

Sàng lọc và nghiên cứu một số chủng vi khuẩn vùng rễ kích thích sinh trưởng phân lập từ cây nghệ vàng (*Curcuma longa* L.) tại Việt Nam

Hoàng Kim Chi^{1,2}, Nguyễn Đình Tuấn¹, Trần Hồ Quang³, Nguyễn Thành Lam⁴, Lê Hữu Cường¹, Trần Thị Hồng Hà¹, Lê Mai Hương¹, Trần Thị Như Hằng^{1*}

¹Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

²Học viện KH&CN, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

³Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

⁴Bộ Tài nguyên và Môi trường

Ngày nhận bài 16/9/2019; ngày chuyển phản biện 19/9/2019; ngày nhận phản biện 20/10/2019; ngày chấp nhận đăng 29/11/2019

Tóm tắt:

Từ các mẫu đất thu tại vùng chuyên canh cây nghệ vàng (*Curcuma longa* L.) ở Hưng Yên, nhóm nghiên cứu đã phân lập được 9 chủng vi khuẩn có khả năng hòa tan phosphate vô cơ. Trong số các chủng phân lập, PGP-V5, PGP-V20 và PGP-V21 được xác định có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật IAA (indole acetic acid) với hàm lượng 63,11-73,87 ppm. Bằng phương pháp sinh học phân tử kết hợp với nghiên cứu các đặc điểm sinh lý, sinh hóa, đã xác định được vị trí phân loại học của các chủng lựa chọn, lần lượt là *Bacillus* sp. PGP-V5, *Enterobacter* sp. PGP-V20 và *Bacillus* sp. PGP-V21. Đặc biệt, qua thử nghiệm trên đĩa thạch, chủng *Bacillus* sp. PGP-V21 còn biểu hiện khả năng kháng nấm gây bệnh thực vật *Aspergillus niger* và *Fusarium oxysporum*. Vì vậy có thể nói, kết quả sàng lọc và nghiên cứu đặc tính các chủng vi khuẩn vùng rễ kích thích sinh trưởng đạt được sẽ là cơ sở cho việc tạo ra chế phẩm sinh học hiệu quả và an toàn không chỉ cho cây nghệ vàng *C. longa* mà còn cho một số cây trồng tại khu vực Đồng bằng Bắc Bộ.

Từ khóa: *Curcuma longa* L., hoạt tính kháng nấm, hòa tan phosphate, kích thích sinh trưởng thực vật, sinh IAA, vi khuẩn vùng rễ.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Vùng rễ thực vật được định nghĩa là vùng đất mỏng bao quanh rễ, có đặc điểm giàu dinh dưỡng, là nơi sống của nhiều loài vi sinh vật quan trọng cho sinh trưởng và phát triển của cây trồng [1]. Trong hệ sinh thái đất vùng rễ, sự tương tác giữa rễ cây, đất và vi sinh vật làm thay đổi đáng kể tính chất vật lý, hóa học của đất và đặc điểm sinh học của thực vật [1, 2]. Vi khuẩn vùng rễ kích thích sinh trưởng thực vật (plant growth promoting rhizobacteria - PGPR) là nhóm vi khuẩn cư trú ở vùng rễ và có tác động tích cực trực tiếp hoặc gián tiếp tới sinh trưởng của thực vật [3, 4]. Trong những thập kỷ vừa qua, nhiều loài vi khuẩn PGPR đã được phát hiện và nghiên cứu, bao gồm một số loài thuộc các chi *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Serratia*... [5-7]. Trên cơ sở những tác dụng đáng kể của PGPR trong kích thích sinh trưởng và phát triển ở thực vật, nhóm vi sinh vật này đang được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu với mục tiêu tạo chế phẩm sinh học giúp nâng cao chất lượng

cây trồng, trong đó có nhiều loại cây thuốc. Có thể nói, việc tìm ra những chủng vi khuẩn PGPR cộng sinh với cây được liệu sẽ là cơ sở để tạo ra chế phẩm sinh học đặc trưng giúp làm tăng chất lượng cây trồng, đặc biệt là tăng sinh khối và hàm lượng các hoạt chất trong thực vật. Đây là một hướng đi có ý nghĩa to lớn đối với sản xuất cây thuốc nguyên liệu, đặc biệt trong điều kiện biến đổi khí hậu hiện nay.

Nghiên cứu về vi khuẩn vùng rễ của một số loài cây được liệu được coi là vấn đề quan trọng, bởi chúng đã được chứng minh là có tác động tích cực lên sự phát triển và sự tạo thành các hợp chất thứ cấp cũng như đến chất lượng của cây thuốc [8]. Cây nghệ vàng (*Curcuma longa* L.) là một loại cây trồng có củ thuộc họ Gừng (*Zingiberaceae*), phổ biến tại khu vực nhiệt đới, đặc biệt là một số nước châu Á như Ấn Độ, Trung Quốc, Indonesia và Việt Nam [9]. Trong khoảng hai thập kỷ gần đây, nhu cầu tạo vùng nguyên liệu sản xuất nghệ chất lượng cao để phục vụ cho công nghiệp được ở nước ta trở nên ngày một cần thiết.

Chính vì vậy, chúng tôi đã thực hiện phân lập và nghiên

*Tác giả liên hệ: Tel: 0912736970; Email: hangmy97@yahoo.com

Screening and characterisation of plant growth promoting rhizobacteria isolated from turmeric plant (*Curcuma longa* L.) in Vietnam

Kim Chi Hoang^{1,2}, Dinh Tuan Nguyen¹, Ho Quang Tran³, Thanh Lam Nguyen⁴, Huu Cuong Le¹, Thi Hong Ha Tran¹, Mai Huong Le¹, Thi Nhu Hang Tran^{1*}

¹Institute of Natural Products Chemistry, VAST

²Graduate University of Science and Technology, VAST

³Institute of Biotechnology, VAST

⁴Ministry of Natural Resources and Environment

Received 16 September 2019; accepted 29 November 2019

Abstract:

From rhizosphere soils of turmeric plant (*Curcuma longa* L.) collected in Hungyen province (Vietnam), nine inorganic phosphate solubilising bacterial strains were isolated. Among them, PGP-V5, PGP-V20, and PGP-V21 were identified as potent IAA producing strains with the amount ranging from 63.11 to 73.87 ppm. The strains were morphologically, physiochemically and molecular-biologically determined as *Bacillus* sp. PGP-V5, *Enterobacter* sp. PGP-V20, and *Bacillus* sp. PGP-V21. The strain *Bacillus* sp. PGP-V21 exhibited antifungal activities against fungal strains of *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum* in a plate-based test. The results showed that the selected microbial strains can be used for preparing effective biofertilisers not only for *C. longa* but also for other crops in the Red River Delta.

Keywords: antifungal activity, *Curcuma longa* L., IAA production, phosphate solubilising, plant growth promoting, rhizobacteria.

Classification number: 4.6

cứ đặc tính của một số chủng vi khuẩn PGPR từ đất trồng cây nghệ vàng (*C. longa* L.) nhằm xây dựng bộ chủng vi sinh vật hữu hiệu để tạo chế phẩm sinh học an toàn và hiệu quả cho loài cây thuốc này.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Nguyên vật liệu

Mẫu đất: các mẫu đất vùng rễ được thu tại vùng chuyên canh cây nghệ vàng ở xã Đại Tập, huyện Khoái Châu, tỉnh Hưng Yên có tọa độ 20°47'27"N, 105°56'46"E.

Các chủng vi sinh vật kiểm định: bộ chủng vi sinh vật kiểm định được cung cấp từ Phòng sinh học thực nghiệm thuộc Viện Hoá học các hợp chất thiên nhiên, gồm có 2 chủng nấm mốc là *Aspergillus niger* ATCC 6275 và *Fusarium oxysporum* VTCC-Y-62.

Trình tự cấp môi để nhân bản đoạn gen 16S rDNA của các chủng vi khuẩn được khảo sát: Pr16F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và Pr16R (5'-TACGGTTACCTTGTACCGACTT-3').

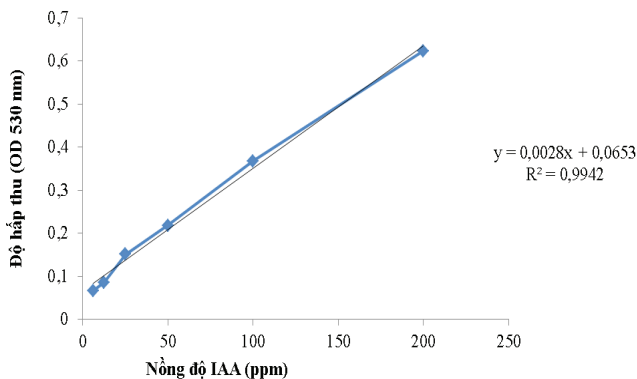
Phương pháp nghiên cứu

Thu mẫu: các mẫu đất vùng rễ (bao gồm cả phần rễ cây) được lấy ở độ sâu 10-15 cm dưới mặt đất bằng các dụng cụ thu mẫu vô trùng. Sau khi thu, mẫu được giữ trong các túi nilon sạch và được bảo quản ở 4°C cho đến khi tiến hành phân lập vi khuẩn [10].

Phân lập vi khuẩn vùng rễ có khả năng hòa tan phosphate vô cơ: phân lập vi khuẩn có khả năng hòa tan phosphate vô cơ theo phương pháp của Gerretsen (1948) với một số thay đổi theo điều kiện thí nghiệm [11]. Dùng kẹp vô trùng gạt phần đất mỏng bám trên rễ cây nghệ vàng vào đĩa petri sạch để thu phần đất vùng rễ phục vụ phân lập. Lấy 5 g đất vùng rễ cho vào các bình tam giác 100 ml có chứa 45 ml dung dịch đệm PBS 100 mM [công thức (g/l): NaCl 8,5, Na₂HPO₄ 1,91, KH₂PO₄ 0,38, pH=7-7,5], sau đó lắc đều (120 vòng/phút) trong vòng 10 phút. Sau khi pha loãng liên tục dung dịch đất bằng đệm PBS tới nồng độ 10⁻⁷, hút 0,1 ml dịch và cấy trải trên đĩa thạch IPA [công thức (g/l): glucose 10, NH₄Cl 5, NaCl 1, MgSO₄.7H₂O 1, Ca₃(PO₄)₂ 0,8, agar 15, pH=7,2] [12]. Ủ các đĩa thạch ở nhiệt độ 30°C và quan sát sự hình thành khuẩn lạc trên các đĩa phân lập sau mỗi 24h. Các khuẩn lạc vi khuẩn có vòng phân giải cơ chất trên đĩa thạch được chọn lọc và cấy ria trên đĩa thạch LB [công thức (g/l): casein 10, cao nấm men 5, NaCl 10, agar 15, pH=7,5] để lựa chọn bộ chủng tinh sạch.

Xác định khả năng sinh IAA: khả năng sinh IAA của các chủng vi sinh vật được xác định theo phương pháp Salkowski cải tiến [13]. Dịch nuôi của các chủng vi khuẩn trong môi trường King's B [công thức (g/l): Proteose peptone 20, K₂HPO₄ 1,15, MgSO₄.7H₂O 1,5, glycerol 1,5, L-tryptophan 1, agar 15, pH 7,2] (30°C, 24h) được thu và ly tâm (12.000 vòng/phút, 15 phút). Hút 1 ml phần dịch sau ly tâm cho

vào các ống Durham, thêm 2 ml thuốc thử Salkowski [dung dịch FeCl_3 0,5 M trong dung dịch perchloric acid (HClO_4) 35% tỷ lệ 1:50 v/v] và ủ trong bóng tối (30°C , 10 phút) để phản ứng xảy ra hoàn toàn. Tiến hành đo độ hấp thụ quang phổ (OD) ở bước sóng 530 nm. Từ kết quả đo OD_{530 nm} và phương trình đồ thị đường chuẩn (hình 1), nồng độ IAA đo các đồng vi khuẩn tạo ra được xác định.



Hình 1. Đường chuẩn tương quan giữa nồng độ IAA và mật độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 530 nm.

Xác định hoạt tính kháng nấm: hoạt tính kháng vi sinh vật của các chủng vi khuẩn được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch theo Ahmad và cs (1998) [14]. Các chủng nấm kiểm định được nuôi trên môi trường thạch Sabouraud [công thức (g/l): glucose 40, peptone 10, agar 15, pH=7,2], sau 72h bào tử nấm hình thành trên đĩa thạch được thu và hòa vào 10 ml dung dịch NaCl 0,85%. Sau khi được pha loãng tới mật độ 10^5 CFU/ml, hút 0,1 ml dịch bào tử nấm và cấy trải trên đĩa petri chứa môi trường thạch Muller Hinton (Himedia, Ấn Độ). Hút 0,2 ml dịch nuôi chủng vi khuẩn thử nghiệm ($\approx 2 \times 10^7$ CFU/ml) nhỏ vào các giếng thạch đục trên đĩa petri chứa bào tử nấm kiểm định. Sau 5 ngày nuôi ở 30°C , kiểm tra sự hình thành các vòng vô khuẩn trên đĩa thạch xung quanh các giếng thử nghiệm.

Xác định đặc tính vi khuẩn: các chủng có hoạt tính tốt sẽ tiếp tục được xác định các đặc điểm hình thái hiển vi và các chỉ tiêu sinh lý, sinh hóa theo khóa phân loại Bergey [15], bao gồm: nhuộm Gram, tính hiếu khí, vi hiếu khí, khả năng di động, khả năng sinh enzyme catalase, oxidase, urease, H_2S , khả năng acid hóa các nguồn đường (glucose, fructose, galactose, arabinose, xylose), khả năng đồng hóa tinh bột, nhiệt độ và pH tối ưu cho sinh trưởng.

Định danh các chủng vi khuẩn được chọn lọc dựa trên trình tự đoạn gen 16S rDNA:

ADN tổng số của các chủng PGPR lựa chọn được tách theo quy trình mô tả bởi Mirza và cs (2001) [16].

ADN tổng số của vi khuẩn được sử dụng làm nguyên liệu cho phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen 16S rDNA

để phục vụ giải trình tự. Mỗi phản ứng PCR (50 μl) gồm 0,5 μl Taq DNA polymerase (5 U/ μl , Fermentas), 5 μl Taq buffer (Fermentas), 5 μl dNTPs (200 μM), 5 μl (100 ng/ μl) mỗi Pr16F, 5 μl Pr16R, 24,5 μl H_2O và 1 μl ADN tổng số. Quá trình phản ứng được thực hiện trên hệ PCR system 2720 (Applied Biosystems, Singapore) với các bước như sau: 94°C trong 5 phút, tiếp theo là 34 chu kỳ (94°C trong 1 phút, 55°C trong 1,5 phút, 72°C trong 2 phút), 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit QIAquick spin (QIAGEN) trước khi giải trình tự.

Trình tự đoạn gen 16S rDNA của các chủng vi khuẩn được đọc trên máy Perkin-Elmer (ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems) sử dụng kit giải trình tự AmpliTaqFS DNA polymerase (Applied Biosystems) và được phân tích so sánh với các trình tự đã công bố trên ngân hàng GenBank bằng công cụ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Xây dựng cây phân loại bằng công cụ so sánh được thực hiện bởi phần mềm BioEdit [17] và MEGA X [18, 19].

Kết quả và thảo luận

Phân lập vi khuẩn vùng rễ có khả năng hòa tan phosphate và xác định khả năng sinh IAA

Cùng với đạm và kali, lân được coi là nguồn dinh dưỡng quan trọng nhất cho thực vật. Mặc dù trong đất trồng luôn có một lượng lớn lân nhưng chúng phần lớn tồn tại ở dạng không tan và khó hấp thụ, vì vậy hoạt động của các vi khuẩn giúp chuyển hóa lượng lân vô cơ thành dạng tan có ý nghĩa rất lớn đối với dinh dưỡng cho cây trồng. Từ các mẫu đất vùng rễ, đã phân lập được 9 chủng vi khuẩn biểu hiện khả năng hòa tan phosphate vô cơ trên đĩa thạch. Khả năng hoà tan phosphate được đánh giá bằng cách đo đường kính (ĐK) phân giải cơ chất bằng công thức: ĐK (mm) = D-d; trong đó D là đường kính vòng phân giải cơ chất và d là đường kính khuẩn lạc vi khuẩn. Đường kính vòng phân giải của 9 chủng vi khuẩn phân lập trên môi trường có cơ chất tri-calcium phosphate [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Khả năng hòa tan phosphate và sinh tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn.

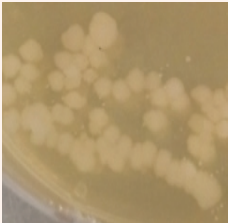
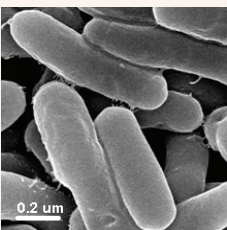

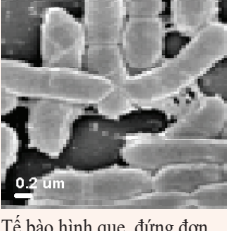
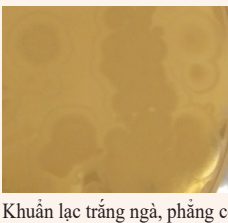
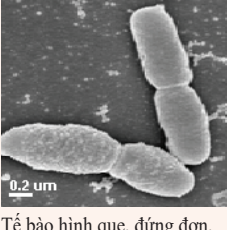
STT	Ký hiệu chủng	Khả năng hòa tan phosphate (D-d, mm)	Khả năng sinh tổng hợp IAA (ppm)
	PGP-V2	3	24,80±2,21
	PGP-V4	5	9,66±1,72
	PGP-V5	3	67,51±2,11
	PGP-V15	5	35,47±3,05
	PGP-V18	3	26,82±1,46
	PGP-V20	4	77,87±2,78
	PGP-V21	6	63,11±2,09
	PGP-V22	4	11,61±1,85
	PGP-V24	4	45,81±2,89

Các chủng vi khuẩn chọn lọc được ở bước sàng lọc khả năng hoà tan phosphate tiếp tục được khảo sát và đánh giá khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật IAA. Kết quả sàng lọc (bảng 1) cho thấy, tất cả 9 chủng thí nghiệm đều biểu hiện hoạt tính sinh IAA với mức độ khác nhau, trong đó các chủng PGP-V5, PGP-V20 và PGP-V21 sinh IAA với lượng lớn nhất (trên 60 ppm), vì vậy được lựa chọn để nghiên cứu thêm một số đặc điểm phân loại học, bao gồm đặc điểm hình thái, các đặc điểm sinh lý, sinh hóa và phân tích trình tự đoạn gen đặc trưng (gen 16S rRNA).

Đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và phân loại học của các chủng vi khuẩn lựa chọn

Đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên đĩa thạch chứa môi trường LB của các chủng vi khuẩn được xác định dựa trên quan sát bằng mắt thường. Đặc điểm hình thái hiển vi và kích thước tế bào vi khuẩn được xác định bằng quan sát dưới kính hiển vi Olympus (Japan) với độ phóng đại x1000. Kết quả được tóm tắt ở bảng 2.

Bảng 2. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và hiển vi của các chủng vi khuẩn.

Tên chủng	Hình thái khuẩn lạc	Hình thái hiển vi tế bào
PGP-V5	 Khuẩn lạc trắng vàng, tròn, đường kính 1,5 mm, bề mặt lồi, tròn bóng, không sinh sắc tố	 Tế bào hình que, đứng đơn, kích thước 0,6-1,8 µm
PGP-V20	 Khuẩn lạc trắng ngà, tròn nhỏ đều, đường kính 0,8 mm, bề mặt lồi, tròn, bóng, không sinh sắc tố	 Tế bào hình que, đứng đơn, kích thước 0,8-3,0 µm
PGP-V21	 Khuẩn lạc trắng ngà, phẳng có viền trong bao quanh, vô định hình, đường kính 1,5 mm, không sinh sắc tố	 Tế bào hình que, đứng đơn, kích thước 1,0-2,5 µm

Để xác định đặc điểm sinh lý và sinh hóa của các chủng vi khuẩn, chúng tôi đã thực hiện một số thử nghiệm liên quan đến tính bắt màu trong nhuộm Gram, tính hiếu khí, vi hiếu khí, khả năng di động, khả năng sinh enzyme catalase, oxidase, urease, H₂S, acid hóa các nguồn đường C6 (glucose, fructose, galactose), C5 (arabinose, xylose) và đường đôi (sucrose), khả năng thủy phân tinh bột, khoảng nhiệt độ và pH tối ưu cho sinh trưởng. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của các chủng vi khuẩn lựa chọn.

TT	Đặc điểm	PGP-V5	PGP-V20	PGP-V21
1	Gram	+	-	+
2	Nội bào tử	+	-	+
3	Hiếu khí	+	+	+
4	Vi hiếu khí	-	-	-
5	Khả năng di động	-	-	-
6	Sinh enzyme catalase	+	+	+
7	Sinh enzyme oxidase	+	-	+
8	Sinh enzyme urease	-	-	-
9	Sinh H ₂ S	+	-	-
10	Khả năng acid hóa các nguồn đường:			
	Glucose	+	+	+
	Fructose	-	+	+
	Galactose	+	-	-
	Arabinose	+	+	-
	Xylose	-	+	-
	Sucrose	-	+	+
11	Khả năng thủy phân tinh bột	-	+	+
12	Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng	28-32°C	28-32°C	30-37°C
13	pH thích hợp cho sinh trưởng	6,0-7,5	6,0-7,5	6,5-7,0

Đối chiếu các đặc điểm hình thái (bảng 2), sinh lý và sinh hóa (bảng 3) với khóa phân loại Bergey [15], đã xác định được PGP-V5 là chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus* spp. 3 (bao gồm *B.adius*, *B. insolitus*, *B. laterosporus*, *B. pasteurii*, *B. marinus* và *B. sphaericus*), PGP-V20 thuộc nhóm Enterobacteriaceae 2 (bao gồm *Enterobacter intermedius*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. amnigenus*, *Erwinia carotovora* và *Serratia rubidaea*), PGP-V21 là vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus* spp. 1 (bao gồm *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. polymyxa*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. alvei*, *B. anthracis* và *B. coagulans*).

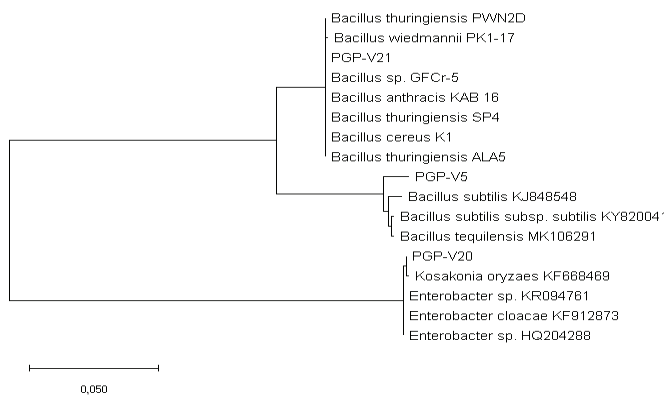
Kết quả giải trình tự và phân tích đoạn gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn cho thấy, đoạn trình tự gen 16S rRNA của chủng PGP-V5 tương đồng 97,97-98,08% với các đoạn tương ứng của các chủng vi khuẩn thuộc *Bacillus* sp., *B. subtilis* và *B. tequilensis*; chủng PGP-V20 tương đồng 99,31% với các đoạn tương ứng của các chủng vi khuẩn

thuộc *Kosakonia oryzae* (tên cũ: *Enterobacter oryzae* [20]), *Enterobacter* sp., *Kosakonia* sp. và chủng PGP-V21 tương đồng 99,80-99,90% với các đoạn tương ứng của các chủng vi khuẩn thuộc *B. thuringiensis*, *Bacillus* sp., *B. anthracis* và *B. cereus* (bảng 4).

Bảng 4. Kết quả tìm kiếm các đoạn trình tự tương đồng trên ngân hàng gen với đoạn 16S rDNA của các chủng vi khuẩn lựa chọn.

Tên chủng vi khuẩn	Kết quả tìm kiếm trên ngân hàng gen				
	Vi sinh vật có trình tự tương đồng	Total score	Query coverage	Độ tương đồng (%)	Sequence ID
PGP-V5	<i>Bacillus</i> sp.	1615	99%	98,07%	KU667123.1
	<i>Bacillus subtilis</i>	1615	99%	97,97%	KJ848548.1
	<i>Bacillus subtilis</i>	1615	99%	98,08%	KC465728.1
	<i>Bacillus subtilis</i>	1611	99%	98,07%	KY820041.1
	<i>Bacillus tequilensis</i>	1609	99%	98,07%	MK106291.1
PGP-V20	<i>Kosakonia oryzae</i>	1825	99%	99,31%	KT275833.1
	<i>Kosakonia oryzae</i>	1825	99%	99,31%	CP014007.1
	<i>Enterobacter</i> sp.	1825	99%	99,31%	KR094761.1
	<i>Kosakonia</i> sp.	1825	99%	99,31%	KM253162.1
	<i>Kosakonia oryzae</i>	1825	99%	99,31%	KF668469.1
PGP-V21	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1860	100%	99,90%	MK026854.1
	<i>Bacillus</i> sp.	1857	100%	99,80%	KC693736.1
	<i>Bacillus anthracis</i>	1857	100%	99,80%	JX971515.1
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1855	100%	99,80%	MG270578.1
	<i>Bacillus cereus</i>	1855	100%	99,80%	MK045762.1

Dựa trên các kết quả tìm kiếm được trên ngân hàng gen, kết hợp với phân tích ClustalW alignment (phần mềm BioEdit) và phân tích Maximum likelihood (phần mềm MEGA) đã xây dựng được cây phân loại của các chủng PGP-V5, PGP-V20 và PGP-V21 (hình 2). Kết hợp với các đặc điểm hình thái, sinh lý, hóa sinh (bảng 2 và 3) và khóa phân loại của Bergey đã xác định được các chủng lựa chọn là *Bacillus* sp. PGP-V5, *Enterobacter* sp. V20 và *Bacillus* sp. V21.



Hình 2. Cây phân loại của các chủng PGP-V5, PGP-V20, PGP-V21 và một số chủng vi sinh vật đã biết dựa trên trình tự đoạn 16S rRNA gen đã công bố (phân tích sử dụng phần mềm MEGA, phương pháp maximum likelihood với 1000 bootstrap replicates).

Năm 2016, tại Ấn Độ, Kumar và cs [21] đã phân lập được 9 chủng vi khuẩn vùng rễ của cây nghệ vàng *C. longa* và xác định vị trí phân loại thuộc các chi *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Klebsiella* và *Pseudomonas*. Kết quả này không đồng nhất với nghiên cứu của chúng tôi, có thể do phân bố của các vi khuẩn trong vùng rễ không chỉ phụ thuộc vào đặc tính di truyền của cây chủ, mà còn liên quan đến nhiều yếu tố khác như điều kiện địa lý và chế độ canh tác. Đây không phải lần đầu tiên các chủng vi khuẩn PGPR của cây nghệ vàng *C. longa* được phân lập và xác định đặc tính, nhưng kết quả nghiên cứu này đã phát hiện ra một số chủng vi khuẩn có vị trí phân loại mới và có tính đặc trưng nhất định.

Hoạt tính kháng nấm bệnh hại thực vật

Để tìm hiểu thêm về hoạt tính kích thích sinh trưởng gián tiếp của các chủng vi khuẩn lựa chọn, chúng tôi thực hiện xác định khả năng kháng nấm bệnh thực vật in vitro dựa trên sự ức chế sự hình thành sợi nấm *A. niger* và *F. oxysporum* trên đĩa thạch. Kết quả thử nghiệm cho thấy, trong số 3 chủng thử nghiệm, *Bacillus* sp. PGP-V21 là chủng vi khuẩn duy nhất biểu hiện hoạt tính kháng cả hai chủng nấm kiểm định (thuộc *A. niger* và *F. oxysporum*) với đường kính vòng phân giải lần lượt là 9 và 3 mm. Chủng PGP-V5 cũng biểu hiện hoạt tính kháng nấm *A. niger*, tuy nhiên đường kính vòng kháng khuẩn tương đối nhỏ và không đáng kể (bảng 5).

Bảng 5. Thử nghiệm hoạt tính kháng nấm bệnh thực vật của các chủng vi khuẩn dựa trên đường kính vòng vô khuẩn (D-d, mm).

Vi sinh vật kiểm định	Đường kính vòng vô khuẩn (D-d, mm)		
	<i>B. subtilis</i> PGP-V5	<i>Enterobacter</i> sp. PGP-V20	<i>Bacillus</i> sp. PGP-V21
<i>A. niger</i>	1	0	9
<i>F. oxysporum</i>	0	0	3

Kết quả thử nghiệm (bảng 5) cho thấy, chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. PGP-V21 không chỉ có đặc tính kích thích sinh trưởng trực tiếp (khả năng hòa tan phosphate vô cơ và sinh chất kích thích sinh trưởng) mà còn có tác dụng kích thích gián tiếp (khả năng kháng nấm bệnh thực vật). Năm 2012, các tác giả tại Ấn Độ đã phân lập được 2 chủng vi khuẩn từ vùng rễ cây nghệ vàng, xác định thuộc các loài *Pseudomonas fluorescens* và *Bacillus subtilis*, có khả năng đối kháng nấm *Pythium aphanidermatum* gây bệnh thối rễ. Từ đó, các tác giả đã thử nghiệm và nhận thấy các chủng vi khuẩn này có tác dụng làm giảm đáng kể tỷ lệ nhiễm bệnh thối rễ của cây nghệ vàng ở quy mô nhà kính và đồng ruộng [22]. Như vậy có thể nói, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã lựa chọn được chủng *Bacillus* sp. PGP-V21, là một chủng PGPR với tiềm năng ứng dụng cao trên các đối tượng cây trồng, đặc biệt là cây nghệ vàng tại Việt Nam.

KẾT LUẬN

Qua sàng lọc và nghiên cứu đã xác định được 3 chủng vi khuẩn có khả năng hòa tan phosphate vô cơ và sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật (IAA) từ đất vùng rễ cây nghệ vàng (*C. longa* L.) tại Hưng Yên là *Bacillus* sp. PGP-V5, *Enterobacter* sp. PGP-V20 và *Bacillus* sp. PGP-V21. Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. V21 còn biểu hiện hoạt tính kháng nấm bệnh thực vật, vì vậy có tiềm năng ứng dụng cao trong sản xuất các chế phẩm vi sinh kích thích sinh trưởng và bảo vệ thực vật.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được tiến hành dưới sự tài trợ của đề tài “Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng chế phẩm vi sinh vật phân hủy photpho hữu cơ (OP) góp phần giảm thiểu ô nhiễm môi trường và tăng năng suất cây trồng”, thuộc Chương trình Công nghệ sinh học nông nghiệp - thủy sản cấp nhà nước (giai đoạn 2018-2020). Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] L. Philippot., et al. (2013), “Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere”, *Nature Reviews Microbiology*, **11**(11), p.789.
- [2] V. Nihorimbere., et al. (2011), “Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health”, *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **15**(2), pp.327-337.
- [3] L. Hiltner (1904), “Über neuere erfahrungen und probleme auf dem gebiet der boden bakteriologie und unter besonderer berucksichtigung det grundungung und branche”, *Arb. Deut. Landw. Ges.*, **98**, pp.59-78.
- [4] B.R. Glick. (2012), “Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications”, *Scientifica*, **2012**, p.15.
- [5] J.K. Vessey (2003), “Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers”, *Plant and Soil*, **255**(2), pp.571-586.
- [6] M. Lucy, et al. (2004), “Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria”, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **86**(1), pp.1-25.
- [7] S. Compant, et al. (2010), “Plant growth-promoting bacteria in the rhizo-and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization”, *Soil Biology and Biochemistry*, **42**(5), pp.669-678.
- [8] A. Bafana, R. Lohiya (2013), “Diversity and metabolic potential of culturable root-associated bacteria from *Origanum vulgare* in sub-Himalayan region”, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, pp.63-74.
- [9] N.A. Luu-dam, et al. (2016), “Ethnobotany of colorant plants in ethnic communities in Northern Vietnam”, *Anthropology*, **4**(1), doi:10.4172/2332-0915.1000158.
- [10] H. Chung, et al. (2005), “Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea”, *Soil Biology and Biochemistry*, **37**(10), pp.1970-1974.
- [11] F.C. Gerretsen (1948), “The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant”, *Plant and Soil*, **1**(1), pp.51-81.
- [12] S.C. Verma, et al. (2001), “Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice”, *Journal of Biotechnology*, **91**(2-3), pp.127-141.
- [13] A. Ehmann (1977), “The Van Urk-Salkowski reagent - a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives”, *Journal of Chromatography A*, **132**(2), pp.267-276.
- [14] I. Ahmad, et al. (1998), “Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties”, *Journal of Ethnopharmacology*, **62**(2), pp.183-193.
- [15] P.H. Sneath, et al. (1986), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, **2**, Springer.
- [16] M.S. Mirza, et al. (2001), “Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro”, *Plant and Soil*, **237**(1), pp.47-54
- [17] T. Hall, et al. (2011), “BioEdit: an important software for molecular biology”, *GERF Bull. Biosci.*, **2**(1), pp.60-61.
- [18] K. Tamura, M. Nei (1993), “Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees”, *Molecular Biology and Evolution*, **10**(3), pp.512-526.
- [19] S. Kumar, et al. (2018), “MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms”, *Molecular Biology and Evolution*, **35**(6), pp.1547-1549.
- [20] C. Brady, et al. (2013), “Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA)”, *Systematic and Applied Microbiology*, **36**(5), pp.309-319.
- [21] A. Kumar, et al. (2016), “Isolation of plant growth promoting rhizobacteria and their impact on growth and curcumin content in *Curcuma longa* L.”, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **8**, pp.1-7.
- [22] K. Kavitha, et al. (2012), “Rhizobacterial-mediated induction of defense enzymes to enhance the resistance of turmeric (*Curcuma longa* L) to *Pythium aphanidermatum* causing rhizome rot”, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, **45**(2), pp.199-219.