế phẩm vi sinh dùng trong kích thích sinh trưởng của lan.

Từ khoá: Bacillus, Burkholderia, IAA, Pseudomonas, vi khuẩn nội sinh

Isolation of endogenous bacteria from wild orchids

Nguyen Huu Tho[1,4], Truong Thi Bich Phuong[2], Ho Thi Xuan Tuy[1], Pham Thanh[3], Nguyen Thi Kim Cuc[1]*

[1] Institute of Biotechnology, Hue University, Road 10, Phu Thuong, Phu Vang, Thua Thien Hue, Vietnam
[2] University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue, Hue City, Thua Thien Hue, Vietnam
[3] Hue University of Education, Hue University, 34 Le Loi, Hue City, Thua Thien Hue, Vietnam
[4] College Electro-Mechanics, Construction and Agro-Forestry of Central Vietnam, Quy Nhon city, Vietnam

* Correspondence to Nguyen Thi Kim Cuc <ntkcuc.huib@hueuni.edu.vn>
(*Received: 20 March 2024; Revised: 0. June 2023; Accepted: 22 April 2024*)

Abstract. Endophytic bacteria reside in plant tissues without causing damage to the host and enhance plant growth under both normal and adverse conditions. In this study, 30 strains of endophytic bacteria were isolated from different wild orchids, including *Dendrobium anosmum*, *Aerides*

falcata, *Dendrobium thyrsiflorum*, *Dendrobium lindleyi*, and *Cymbidium finlaysonianum*. The colony morphology of the isolated strains was mainly white (73.4%), and slimy (60%), with regularly rounded edges (63.3%), a few had a dry or glossy surface and a wavy edge. The results of biochemical characterization studies showed that 18/30 strains could decompose phosphorus; 15/30 strains could produce producing IAA; 16/30 strains could fix nitrogen; and 18/30 strains were likely to generate NH_3. Among them, three isolated strains, named L4, L6, and C4, as outstanding characteristics than other strains, were selected for identification and identified as *Burkholderia* sp., *Bacillus cereus*, and *Pseudomonas boreopolis*, respectively. These microbes are potential strains that can be used as microbial products for agricultural applications, especially in growing orchid seedlings.

Keywords: *Bacillus, Burkholderia,* endogenous microorganisms, IAA**,** *Pseudomonas*

1 Mở đầu

Những ảnh hưởng có lợi của vi sinh vật đối với sự phát triển của thực vật như cố định đạm, phân giải lân, kali khó tan, thúc đẩy sự phát triển của chồi và rễ, kiểm soát hoặc ngăn chặn dịch bệnh và cải thiện cấu trúc đất đã được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu... [1]. Một số vi sinh vật có ích được nghiên cứu và sử dụng phổ biến trong nông nghiệp có thể kể đến như *Rhizobia, Mycorrhizae, Azospirillum, Bacillus, Pseudomonas, Trichoderma, Streptomyces* và một số loài khác [2]. Vi sinh vật nội sinh là một nhóm vi sinh vật được quan tâm gần đây, là những vi sinh vật cộng sinh với thực vật, sống nội sinh trong các mô thực vật mà không gây ra bất kỳ tác hại nào cho cây chủ [3–5]. Các vi khuẩn nội sinh thuộc các chi *Bacillus, Burkholderia, Enterobacter* và *Pseudomonas* thường được tìm thấy ở các cây trồng nông nghiệp [6], chúng có vai trò quan trọng trong sinh trưởng, phát triển của cây trồng và góp phần duy trì tính bền vững trong sản xuất nông nghiệp [7].

Vi khuẩn nội sinh đã được phân lập từ nhiều loài thực vật trong đó bao gồm cả các cây trồng nông nghiệp và cây cỏ dại [8]. Tuy nhiên, nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh trong cây hoa lan (*Orchidaceae*) và ứng dụng thực tiễn của nó vẫn còn hạn chế. Đối với hoa lan, đặc biệt là hoa lan rừng có một hệ vi sinh vật cộng sinh rất phong phú, điều này có thể là một trong những nguyên nhân chính giúp cho lan rừng có một sức sống mạnh mẽ, khả năng đề kháng tốt với nhiều loại sâu bệnh [9]. Ngược lại lan nuôi cấy mô, lan công nghiệp thì sức sống yếu hơn, khả năng chống chịu sâu bệnh cũng kém hơn, điều này một phần nguyên nhân có thể do những loại lan này không có hệ vi sinh cộng sinh bên trong như lan rừng. Đã có những công trình nghiên cứu ứng dụng các vi sinh vật cộng sinh vào lan nhằm nâng cao chất lượng của các giống lan công nghiệp [9,10].

Khác với các thực vật khác, hạt của các loài lan không có nội nhũ và chúng phải phụ thuộc vào một loại nấm nội sinh *Rhizoctonia* để nảy mầm, phát triển và thích nghi [11]. Ngoài ra cũng có nhiều chủng vi sinh vật nội sinh ở thân, lá, rễ của cây giúp thúc đẩy các quá trình phát triển của cây, cũng như giúp kháng lại một số loại bệnh. Faria và cộng sự [12] đã phân lập vi khuẩn nội sinh từ phong lan và tiềm năng của chúng để thúc đẩy sự phát triển của thực vật. Nghiên cứu của Shah S. và cộng sự về vi sinh vật nội sinh trong phong lan *Vanda cristata* cho thấy có sự ảnh hưởng nhất định của vi sinh vật nội sinh tới sự phát triển của thực vật [13]. Nghiên cứu của Héctor Herrera và cộng sự đã phân lập và xác định được một số vi khuẩn nội sinh từ mô rễ của hoa lan trên cạn từ miền Nam Chile [14]. Tsavkelova và cộng sự đã thực hiện nghiên cứu về vi khuẩn cư trú bên trong rễ của lan biểu sinh [15] và một nghiên cứu khác về vi sinh vật nội sinh trong rễ lan và khả năng sinh auxin của chúng [16]. Bên cạnh đó, một số chủng nấm nội sinh trên cây hoa lan như

pISSN 1859-1388
eISSN 2615-9678

Penicillium sp., *Fusarium* sp. [17], chi *Fusarium*, *Unidentified II* [18].

Các giống lan có thể sinh sống ở nhiều môi trường ngoại cảnh khác nhau tạo nên một sự đa dạng trong quần thể các vi khuẩn nội sinh, gắn kết cùng những đặc trưng riêng biệt so với hệ vi sinh vật của môi trường đất xung quanh [19]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân lập và tuyển chọn một số chủng vi sinh vật nội sinh từ các mẫu lan rừng được thu thập ở khu vực miền trung Tây Nguyên gồm Bình Định, Gia Lai, Kon Tum, Thừa Thiên Huế, hướng đến mục tiêu phát triển sản phẩm phân bón hữu cơ có nguồn gốc từ vi sinh vật ứng dụng trong lĩnh vực nông nghiệp bền vững.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Các mẫu lan rừng được thu thập ở Bình Định, Gia Lai, Kon Tum, Thừa Thiên Huế. Các giống lan được thu thập gồm có Giả hạc (*Dendrobium anosmum*), Giáng hương tam bảo sắc (*Aerides falcata*), Kiều vàng *(Dendrobium thyrsiflorum),* Hoàng thảo vảy rồng (*Dendrobium lindleyi*), lan kiếm *(Cymbidium finlaysonianum).*

2.2 Môi trường nuôi cấy vi sinh

Môi trường Luria-Bertani (LB) dùng nuôi cấy vi khuẩn cho định danh [20] gồm 10 g/L Tryptone, 5 g/L cao nấm men, 10 g/L NaCl (trong thí nghiệm sử dụng LB dạng đặc thì bổ sung agar 15 g/L.)

Nước Peptone gồm có Peptone: 10 g/L; NaCl: 5 g/L.

Môi trường Pikovskaya (PVK) (dùng để phân lập vi khuẩn có khả năng phân giải lân khó tan) gồm glucose (10 g), $Ca_3(PO_4)_2$ (5 g), $(NH_4)_2SO_4$ (0,5 g), KCl (0,2 g), $MgSO_4.7H_2O$ (0,1 g), $MnSO_4$ (0,002 g), $FeSO_4$ (0,002 g), cao nấm men (0,5 g), agar (20 g) và nước cất 1.000 ml.

Môi trường Nutrient agar (NA) gồm có nước thịt bò: 200 g/L; Peptone: 5 g/L; cao nấm men: 3 g/L; NaCl: 5 g/L; 18 g/L agar, pH: 7,0.

Môi trường NA bán lỏng gồm có nước chiết thịt bò: 200 g/L; Peptone: 5 g/L; cao nấm men: 3 g/L; NaCl: 5 g/L; 4 g/L agar, pH: 7,0.

Môi trường Starch casein agar (SCA) gồm có Tinh bột: 10 g/L; K_2HPO_4: 2 g/L; KNO_3: 2 g/L; casein: 0,3 g/L; $MgSO_4.7H_2O$: 0,05 g/L; $CaCO_3$: 0,02 g/L; $FeSO_4.7H_2O$: 0,01 g/L; NaCl: 2 g/L; Agar: 15 g/L; pH: 7,0.

Môi trường International streptomyces project 2 (ISP2) gồm có cao nấm men: 4 g/L; chiết xuất mạch nha: 10 g/L; dextrose (hoặc glucose): 4 g/L; Agar: 15 g/L; pH: 7,3.

Môi trường Ashby xác định khả năng cố định đạm của vi sinh vật gồm có Glucose (nguồn carbon): 20 g/L; K_2HPO_4: 0,2 g/L; NaCl: 0,2 g/L; $MgSO_4.7H_2O$: 0,2 g/L; K_2SO_4: 0,1 g/L $CaCO_3$: 5 g/L; Agar: 15 g/L; pH: 7,0.

2.3 Thời gian và địa điểm

Các thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm tế bào, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế từ tháng 9/2021-8/2022.

2.4 Phương pháp

Phân lập vi khuẩn nội sinh

Để loại trừ các vi sinh vật trên bề mặt, mẫu (thân, rễ, lá) sau khi thu thập được xử lý như sau: Loại bỏ các phần bị hỏng, úa vàng, rửa sạch mẫu dưới vòi nước chảy; tiếp tục rửa lại bằng nước cất vô trùng rồi cắt mẫu thành những đoạn nhỏ 1 - 2 cm, làm khô mẫu bằng giấy hút ẩm; sau đó khử trùng mẫu bằng cồn 96% trong 3 phút, Sodium hypochloride 1% trong 5 phút, hydrogen peroxide 3% (H_2O_2) trong 5 phút và rửa lại với nước cất vô trùng 4 lần để tẩy rửa các loại hóa chất còn thừa [21]. Để kiểm tra khả năng các vi sinh vật còn sót lại trên bề mặt mẫu sau khi khử trùng, lấy 200 µL

nước cất vô trùng đã rửa mẫu ở lần cuối cấy trãi trên môi trường LB agar và ủ ở 30°C trong 24h để quan sát ngoại nhiễm (mẫu nào có ngoại nhiễm thì không sử dụng vi sinh vật từ mẫu đó cho các nghiên cứu tiếp theo). Các mẫu sau khi khử trùng được cho vào các cối bằng sứ đã khử trùng và nghiền mịn mẫu, thêm 10 mL nước cất khử trùng trùng, sau đó tất cả mẫu được cho vào một ống 50 mL vô trùng.

Dung dịch sau khi nghiền tiến hành pha loãng theo dãy nồng độ 10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} sau đó hút 50 µL dung dịch ở các nồng độ pha loãng được chuyển vào trong ống nghiệm có chứa 3 mL môi trường bán lỏng NA, rồi đem ủ ở 30°C trong 48 h, quan sát thấy các ống nghiệm chứa môi trường bán lỏng NA đã cấy dịch trích của mẫu xuất hiện một lớp màng mỏng cách mặt môi trường nuôi khoảng 0,5 cm chỉ thị có sự hiện diện của vi khuẩn nội sinh [22,23].

Lấy một ít vi khuẩn từ màng mỏng của các môi trường bán lỏng NA lần lượt cấy chuyển sang các đĩa môi trường NA, LB, SCA, ISP2 đặc để tách dòng các khuẩn lạc. Sau vài lần cấy chuyển trên các môi trường đặc, chọn các khuẩn lạc rời và đều nằm trên đường cấy quan sát dưới kính hiển vi. Khi thấy vi khuẩn đã thuần nhất thì cấy chuyển sang ống nghiệm chứa môi trường đặc tương ứng để trữ ở 4°C và được xem như là một dòng [22].

Hình thái vi khuẩn trên các đĩa môi trường được theo dõi bằng cách đo kích thước và quan sát hình thái các dạng khuẩn lạc bao gồm các chỉ tiêu: màu sắc, hình dạng, độ nổi và dạng bìa khuẩn lạc bằng mắt thường. Đối với những khuẩn lạc có kích thước quá nhỏ thì sử dụng kính lúp để quan sát [24].

Phân tích hoạt tính hoá sinh

Xác định khả năng phân giải lân

Lựa chọn các khuẩn lạc đã phân lập cấy chấm điểm lên môi trường Pikovaskya. Các khuẩn lạc xuất hiện trên bề mặt môi trường sau 24 đến 72 h ủ, tiến hành khảo sát hình thái khuẩn lạc, hình dạng tế bào. Các dòng vi khuẩn phân lập được khảo sát định tính khả năng hòa tan Phốt pho trên môi trường Pikovaskya đặc [25] thông qua vòng sáng phân giải tạo ra xung quanh khuẩn lạc trên môi trường [26].

Xác định khả năng cố định đạm

Lựa chọn các khuẩn lạc đã phân lập cấy điểm lên môi trường Ashby mannitol agar, ủ ở 30°C trong 72 giờ. Xác định các khuẩn lạc phát triển được trên môi trường Ashby, hình thái khuẩn lạc, hình dạng tế bào vi khuẩn, đường kính khuẩn lạc phát triển [27].

Xác định khả năng sinh NH3

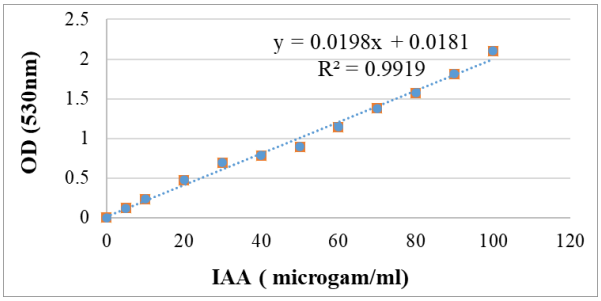
Xác định khả năng sinh NH_3 của các chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập bằng phương pháp định tính của Cappuccino & Sherman [28,29]. Các dòng vi khuẩn đã phân lập được nuôi trong ống 10 mL nước peptone, nuôi lắc 150 vòng/phút, trong 48-72h ở 28 ± 2°C. Sau đó cho 0,5 mL thuốc thử Nessler (K_2HgI_4) vào mỗi ống. Quan sát sự thay đổi màu sắc trong khoảng màu vàng sang nâu sẫm là chứng tỏ chủng vi khuẩn đó có sinh amoniac [30,31], màu sắc phụ thuộc vào hàm lượng amoniac sinh ra.

Xác định khả năng sinh IAA

Các chủng vi sinh vật đã phân lập được nuôi tăng sinh trong môi trường dịch thể Luria Bertani có bổ sung 0,1% L - Tryptophan trong máy lắc ổn nhiệt ở tốc độ 150 vòng/phút, trong thời gian từ 48-72 h, nhiệt độ từ 28°C đến 30°C. Ly tâm không ít hơn 3 mL dung dịch mẫu thử với tốc độ 6000 vòng/phút, trong thời gian 10 phút. Lấy 2 mL phần dung dịch trên bề mặt (phần nước trong) cho vào ống định mức dung tích 10 mL. Thêm thuốc thử Salkowski đến vạch định mức, trộn đều. Ủ tối trong vòng 25 phút và tiến hành so sánh màu sắc của các chủng vi sinh vật, màu càng

pISSN 1859-1388
eISSN 2615-9678

đỏ thì hàm lượng IAA tổng hợp được càng cao [32]. Hàm lượng IAA sinh ra được xác định bằng đồ thị đường chuẩn (Hình 1). Đo cường độ màu trên máy quang phổ so màu ở bước sóng 530 nm.



Hình 1. Đường chuẩn IAA được xây dựng ở dãy nồng độ IAA từ 0 đến 100 µg/ml

Định loại phân tử chủng vi sinh vật

Trong số những chủng phân lập được, lựa chọn chủng có hoạt tính tốt nhất để định danh vi khuẩn bằng cách giải trình tự gen 16S rRNA. DNA tổng số từ vi khuẩn được tách chiết theo mô tả của Sambrook và Russell [33].

Các dòng phân lập được xác định bằng giải trình tự một phần của vùng 16S đối với vi khuẩn. Các vùng 16S rRNA của vi khuẩn được khuếch đại bằng cách sử dụng đoạn mồi thuận 27F (5′-AGAGTTTGATC (AC) TGGCTCAG-3′) và mồi ngược 1492R (5′-ACGG (CT) TACCTTGTTACGA CTT-3′) [34].

Phản ứng PCR được thực hiện 30 chu kỳ với sự biến tính ban đầu ở 95°C trong 5 phút. Biến tính ở 94°C trong 1 phút, gắn mồi ở 60°C trong 30 giây và kéo dài ở 72°C trong 30 giây. Lần kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR sau đó được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,5%, và tinh sạch trước khi được giải trình tự tại genLab (Hà Nội). Trình tự thu được sau đó được so sánh và phân tích với trình tự đã được công bố trên cơ sở dữ liệu (NCBI) bằng chương trình BLAST. Cùng với đó trình tự được so sánh bằng CLUSTAL X. Các chủng được dựng cây phân loại xác định họ hàng gần bằng phần mềm Mega 7.

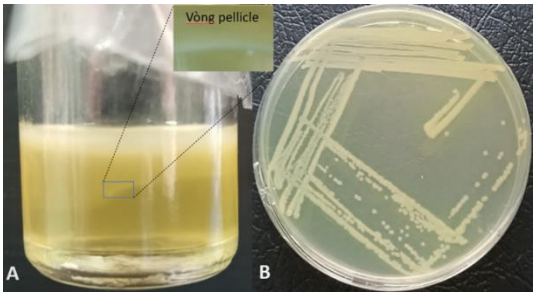
Phương pháp xử lý số liệu

Tất cả dữ liệu thử nghiệm được biểu thị bằng giá trị trung bình của ba phép đo cùng với sai số chuẩn. Đối với phân tích thống kê, ANOVA nhân tố đơn (phân tích phương sai) sau đó là kiểm tra nhiều phạm vi của Ducan's được thực hiện bằng phần mềm SPSS.16. Sự khác biệt về giá trị trung bình được coi là có ý nghĩa ở p <0,05.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Kết quả phân lập vi sinh vật

Kết quả phân lập vi sinh vật nội sinh từ các bộ phận khác nhau của cây lan rừng đã thu được 30 chủng vi khuẩn nội sinh. Phần lớn các chủng phân lập được có hình thái khuẩn lạc là màu trắng chiếm 73,4% (trắng sữa (30%), trắng trong (26,7%), trắng đục (16,7%)) một số ít chủng có màu vàng chiếm 10%, vàng nhạt chiếm 10%, hồng chiếm 3,3% hoặc cam chiếm 3,3%. Ngoài ra, đặc điểm bề mặt khuẩn lạc là trơn nhầy chiếm 60%, một số khác thì khô ráp chiếm 16,7%, hoặc bóng nhẵn chiếm 23,3%. Mép của khuẩn lạc qua quan sát thấy thường tròn đều chiếm 63,3% hoặc dạng lượn sóng chiếm 36,7% (bảng 1). Kích thước của khuẩn lạc nuôi cấy trên môi trường phân lập sau 48 h đạt từ 1-5 mm, có dạng tế bào là hình tròn hoặc hình que. Các mô tả về đặc điểm khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn nội sinh tương tự cũng được tìm thấy trong các nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh và Đỗ Minh Thu [23]; Nguyễn Thị Thúy Duy và cộng sự [35].



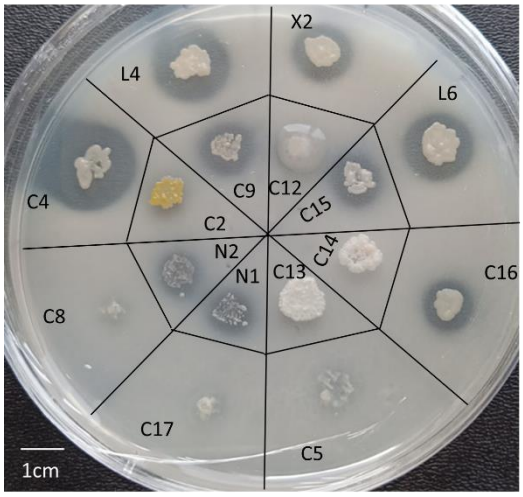
Hình 2. Phân lập và tạo dòng thuần khiết các vi khuẩn nội sinh. (A: phân lập vi khuẩn nội sinh trong môi trường bán lỏng NA; B: Tạo dòng thuần khiết)

3.2 Một số đặc tính hoá sinh của các chủng vi sinh vật nội sinh phân lập được

Các chủng vi khuẩn đã phân lập được tiếp tục thử nghiệm trên các môi trường khác nhau để xác định các đặc tính hóa sinh. Các hoạt tính được kiểm tra gồm khả năng phân giải lân, khả năng sinh NH_3, khả năng cố định nitơ trên môi trường không chứa nitơ, khả năng sinh IAA. Kết quả thử nghiệm được thể hiện qua bảng 1.

Khả năng phân giải lân

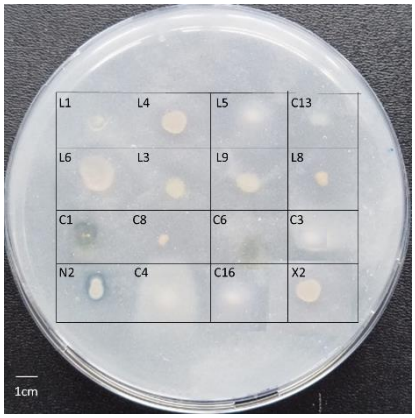
Trong nghiên cứu này, với 30 chủng đã phân lập và xác định được 18 chủng có khả năng phân giải lân, đây là hoạt tính hòa tan tri-canxi photphat (TCP) có trong môi trường Pikovaskya. Tuy nhiên khả năng phân giải lân ở mỗi chủng là khác nhau, mức độ đánh giá thông qua vòng sáng phân giải sau 72 h nuôi. Đường kính vòng sáng được hình thành sau nuôi cấy trên môi trường dao động từ 2 - 15 mm. Kết quả thử nghiệm đã chọn được 3 chủng có khả năng phân giải lân cao là L4 với đường kính vòng sáng phân giải lân là 15 mm, đường kính khuẩn lạc là 5 mm; Chủng L6 có đường kính vòng sáng 13 mm, đường kính khuẩn lạc 6 mm và chủng C4 là 15 mm và 6 mm (Bảng 1, Hình 3).



Hình 3. Thử nghiệm khả năng phân giải lân của vi sinh vật nội sinh trên môi trường có chứa tricalcium photphat

Khả năng cố định đạm

Trong số 30 chủng được phân lập, cấy thử nghiệm trên môi trường không có nitơ Ashby agar, sau 72 h nuôi cấy có 16 chủng phát triển được trên môi trường này. Điều này chứng minh chúng có khả năng cố định nitơ thành NH_4^+ để có thể hấp thu và sinh trưởng. Tuy nhiên khả năng cố định nitơ của 16 chủng đó là khác nhau, dựa vào kích thước khuẩn lạc phát triển để xác định. Kích thước của khuẩn lạc sau thời gian nuôi cấy của các chủng phát triển được có đường kính từ 2-16 mm, thí nghiệm cũng ghi nhận 3 chủng L4, L6, C4 có đường kính khuẩn lạc cao, thứ tự là 16 mm, 16 mm, 15 mm (Bảng 1, Hình 4).



Hình 4. Thử nghiệm khả năng phát triển trên môi trường không có Nitơ của các chủng vi khuẩn đã phân lập

Khả năng sinh IAA

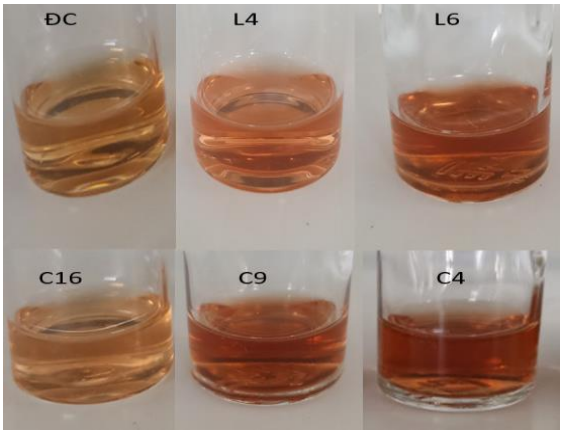
Kết quả xác định khả năng tổng hợp IAA cho thấy trong số 30 chủng được phân lập có 15 chủng có khả năng sinh IAA, dựa vào mức độ đậm nhạt của màu sắc thay đổi có thể xác định những chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp IAA cao hay thấp (Bảng 1, 2). Thí nghiệm cũng xác định 4 chủng L4, L6, C9, C4 là có tiềm năng sinh IAA cao nhất, trong đó chủng L6, C9 và C4 có dung dịch thay đổi màu sắc đậm nhất (màu nâu đậm), còn chủng L4 thì màu nhạt hơn, chủng C16 thay đổi màu sắc ít nhất và giống với sự thay đổi màu của 10 chủng còn lại (Hình 5). Qua xác định

pISSN 1859-1388
eISSN 2615-9678

hàm lượng IAA sinh ra cũng khẳng định lại khả năng sinh IAA của 4 chủng L4, L6, C9, C4 là mạnh nhất với hàm lượng theo thứ tự 34,10 µg/ml; 38,44 µg/ml; 36,98 µg/ml và 41,47 µg/ml. Ngoài ra, có 4 chủng sinh hàm lượng IAA từ 1-10 µg/ml; 5 chủng có hàm lượng IAA 11-20 µg/ml và 2 chủng có hàm lượng IAA sinh ra 21-30 µg/ml (bảng 1, 2). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi về khả năng sinh IAA của các chủng vi sinh vật nội sinh cũng phù hợp với nghiên cứu của Trần Bảo Trâm và công sự (2017) về khả năng tổng hợp IAA của vi sinh vật trong đất trồng sâm [36].

Bảng 1. Khả năng sinh tổng hợp IAA của các chủng vi sinh vật nội sinh phân lập từ rễ lan

Hàm lượng IAA (µg/ml)	Số chủng	Tỷ lệ chủng có khả năng sinh IAA (%)
0	15	50.00
1 - 10	4	13.33
11 - 20	5	16.67
21 - 30	2	6.67
>30	4	13.33
Tổng số	30	100



Hình 5. Thử nghiệm khả năng sinh IAA của các chủng vi khuẩn nội sinh đã phân lập; ĐC: ống nghiệm đối chứng (môi trường LB lỏng và thuốc thử Salkowski) L4, L6, C9, C4 các chủng vi khuẩn có sinh IAA mạnh, C16 chủng sinh IAA rất ít

Khả năng sinh NH3

Kết quả khảo sát khả năng sinh NH_3 của các chủng đã phân lập trình bày ở hình 6, trong số 30 chủng có được 18 chủng có khả năng sinh NH_3. Dựa vào màu sắc thay đổi khi cho thuốc thử nessler vào môi trường đã nuôi cấy vi khuẩn sau 48 h. Màu biểu hiện là màu vàng, nâu hoặc nâu sẫm là chứng tỏ có sự xuất hiện của NH_3, màu càng nâu đậm thì hàm lượng càng cao. Phản ứng thí nghiệm theo phương trình phản ứng:

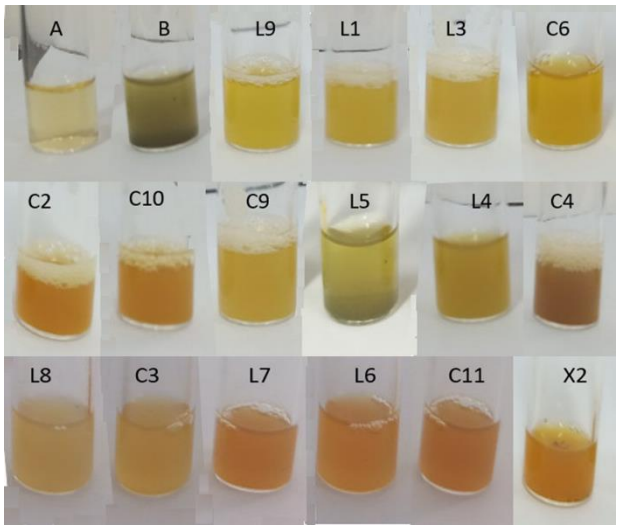
$2K_2HgI_4 + NH_3 + 3KOH \rightarrow Hg(HgIONH_2) + 7KI + 2H_2O$

(màu vàng)

$2K_2HgI_4 + NH_3 + KOH \rightarrow Hg(HgI_3ONH_2) + 5KI + H_2O$

(màu nâu)

Thí nghiệm cũng lựa chọn được 6 chủng có màu đậm nhất cho khả năng sinh NH_3 đó là chủng L4, L6, L7, C4, C11, X2 (Hình 6, bảng 1).



Hình 6. Thử nghiệm khả năng sinh NH_3 của một số chủng vi khuẩn nội sinh được lựa chọn; A, B: 2 ống nghiệm đối chứng (A: môi trường LB lỏng. B môi trường LB lỏng và thuốc thử nessler); các ống nghiệm có màu vàng, nâu sẫm là những ống nghiệm có phản ứng với thuốc thử nessler chứng tỏ có sinh NH_3

Bảng 2. Một số đặc điểm khuẩn lạc và đặc tính hoá sinh của các chủng vi khuẩn phân lập sau 72h nuôi cấy

Kí hiệu chủng	Đặc điểm khuẩn lạc			Đặc tính hoá sinh					
				Phân giải lân			Sinh NH_3	Ø khuẩn lạc trên MT Ashby (mm)	Hàm lượng IAA sinh ra (µg/ml)
	Màu sắc	Mép	Bề mặt	Ø vòng sáng phân giải và khuẩn lạc(mm)	Ø khuẩn lạc (mm)	Ø vòng sáng phân giải lân (mm)			
L1	Vàng	Lượn sóng	Trơn bóng	15	11	4	+	2	0,00
L2	Trắng đục	Lượn sóng	Trơn bóng	13	10	3	-	-	0,00
L3	Trắng sữa	Tròn đều	Trơn nhầy	16	8	8	+	11	0,00
L4	**Trắng sữa**	**Tròn đều**	**Khô ráp**	**20**	**5**	**15**	**+++**	**16**	**34,10**
L5	Trắng sữa	Tròn đều	Trơn nhầy	14	7	7	+	6	0,00
L6	**Trắng trong**	**Tròn đều**	**Trơn nhầy**	**19**	**6**	**13**	**+++**	**16**	**38,44**
L7	Vàng nhạt	Tròn đều	Trơn nhầy	16	5	11	+++	-	11,68
L8	Trắng sữa	Tròn đều	Trơn nhầy	17	8	9	++	7	0,00
L9	Trắng sữa	Tròn đều	Trơn nhầy	17	6	11	+	10	13,19
C1	Trắng trong	Lượn sóng	Khô ráp	5	5	0	-	-	0,00
C2	Vàng	Lượn sóng	Trơn nhầy	4	4	0	+	5	6.58
C3	Trắng đục	Tròn đều	Trơn nhầy	7	5	2	+	9	26,83
C4	**Trắng trong**	**Tròn đều**	**Trơn nhầy**	**21**	**6**	**15**	**+++**	**15**	**41,47**
C5	Trắng đục	Lượn sóng	Khô ráp	10	10	0	-	-	16,22
C6	Trắng trong	Lượn sóng	Trơn nhầy	6	6	0	++	-	0,00
C7	Vàng nhạt	Tròn đều	Trơn nhầy	3	3	0	-	-	11,73
C8	Trắng đục	Tròn đều	Trơn nhầy	7	7	0	-	6	7,33
C9	Trắng sữa	Tròn đều	Trơn nhầy	16	10	6	+	-	36,98
C10	Vàng nhạt	Tròn đều	Khô ráp	2	2	0	+	8	0,00
C11	Vàng	Tròn đều	Trơn nhầy	15	6	9	+++	4	0,00
C12	Trắng trong	Tròn đều	Trơn bóng	6	6	0	-	-	7,13
C13	Trắng sữa	Lượn sóng	Trơn bóng	4	4	0	-	4	0,00

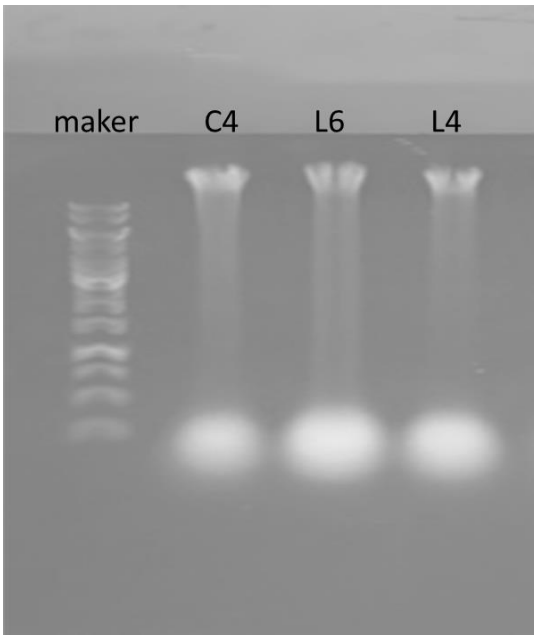
pISSN 1859-1388
eISSN 2615-9678

Kí hiệu chủng	Đặc điểm khuẩn lạc			Đặc tính hoá sinh					
				Phân giải lân					
	Màu sắc	Mép	Bề mặt	Ø vòng sáng phân giải và khuẩn lạc(mm)	Ø khuẩn lạc (mm)	Ø vòng sáng phân giải lân (mm)	Sinh NH_3	Ø khuẩn lạc trên MT Ashby (mm)	Hàm lượng IAA sinh ra (µg/ml)
C14	Trắng sữa	Lượn sóng	Khô ráp	5	5	0	-	-	17,48
C15	Trắng sữa	Lượn sóng	Trơn nhầy	8	4	4	-	6	0,00
C16	Trắng đục	Tròn đều	Trơn nhầy	10	6	4	+	6	4,61
C17	Trắng trong	Tròn đều	Trơn bóng	4	4	0	-	-	0,00
N1	Trắng trong	Tròn đều	Trơn bóng	5	2	3	-	3	22,89
N2	Trắng trong	Tròn đều	Trơn nhầy	5	3	2	+	8	0,00
X1	Cam	Lượn sóng	Trơn nhầy	5	5	0	-	2	0,00
X2	Trắng hồng	Lượn sóng	Trơn bóng	18	7	11	+++	13	0,00

Chú thích: +: có hoạt tính; ++: hoạt tính tốt; +++: hoạt tính rất tốt
-: không có hoạt tính; Ø: đường kính

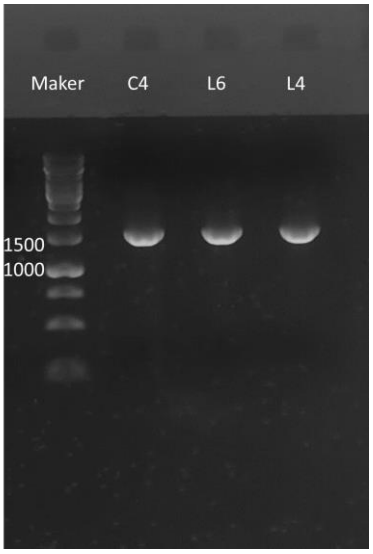
3.3 Kết quả định loại phân tử các chủng vi sinh vật nội sinh được phân lập

Dựa trên kết quả đánh giá các đặc tính hoá sinh của 30 chủng vi sinh được phân lập, đã chọn được 3 chủng có đặc tính tốt nhất về khả năng phân giải lân, khả năng cố định đạm, khả năng sinh NH_3, và khả năng sinh IAA để nhận diện bằng cách giải trình tự gen và lập cây phát sinh loài. 3 chủng được chọn đó là L4, L6 và C4. Cả 3 chủng được nuôi trong môi trường LB lỏng qua đêm để thu sinh khối phục vụ tách chiết DNA tổng số bằng phương pháp tách cột. DNA tổng số của 3 chủng đã được tách thành công (Hình 7) để dùng làm khuôn mẫu nhân gen mã hóa 16S rRNA dùng trong định loại phân tử.

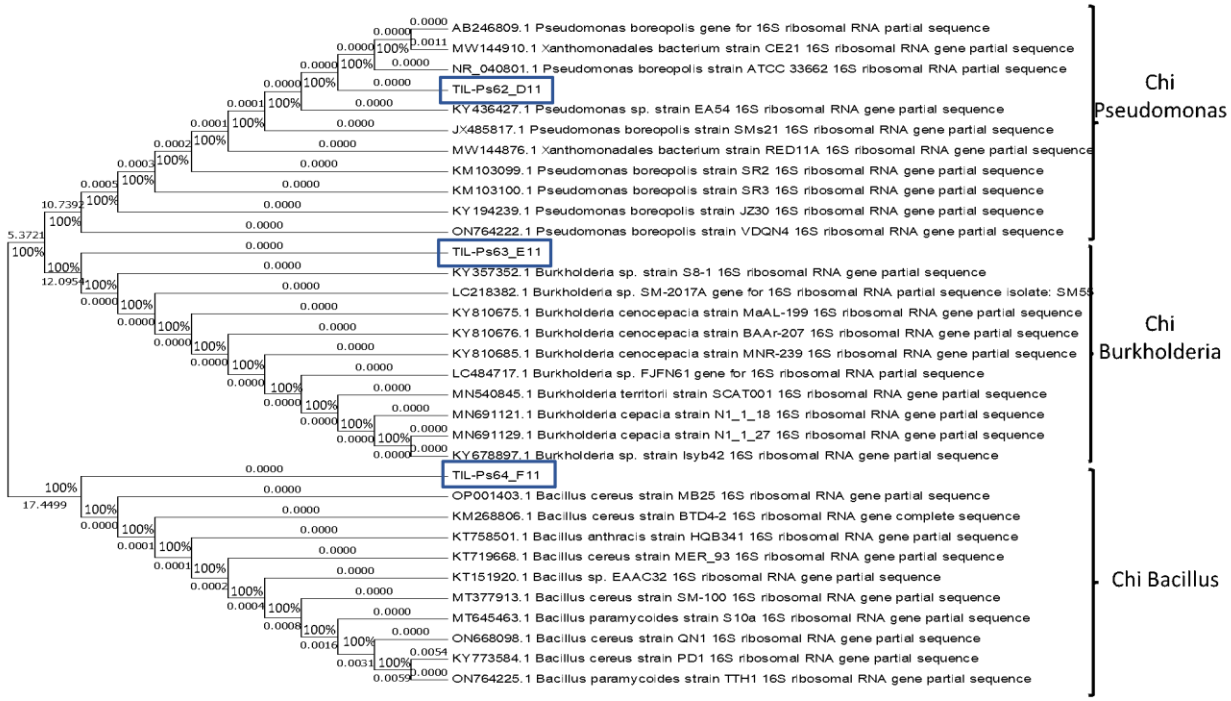


Hình 7. DNA tổng số của các chủng vi khuẩn đã phân lập. Maker: Generuler 1kb DNA ladder (Thermofisher)

Đoạn gen có kích thước khoảng gần 1500 bp đã được nhân lên ở 3 chủng nghiên cứu (Hình 8) và gửi đi giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Kết quả giải trình tự của 3 chủng vi khuẩn được sử dụng để so sánh với trình tự DNA của các dòng vi khuẩn có trong ngân hàng dữ liệu NCBI bằng phần mềm BLASTN. Kết quả cho thấy trình tự của các chủng vi khuẩn phân lập có độ tương đồng cao với các trình tự trên GenBank (98-100%), và các dòng vi khuẩn tương đồng đều thuộc các chi có đại diện là vi khuẩn nội sinh. Cụ thể, 3 chủng gửi đi giải trình tự được xác định là chủng L4 thuộc chi vi khuẩn *Burkholderia;* chủng L6 thuộc chi vi khuẩn *Bacillus*; chủng C4 thuộc chi vi khuẩn *Pseudomonas*.



Hình 8. Gen mã hóa 16S rRNA của vi khuẩn. Maker: Generuler 1kb DNA ladder (Thermofisher)



Hình 9. Cây phân loại của các chủng thuộc chi *Burkholderia.;* chi *Bacillus.; chi Pseudomonas và 3* chủng thuộc 3 chi này theo thứ tự L4 được kí hiệu TIL-Ps63_E11; L6 được kí hiệu TIL-Ps64_F11; Chủng C4 được kí hiệu TIL-Ps62_D11

pISSN 1859-1388
eISSN 2615-9678

Kết quả xây dựng cây phân loại của chủng C4 phân lập từ các mẫu lan rừng thu thập được trong quá trình nghiên cứu, cho thấy nó có mức độ tương đồng cao với các chủng *Pseudomonas* khác với độ tương đồng 99-100% như các chủng ON764222.1; KY194239.1; KM103100.1,… điều này có thể khẳng định rằng chủng C4 được lựa chọn là chủng thuộc chi *Pseudomonas* và đặc biệt chủng C4 rất gần với loài *Pseudomonas boreopolis* với mức tương đồng 100%, vì vậy chủng C4 cũng thuộc dòng vi khuẩn này (Hình 9). Các đặc tính hoá sinh của chi vi khuẩn *Pseudomonas* trong nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của Oliveira Danyllo Amaral de và cộng sự về *Pseudomonas* [37], tương tự trong nghiên cứu của Đỗ Thành Luân và cộng sự về khả năng sinh IAA và cố định đạm của vi khuẩn nội sinh trong đó có *Pseudomonas* [38].

Kết quả giải trình tự của chủng L6 cũng được sử dụng để tìm kiếm các trình tự tương đồng bằng BLASTN trên NCBI, kết quả các trình tự tìm kiếm có mức tương đồng rất cao 99 -100%, đều thuộc chi *Bacillus* như các vi khuẩn có mã đăng ký ON764225.1; ON668098.1 MT645463.1, … điều này chứng tỏ chủng vi khuẩn đã phân lập L6 thuộc chi vi khuẩn *Bacillus.* Đặc biệt là gần với dòng *Bacillus cereus* (hình 9) với mức tương đồng là 100%. Vì vậy có thể xem chủng L6 là dòng vi khuẩn *Bacillus cereus*. Những đặc điểm về hoạt tính hoá sinh của chủng vi khuẩn này cũng tương đồng với nghiên cứu đã có của Akhtar Nosheen và cộng sự [39], hay trong nghiên cứu của Nguyễn Đức Thành và cộng sự [40].

Giống với chủng C4 và L6, kết quả tìm kiếm trình tự tương đồng với trình tự của chủng L4 trên NCBI cũng có mức tương đồng rất cao với chi vi khuẩn *Burkholderia***.** Các chủng như KY678897.1; MN691129.1; MN691121.1, …mức độ tương đồng với chủng L4 là 98-99.5%. Kết quả này cũng khẳng định được chủng vi khuẩn nội sinh L4 phân lập được thuộc chi vi khuẩn *Burkholderia* (Hình 9)**.** Được định danh là chủng *Burkholderia* sp. với mức tương đồng là 99.5 %, đây cũng là một chi vi khuẩn có nhiều đại diện vi khuận nội sinh cho sự phát triển của thực vật, các hoạt tính của *Burkholderia* sp. trong nghiên cứu này cũng tương đồng với nghiên cứu của Hau-Hsuan Hwang và cộng sự [41].

Như vậy trong nghiên cứu này 3 chủng vi khuẩn được lựa chọn để định danh có mức tương đồng khá cao với các chủng liên quan đã được công bố trước đó, và cũng là những chi vi khuẩn có các loài vi khuẩn nội sinh phổ biến, được ứng dụng nhiều trong trong lĩnh vực sản xuất phân bón, chế phẩm vi sinh.

4 Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập được 30 chủng vi khuẩn nội sinh từ một số giống lan rừng, các chủng có sự đa dạng về hình thái khuẩn lạc và đặc điểm hoá sinh. Có 18/30 chủng có khả năng phân giải lân; 15/30 chủng có khả năng sinh IAA; 16/30 chủng có khả năng cố định đạm phát triển trên môi trường Ashby agar; và 18/30 chủng có khả năng sinh NH_3. Nghiên cứu đã lựa chọn 3 chủng có hoạt tính hóa sinh cao lần lượt được xác định là chủng L4 thuộc chi vi khuẩn *Burkholderia;* chủng L6 thuộc chi vi khuẩn *Bacillus*; chủng C4 thuộc chi vi khuẩn *Pseudomonas*.

Hỗ trợ tài chính

Nghiên cứu này được hỗ trợ thông qua nhóm nghiên cứu mạnh, mã số NCM.DHH2020.13.

Mâu thuẫn lợi ích

Các tác giả tuyên bố không có mâu thuẫn nào liên quan đến việc xuất bản bài báo này.

Tài liệu tham khảo

1. Christina A, Christapher V, Bhore SJ. Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: An overview. Pharmacogn Rev [Internet]. 2013;7:11-16.
2. Souza R de, Ambrosini A, Passaglia LMP. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. Genet Mol Biol [Internet]. 2015;38:401-419.
3. Ahmed M, Hussain M, Dhar MK Isolation of microbial endophytes from some ethnomedicinal plants of Jammu and Kashmir. J Nat Prod Plant Resour. 2012;2:215-220.
4. Strobel G, Daisy B, Castillo U Natural products from endophytic microorganisms. J Nat Prod. 2004;67:257-268.
5. Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF Bacterial endophytes in agricultural crops. Can J Microbiol. 1997;43:895-914.
6. Reinhold-Hurek B, Hurek T. Living inside plants: bacterial endophytes. Curr Opin Plant Biol. 2011;14:435-443.
7. Singh JS. Plant growth promoting rhizobacteria. Resonance. 2013;18:275-281.
8. White JF, Kingsley KL, Zhang Q Endophytic microbes and their potential applications in crop management. Pest Manag Sci. 2019;75:2558-2565.
9. Tsavkelova E. Bacteria associated with orchid roots. Bact Agrobiol plant growth responses. 2011;221-258.
10. Teixeira da Silva JA, Tsavkelova EA, Zeng S Symbiotic in vitro seed propagation of Dendrobium: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development. Planta. 2015;242:1-22.
11. Hợp T. Phong lan Việt Nam. Hà Nội: NXB Nông Nghiệp Hà Nội; 1988.
12. Faria D, Dias A, Melo I Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth. World J Microbiol Biotechnol. 2012;29.
13. Shah S, Chand K, Rekadwad B A prospectus of plant growth promoting endophytic bacterium from orchid (Vanda cristata). BMC Biotechnol. 2021;21:16.
14. Herrera H, Sanhueza T, Novotná A Isolation and identification of endophytic bacteria from mycorrhizal tissues of terrestrial orchids from southern Chile. Diversity. 2020;12:55.
15. Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Netrusov AI. Bacteria associated with the roots of epiphytic orchids. Microbiology. 2004;73:710-715.
16. Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Botina SG Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. Microbiol Res. 2007;162:69-76.
17. Shah S, Shah B, Sharma R. Colonization with non-mycorrhizal culturable endophytic fungi enhances orchid growth and indole acetic acid production. BMC Microbiol. 2022;22:101.
18. Chand K, Shah S, Sharma J. Isolation, characterization, and plant growth-promoting activities of endophytic fungi from a wild orchid Vanda cristata. Plant Signal Behav. 2020;15:1744294.
19. Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Lobakova ES. Microbiota of the Orchid rhizoplane. Mikrobiologiia. 2001;70:567-573.
20. Schmidt KL, Peterson ND, Kustusch RJ. A predicted ABC transporter, FtsEX, is needed for cell division in Escherichia coli. J Bacteriol. 2004;186:785-793.
21. Kumar A, Singh R, Yadav A Isolation and characterization of bacterial endophytes of Curcuma longa L. 3 Biotech. 2016;6:60.
22. Lynh NHN, Hiệp NH. Tuyển chọn vi khuẩn có khả năng cố định đạm, hòa tan lân, tổng hợp IAA nội sinh trong cây cà phê vối (Coffea canephora Pierre ex A. froehner) trồng tại tỉnh Đắk Lắk. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 2019;55:34-40.
23. Minh NT, Thu ĐM. Nghiên cứu phân lập và tuyển chọn vi sinh vật nội sinh từ vùng sinh thái đất mặn huyện giao thuỷ,tỉnh Nam Định. Tạp chí khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 2017;1022-1032.
24. Đức VTM. Thực tập vi sinh vật học. Hà Nội: NXB Đại học Quốc Gia Hà Nội; 2001.
25. Puente ME, Bashan Y, Li CY. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. Plant Biol. 2004;6:629-642.
26. Giang NV, Thu PP, Hà CĐ. Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn phân giải lân, kali khó tan từ đất trồng cà phê tại khu vực Tây Nguyên. Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam. 2018;60.

pISSN 1859-1388
eISSN 2615-9678

27. Lan PTN, Xuân LTT, Châu NTB. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cố định nitrogen từ đất trồng rau ở thành phố pleiku,tỉnh Gia lai. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Trường Đại học Khoa học Huế, ĐH Huế. 2020.

28. Cappuccino, J. C.; Sherman N. Microbiology: A laboratory manual. 3. ed. New York Benjamin/Cummings Pub. 1992;125-179.

29. Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiol Res. 2008;163:173-181.

30. Kifle MH, Laing MD. Isolation and screening of bacteria for their diazotrophic potential and their influence on growth promotion of maize seedlings in greenhouses. Front Plant Sci. 2016;6:1225.

31. K.Geetha, E.Venkatesham, A.Hindumathi. Original Research Article Isolation, screening and characterization of plant growth promoting bacteria and their effect on Vigna Radita (L.) R.Wilczek. Int J Curr Microbiol Appl Sci. 2014;3(6):977-809.

32. Bric JM, Bostock RM, Silverstone SE. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. Appl Environ Microbiol. 1991;57:535-538.

33. Russell DW, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor; 2001.

34. Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. J Microbiol Methods. 2003;55:541-555.

35. Thi Thuy DN, Hà ĐTT, Nhứt ĐT. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn nội sinh trong cây Thù lù cạnh (Physalis angulata L.) có khả năng kháng khuẩn ở khu vực thành phố Cần Thơ. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 2019;55:10-20.

36. Trâm TB, Hiền NT, Sơn PH. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn sinh tổng hợp IAA (Indole Acetic Acid) từ đất trồng sâm Việt Nam ở Quảng Nam. Tạp chí Khoa học ĐHQGHN Khoa học Tự nhiên và Công nghệ. 2017;33(2):219-226.

37. Oliveira DA de, Ferreira S da C, Carrera DLR. Characterization of Pseudomonas bacteria of Piper tuberculatum regarding the production of potentially bio-stimulating compounds for plant growth. Acta Amaz. 2021;51:10-19.

38. Luân ĐT, Nghĩa NK. Khảo sát khả năng kích thích nảy mầm và sinh trưởng rau muống của một số dòng vi khuẩn cố định đạm và tổng hợp IAA. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 2020;56:37-46.

39. Akhtar N, Ilyas N, Yasmin H. Role of Bacillus cereus in Improving the Growth and Phytoextractability of Brassica nigra (L.) K. Koch in Chromium Contaminated Soil. Molecules. 2021;26.

40. Thành NĐ, Quyết NT, Hằng ĐTT. Đặc điểm sinh học và định danh chủng vi khuẩn Bacillus altitudinis T1008 phân lập từ đất nhiễm mặn. Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam. 2020;62.

41. Hwang H-H, Chien P-R, Huang F-C. A Plant Endophytic Bacterium, Burkholderia seminalis Strain 869T2, Promotes Plant Growth in Arabidopsis, Pak Choi, Chinese Amaranth, Lettuces, and Other Vegetables. Microorganisms. 2021;9:1703.