

## PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN NỘI SINH CỐ ĐỊNH ĐẠM TRONG CÂY ĐÌNH LĂNG (*Polyscias fruticosa* L. Harms)

Lê Thị Mỹ Thu<sup>1</sup>, Trần Ngọc Hữu<sup>1</sup>, Nguyễn Hồng Huế<sup>1</sup>, Lê Vĩnh Thúc<sup>1</sup>,  
Trần Chí Nhân<sup>2</sup>, Lý Ngọc Thanh Xuân<sup>2</sup>, Nguyễn Khánh Linh<sup>3</sup>, Nguyễn Quốc Khương<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Bộ môn Khoa học cây trồng, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Trường Đại học An Giang, Trường Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

<sup>3</sup>Sinh viên lớp Công nghệ sinh học khóa 16, Trường Đại học Cửu Long

\*Tác giả liên hệ: [nqkhuong@ctu.edu.vn](mailto:nqkhuong@ctu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 19.07.2021

Ngày chấp nhận đăng: 05.07.2022

### TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu là xác định được dòng vi khuẩn nội sinh trong cây đình lăng có khả năng cố định đạm. Tất cả 13 mẫu lá và 11 mẫu rễ cây đình lăng thu thập tại huyện Tri Tôn, tỉnh An Giang được sử dụng để phân lập vi khuẩn nội sinh cố định đạm trên môi trường NFB không đạm. Kết quả phân lập được 51 dòng vi khuẩn nội sinh lá và rễ cây đình lăng, với 41 dòng vi khuẩn có khả năng chịu được môi trường pH 5,0. Trong đó, dòng vi khuẩn LP5-L1 có khả năng cố định đạm tốt nhất, với hàm lượng  $35,3 \pm 5,24$  mg/l. Tuy nhiên, dòng vi khuẩn được chọn là LP1-R4 cũng có khả năng cố định đạm tốt, đồng thời hòa tan lân và tổng hợp axit indole-3-acetic lần lượt là  $31,6 \pm 0,39$ ,  $18,8 \pm 0,78$  và  $6,65 \pm 0,26$  mg/l. Dòng vi khuẩn được tuyển chọn được định danh dựa trên kỹ thuật 16S rDNA là *Bacillus circulans* LP1-R4. Cần thử nghiệm hiệu quả của dòng vi khuẩn đã tuyển chọn đến cung cấp dưỡng chất N cho cây đình lăng trong điều kiện nhà lưới và đồng ruộng.

Từ khóa: Cố định đạm, đình lăng, *Polyscias fruticosa* L. Harms, vi khuẩn nội sinh.

### Isolation, Selection and Identification of Nitrogen Fixing Endophytic Bacteria from Ming aralia (*Polyscias fruticosa* L. Harms)

### ABSTRACT

The objective of study was to determine nitrogen fixing endophytic bacteria from *Polyscias fruticosa* (L.) Harms. Thirteen leaves and 11 root samples Ming aralia collected in Tri Ton district, An Giang province were used for isolating nitrogen fixing endophytic bacteria on NFB medium with free nitrogen. Results showed that the 51 isolates were isolated from leaf and root Ming aralia, in which 41 strains possessed the acidic resistance at pH 5.0. Strain LP5-L1 showed highest nitrogen fixing activity, with the ammonium content of  $35.3 \pm 5.24$  mg/l. However, strain LP1-R4 was selected for their functions to produce N, P and IAA with  $31.6 \pm 0.39$ ,  $18.8 \pm 0.78$ , and  $6.65 \pm 0.26$  mg/l, respectively. The selected strain was identified as *Bacillus circulans* LP1-R4 based on 16S rDNA nucleotide sequences. The efficacy of a selected strain should be evaluated for replacing N for Ming aralia in pot and field conditions.

Keywords: Endophytic bacteria, Ming aralia, *Polyscias fruticosa* L. Harms, nitrogen fixation.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong nông nghiệp, đạm là dưỡng chất quan trọng đối với sự phát triển của cây trồng (Moreau & cs., 2019). Tuy nhiên, sử dụng phân đạm vô cơ dẫn đến những bất lợi về môi trường.

Tiến trình cố định đạm sinh học được xem là một giải pháp tiềm năng để giảm thiểu sử dụng phân đạm hóa học (Agtuca & cs., 2020). Ngoài ra, lân là một dưỡng chất đa lượng cần thiết cho sự phát triển của cây trồng vì hàm lượng lân dễ tiêu trong đất thấp. Vì vậy, cung cấp đầy đủ lân

cho cây trồng là một yêu cầu quan trọng để đạt năng suất tối ưu (Ryan & cs., 2012; Lucero & cs., 2021). Bên cạnh đó, chất kích thích sinh trưởng thực vật như axit indole-3-acetic (IAA) cũng góp phần thúc đẩy sự phát triển của cây trồng như tăng sinh khối và năng suất (Çakmakçı & cs., 2021). Vi khuẩn nội sinh có khả năng cố định đạm cũng sở hữu các chức năng khác như hòa tan lân và sản sinh các chất kích thích sinh trưởng thực vật để tăng năng suất cây trồng (Ahmad & cs., 2013). Đinh lăng (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms) là một trong những cây dược liệu phổ biến (Bui Dinh Thach & cs., 2016), thuộc chi lớn thứ hai trong họ Araliaceae, với 159 loài và phân bố từ châu Phi đến các đảo phía đông Thái Bình Dương (Bean, 2015). Trong đó, có 7 loài và 1 giống được tìm thấy ở Việt Nam (Lã Đình Mối & cs., 2013). Đồng thời, đây là cây dược liệu nên sinh khối cây trồng được sử dụng trực tiếp, việc thay thế một phần phân hóa học (Yarte & cs., 2020) bằng nguồn dinh dưỡng từ vi khuẩn bản địa là cần thiết. Tuy nhiên, các dòng vi khuẩn cố định đạm phân lập từ cây đinh lăng chưa được nghiên cứu. Chính vì vậy, nghiên cứu được thực hiện nhằm tuyển chọn vi khuẩn nội sinh cây đinh lăng có khả năng cung cấp đạm cho cây trồng.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Mười ba mẫu lá và 11 mẫu rễ đinh lăng lá nhỏ được thu tại 3 xã Châu Lăng, An Cư và Lương Phi, huyện Tri Tôn, tỉnh An Giang vào tháng 2 năm 2019.

Thành phần của môi trường NFB pha cho 11 gồm: 5g axit malic, 5g  $K_2HPO_4$ , 0,2g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,02g  $CaCl_2$ , 0,1g NaCl, 4,5g KOH, 4ml FeEDTA (1,64%), 2ml dung dịch nguyên tố vi lượng, 1ml dung dịch vitamin, 2ml bromothymol blue 0,5% trong KOH 0,2N và 20g agar.

Thành phần của môi trường Burk's pha cho 11 gồm: 10g sucrose, 0,41g  $KH_2PO_4$ , 0,52g  $K_2HPO_4$ , 0,05g  $Na_2SO_4$ , 0,2g  $CaCl_2$ , 0,1g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,005g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,0025g  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  và 20g agar.

Thành phần của môi trường NBRIP cho 11 gồm: 10g glucose, 5g  $Ca_3(PO_4)_2$ ,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0,25g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,2g KCl và 0,1g  $(NH_4)_2SO_4$ .

Thành phần của môi trường TYGA cho 11 gồm: 5g trypton, 3g yeast extract, 1g glucose và 15g agar. Trong đó, môi trường NFB được sử dụng để phân lập vi khuẩn nội sinh có khả năng cố định đạm. Ngoài ra, môi trường NFB được sử dụng để đánh giá khả năng tiết IAA. Môi trường Burk's và NBRIP được sử dụng để đánh giá khả năng cố định đạm và hòa tan lân, theo thứ tự.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Thu mẫu rễ và lá

Mẫu lá của nhánh cấp ba được chọn từ cây không bị bệnh và phát triển tốt. Mẫu rễ được đào lấy rễ trên cây vừa thu mẫu lá, chọn rễ lớn có nhiều rễ nhánh và được trữ lạnh, đem về phòng thí nghiệm để phân lập vi khuẩn.

#### 2.2.2. Phân lập và đặc điểm hình thái của vi khuẩn nội sinh cây đinh lăng

##### a. Phân lập vi khuẩn nội sinh

Phương pháp phân lập vi khuẩn được thực hiện theo Nguyễn Hữu Hiệp & Nguyễn Thị Mai Khanh (2010). Cân 2g mỗi mẫu rễ và mẫu cây đã được rửa sạch bằng nước máy. Mẫu được cắt thành đoạn nhỏ khoảng 1cm, sau đó được cho vào bình tam giác 250ml, thêm 10ml cồn 96%, lắc nhẹ trong 10 phút, mẫu được rửa sạch bằng nước cất vô trùng 3 lần (5 phút/lần), bổ sung 5ml calcium hypochloride 2%, lắc nhẹ trong 10 phút. Mẫu được rửa sạch bằng nước cất vô trùng 4 lần (5 phút/lần). Dùng pipet hút 200μl của nước rửa lần thứ 4 trải đều trên các đĩa chứa môi trường TYGA, ủ ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ. Nếu trên các đĩa môi trường này không xuất hiện khuẩn lạc, mẫu khử đã đạt yêu cầu. Giã nhuyễn các mẫu bằng cối chày vô trùng. Kế đến, thêm 1,0ml nước cất vô trùng vào cối, khuấy đều và hút 500μl dịch trích mẫu cho vào các ống nghiệm chứa môi trường NFB bán đặc không đạm (mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần). Các ống nghiệm được đậy kín và ủ ở 30°C. Sau khoảng 2-4 ngày trong các ống nghiệm xuất hiện lớp màng mỏng gần bề mặt môi trường chứng tỏ có sự hiện diện của vi khuẩn nội sinh. Chuyển lớp

màng mỏng có chứa vi khuẩn nội sinh sang môi trường đặc, không đậm tương ứng, ủ ở 30°C trong 48 giờ. Các khuẩn lạc khác nhau xuất hiện trên bề mặt môi trường được tiếp tục cấy chuyển 2-3 lần sang các đĩa môi trường tương ứng cho đến khi các khuẩn lạc thuần.

#### *b. Đặc điểm khuẩn lạc*

Hình thái khuẩn lạc được mô tả gồm màu sắc, hình dạng, dạng rìa khuẩn lạc, độ nổi và kích thước khuẩn lạc.

### **2.2.3. Tuyển chọn vi khuẩn nội sinh cố định đạm từ cây đinh lăng**

#### *a. Nguồn vi khuẩn*

Tất cả 51 chủng vi khuẩn nội sinh từ cây đinh lăng phân lập trên môi trường NFB được giữ ở 4°C và được sử dụng để đánh giá khả năng chịu môi trường chua, cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA.

#### *b. Đánh giá khả năng chịu môi trường chua của vi khuẩn đã phân lập*

Các dòng vi khuẩn được đánh giá trong điều kiện pH thấp vì cây đinh lăng được hướng đến trồng trên đất có pH thấp tại đồng bằng sông Cửu Long. Khả năng thích nghi của các dòng vi khuẩn trong điều kiện chua được thực hiện theo phương pháp được của Nguyễn Quốc Khương & cs. (2019). Dịch nuôi năm mươi một dòng vi khuẩn được điều chỉnh đến  $OD_{660} = 0,5$ , hút 1,0ml dịch nuôi của mỗi dòng vi khuẩn đã điều chỉnh  $OD_{660}$  cho vào ống nghiệm chứa 9,0ml môi trường NFB, với 3 lần lặp lại cho mỗi dòng vi khuẩn. Sau 48 giờ ủ trên máy lắc ở tốc độ 200 vòng/phút, dung dịch khuẩn được đo mật độ quang trên máy quang phổ ở bước sóng 660nm. Các dòng vi khuẩn có giá trị OD cao hơn có nghĩa là thích nghi tốt hơn với điều kiện pH 5,0. Dòng vi khuẩn có  $OD_{660}$  lớn hơn 0,6 được xem là thích nghi tốt với điều kiện chua và được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

#### *c. Phương pháp xác định hàm lượng đạm cố định được của các dòng vi khuẩn*

Định lượng hoạt tính cố định đạm theo phương pháp mô tả bởi Cao Ngọc Diệp & Nguyễn Thị Mộng Huyền (2015). Các dòng vi

khuẩn có khả năng sống trong điều kiện pH 5,0 được nuôi trong môi trường Burk's lỏng không đậm để đánh giá khả năng cố định đạm. Dịch nuôi mỗi dòng vi khuẩn đã điều chỉnh  $OD_{660} = 0,5$ , hút 1,0ml dung dịch vi khuẩn cho vào ống nghiệm chứa 9ml môi trường Burk's lỏng không đậm, sau đó lắc với tốc độ 120 vòng/phút ở điều kiện tối, với 3 lần lặp lại cho mỗi dòng vi khuẩn. Mẫu đối chứng là dung dịch môi trường Burk's không có vi khuẩn. Sau 48 giờ ủ, sử dụng pipet hút 1,0ml dung dịch vi khuẩn để ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 15 phút. Dung dịch sau ly tâm được định lượng đạm bằng phương pháp so màu blue phenol (Nelson & cs., 1983) trên máy quang phổ ở bước sóng 640nm.

### **2.3.4. Đánh giá khả năng hòa tan lân và tổng hợp IAA của vi khuẩn nội sinh cây đinh lăng**

#### *a. Phương pháp xác định hàm lượng lân hòa tan từ vi khuẩn*

Định lượng hoạt tính hòa tan lân theo phương pháp mô tả bởi Cao Ngọc Diệp & Nguyễn Thị Mộng Huyền (2015). Tất cả các dòng vi khuẩn chịu môi trường chua được sử dụng để đánh giá khả năng hòa tan các dạng lân trong môi trường NBRIP với pH 4,5 chứa 1g  $Ca_3(PO_4)_2$ . sử dụng pipet hút 1,0ml dung dịch nuôi của mỗi dòng vi khuẩn đã được điều chỉnh để có  $OD_{660} = 0,5$  cho vào ống nghiệm chứa 10ml môi trường NBRIP lỏng, sau đó mẫu được lắc với tốc độ 120 vòng/phút trong 72 giờ, với 3 lần lặp lại cho mỗi dòng vi khuẩn. Mẫu đối chứng là dung dịch môi trường NBRIP chứa  $Ca_3(PO_4)_2$ , nhưng không có vi khuẩn. Lượng lân hòa tan được xác định bằng phương pháp so màu ascorbic acid trên máy quang phổ ở bước sóng 880nm (Murphy & Riley, 1962).

#### *b. Phương pháp xác định hàm lượng IAA tiết ra từ vi khuẩn*

Định lượng khả năng tổng hợp IAA theo phương pháp mô tả bởi Cao Ngọc Diệp & Nguyễn Thị Mộng Huyền (2015). Các dòng vi khuẩn được tuyển chọn có khả năng chịu được môi trường chua, khả năng cố định đạm và hòa tan lân được sử dụng để đánh giá khả năng tổng

hợp IAA trong môi trường NFB với pH 5,0. Tiền chất tryptophan được bổ sung nhằm hỗ trợ tổng hợp IAA (100 µg/l). Hút 1,0ml dung dịch các dòng vi khuẩn có giá trị  $OD_{660} = 0,5$  được cho vào ống nghiệm có chứa sẵn 9,0ml môi trường NFB đã có tryptophan và ủ trong 48 giờ, mỗi dòng vi khuẩn được thực hiện với 3 lặp lại. Mẫu đối chứng là dung dịch môi trường có tryptophan không bổ sung vi khuẩn. Sau đó, sử dụng pipet hút 1,0ml dung dịch vi khuẩn để đem ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 15 phút nhằm thu phần dịch trong. Hàm lượng IAA được xác định bằng phương pháp so màu với thuốc thử Salkowski và được tóm tắt như sau: 0,75ml dung dịch trích đã được ly tâm trộn với 3,0ml tác chất Salkowski (4,5 g/l  $FeCl_3$  trong 10,8M  $H_2SO_4$ ) được ủ trong tối trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Hàm lượng IAA được xác định từ đường chuẩn đã được dựng dựa trên giá trị OD sau khi thử với thuốc thử Salkowski trên máy quang phổ ở bước sóng 535nm (Glickman & Dessaux, 1995).

### 2.3.5. Định danh vi khuẩn nội sinh cố định đạm đã tuyển chọn

Dòng vi khuẩn LP1-R4 được nuôi 48 giờ trong môi trường NFB. Sau đó, hút 2ml dung dịch để ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5

phút nhằm thu tế bào để tách DNA bằng Genomic DNA Prep Kit (BioFACT™), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Độ tinh sạch sản phẩm được kiểm tra trên 1,0% w/v agarose gel bằng điện di. Sản phẩm DNA được khuếch đại gen mã hóa 16S rRNA bằng kỹ thuật PCR như mô tả trong iProof™ High-Fidelity PCR Kit - Bio-Rad (BioRad, Hercules, CA) bởi T100™ thermo cycler (BioRad). So kích thước của sản phẩm PCR với thang DNA chuẩn để xác nhận vị trí các band kích thước 1.500bp. 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 1,0% 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 và phần mềm ChromasPro version 1.7 (<http://technelysium.com.au/wp/chromaspro>). Trình tự nucleotide của gen mã hóa 16S rRNA 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.

**Bảng 1. Đặc tính khuẩn lạc trên môi trường NFB**

| Đặc tính                  |              | Số dòng vi khuẩn nội sinh (dòng) | Tỷ lệ (%) |
|---------------------------|--------------|----------------------------------|-----------|
| Màu sắc                   | Trắng đục    | 44                               | 86,3      |
|                           | Trắng trong  | 5                                | 9,80      |
|                           | Vàng nhạt    | 2                                | 3,90      |
| Dạng ria                  | Ria nguyên   | 45                               | 88,2      |
|                           | Ria răng cưa | 6                                | 11,8      |
| Độ nổi mô                 | Ít mô        | 32                               | 62,8      |
|                           | Mô vừa       | 17                               | 33,3      |
|                           | Mô cao       | 2                                | 3,90      |
| Hình dạng khuẩn lạc       | Tròn         | 42                               | 82,4      |
|                           | Ovan         | 9                                | 17,6      |
| Đường kính khuẩn lạc (mm) | < 1          | 8                                | 16,0      |
|                           | 1-2          | 39                               | 78,0      |
|                           | > 2          | 3                                | 6,00      |

### 2.3.6. Xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê qua phân tích one-way ANOVA ( $P < 0,05$ ) bằng phần mềm SPSS 13.0. Các giá trị trung bình được so sánh bằng phép thử DUNCAN.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Đặc điểm hình thái của vi khuẩn nội sinh cố định đạm được phân lập từ cây đinh lăng

#### 3.1.1. Kết quả phân lập vi khuẩn nội sinh từ cây đinh lăng

Kết quả đã phân lập và làm thuần được 51 chủng vi khuẩn trên môi trường NFB không đạm ở pH 5,0 từ 13 mẫu lá và 11 mẫu rễ cây đinh lăng thu tại huyện Tri Tôn. Tất cả các chủng này được lưu trữ trên đĩa và trong glycerol 20% ở điều kiện  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.1.2. Đặc tính hình thái khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn nội sinh cây đinh lăng

Màu sắc của các khuẩn lạc được ghi nhận có màu trắng đục, trắng trong và vàng nhạt, chiếm tỷ lệ lần lượt là 86,3%, 9,80% và 3,90%. Đối với dạng rìa, rìa nguyên chiếm ưu thế hơn so với dạng bìa răng cưa, với tỷ lệ 88,2% so với 11,8%, theo thứ tự. Độ nổi dao động từ 3,90 đến 62,8%, với hình dạng tròn và ovan. Đối với kích thước khuẩn lạc, những khuẩn lạc có kích thước khoảng 1-2mm chiếm ưu thế (78,4%) (Bảng 1).

### 3.2. Tuyển chọn vi khuẩn nội sinh cố định đạm trên cây đinh lăng

#### 3.2.1. Khả năng chịu đựng trong môi trường pH 5,0 của các dòng vi khuẩn nội sinh cây đinh lăng

Kết quả nghiên cứu tuyển chọn được 41

dòng vi khuẩn chịu đựng trong môi trường pH 5,0, với  $\text{OD}_{660}$  lớn hơn 0,6. Cụ thể, có 10 dòng có giá trị  $\text{OD}_{660}$  là nhỏ hơn hoặc bằng 0,6,  $\text{OD}_{660}$  trong khoảng  $> 0,6-1,0$  là 17 dòng và  $\text{OD}_{660}$  lớn hơn 1,0 là 14 dòng (Bảng 2). Từ mẫu thu tại xã An Cư đã tuyển chọn được 3 dòng vi khuẩn từ lá (AC1-L1, AC2-L1 và AC3-L1) và 5 dòng vi khuẩn từ rễ (AC1-R3, AC1-R4, AC2-R1, AC3-R1 và AC4-R1). Mười bảy dòng vi khuẩn được tuyển chọn từ mẫu thu tại xã Châu Lăng bao gồm 4 dòng từ lá (CL1-L3, CL1-L4, CL4-L1 và CL4-L2) và 13 dòng từ rễ (CL1-R1, CL2-R1, CL2-R2, CL2-R3, CL2-R4, CL2-R5, CL3-R1, CL3-R2, CL3-R3, CL3-R4, CL4-R1, CL4-R2 và CL4-R3). Tương tự, từ mẫu thu tại xã Lương Phi tuyển chọn được 16 dòng vi khuẩn gồm 6 dòng từ lá như LP2-L1, LP2-L2, LP3-L1, LP3-L2, LP5-L1 và LP5-L2 và 10 dòng từ rễ gồm LP1-R1, LP1-R2, LP1-R3, LP1-R4, LP3-R1, LP3-R2, LP4-R2, LP4-R3, LP5-R3 và LP5-R4.

#### 3.2.2. Khả năng cố định đạm của các dòng vi khuẩn nội sinh cây đinh lăng

Trong môi trường NFB lỏng, hàm lượng đạm cố định được của 41 dòng vi khuẩn nội sinh được trình bày trong Bảng 3. Hàm lượng đạm giữa các dòng vi khuẩn nội sinh khác biệt có ý nghĩa thống kê 5%, hàm lượng đạm cao nhất cố định bởi dòng vi khuẩn LP5-L1, với hàm lượng  $35,3 \pm 5,24$  mg/l. Hàm lượng đạm được cố định bởi các dòng vi khuẩn LP1-R4, CL2-R4, LP2-L2, LP3-L2, AC3-L1 và LP3-L1 thấp hơn, dao động từ  $25,7 \pm 0,20$  đến  $31,6 \pm 0,39$  mg/l. Hai dòng vi khuẩn CL1-L4 và CL4-R3 có khả năng cố định đạm thấp, hàm lượng đạm cố định chỉ đạt  $1,38 \pm 0,20$  và  $0,48 \pm 0,10$  mg/l, theo thứ tự. Hàm lượng đạm được cố định bởi các dòng vi khuẩn còn lại dao động từ  $3,19 \pm 0,01$  đến  $22,6 \pm 2,82$  mg/l. Kết quả thí nghiệm cho thấy dòng vi khuẩn LP5-L1 có khả năng cố định đạm cao nhất.

**Bảng 2. Giá trị  $\text{OD}_{660}$  của các dòng vi khuẩn nuôi trong môi trường với pH 5,0**

| Giá trị $\text{OD}_{660}$ | Số dòng (dòng) | Tỷ lệ (%) |
|---------------------------|----------------|-----------|
| $\leq 0,6$                | 10             | 19,6      |
| $0,6-1,0$                 | 17             | 33,3      |
| $>1,0-1,5$                | 18             | 35,3      |
| $>1,5$                    | 6              | 11,8      |

Cố định đạm sinh học là một cơ chế quan trọng góp phần đạt được mục tiêu sản xuất nông nghiệp bền vững (Mahmud & cs., 2020). Sự tăng mật độ vi khuẩn nội sinh giúp tăng lượng đạm hữu dụng cho cây thông qua cố định đạm (Montañez & cs., 2012; Afzal & cs., 2019). Bên cạnh đó, theo Aryantha & cs. (2018) đã công bố vi khuẩn *B. cereus* từ cây cọ dầu (*Elaeis guineensis* Jacq L.) có khả năng cố định đạm, với hàm lượng đạm đạt 46,6ppm. Hàm lượng đạm cố định cao nhất trong nghiên cứu này cũng đạt 35,3 mg/l (Bảng 3) thấp hơn so với nghiên cứu của Aryantha & cs. (2018). Các nghiên cứu trước đây cũng tìm thấy các dòng vi khuẩn nội sinh bên trong mô hoa, lá, rễ, hạt và thân cây ở các loại cây trồng như bắp, long não (*Cinnamomum camphora*) và nho (Compant & cs., 2011; Elmagzob & cs., 2019; Rana & cs., 2021). Điều này cho thấy các dòng vi khuẩn nội sinh được tìm thấy nội sinh trong nhiều loài cây trồng khác nhau. Ngoài ra, một số dòng vi khuẩn tiềm năng được áp dụng vào thực tế như dòng vi khuẩn *B. paralicheniformis* KMS 80 từ mô rễ của cây lúa có khả năng cố định đạm sinh học và thúc đẩy sự phát triển của cây trồng (Annapurna & cs., 2018). Do đó, dòng vi khuẩn LP5-L1 có khả năng cố định đạm nên có thể sử dụng để hỗ trợ sinh trưởng cây đinh lăng.

### 3.3. Đánh giá khả năng hòa tan lân và tổng hợp IAA của các dòng vi khuẩn nội sinh từ cây đinh lăng

#### 3.3.1. Khả năng hòa tan lân của các dòng vi khuẩn nội sinh cây đinh lăng

Kết quả ở bảng 3 cũng cho thấy trong số 41 dòng vi khuẩn nội sinh cây đinh lăng đều có khả năng hòa tan lân, dòng vi khuẩn LP2-L2 có khả năng hòa tan lân cao nhất ( $22,5 \pm 1,01$  mg/l), cao khác biệt có ý nghĩa thống kê 5% so với các dòng vi khuẩn còn lại. Kế đến, các dòng vi khuẩn LP1-R4, CL3-R2, CL1-L3 và AC4-R1 cũng được ghi nhận có khả năng hòa tan lân cao, với hàm lượng lần lượt là  $18,8 \pm 0,78$ ,  $15,2 \pm 0,99$ ,  $14,4 \pm 0,19$  và  $12,4 \pm 1,24$  mg/l. Tuy nhiên, khả năng hòa tan lân thấp được ghi nhận ở dòng vi khuẩn LP3-L2 ( $3,08 \pm 0,32$  mg/l), khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với dòng LP1-R1 ( $3,49 \pm 0,25$  mg/l).

Các dòng vi khuẩn còn lại có hàm lượng lân hòa tan dao động từ  $4,15 \pm 0,24$  đến  $11,5 \pm 0,18$  mg/l.

Hàm lượng lân tổng số trong đất thường ở ngưỡng cao. Tuy nhiên, hàm lượng lân dễ tiêu cho cây trồng ở mức thấp do lân tồn tại ở các dạng liên kết không hòa tan với sắt và nhôm (Schaller & cs., 2019). Vi khuẩn nội sinh góp phần tăng hiệu quả sử dụng lân của cây trồng trên đất thiếu lân dễ tiêu (Emami & cs., 2020). Joshi & cs. (2018) báo cáo rằng vi khuẩn nội sinh phân lập từ các cây dược liệu như hương nhu tía (*Ocimum sanctum*) và nha đam (*Aloe vera*) có khả năng hòa tan các dạng lân khó tan trong đất và góp phần thúc đẩy sự phát triển của cây trồng. Trong nghiên cứu này, dòng vi khuẩn LP2-L2 cũng có tiềm năng cung cấp lân cho cây dược liệu cụ thể là cây đinh lăng.

#### 3.3.2. Khả năng tổng hợp IAA của các dòng vi khuẩn nội sinh cây đinh lăng

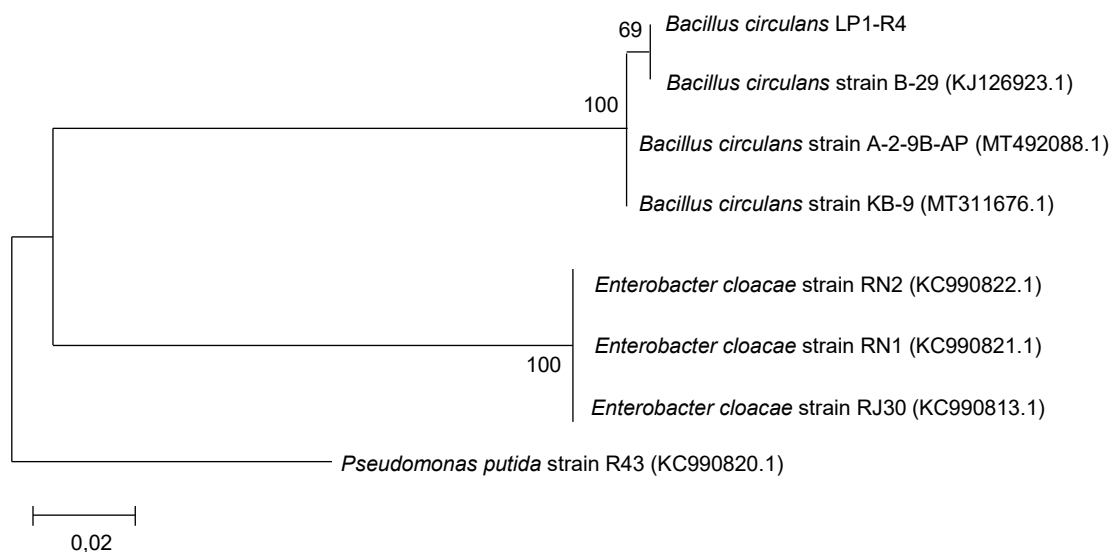
Khả năng tổng hợp IAA của 41 dòng vi khuẩn nội sinh khác biệt có ý nghĩa thống kê 5% (Bảng 3). Dòng vi khuẩn LP3-L1 có khả năng tổng hợp IAA cao nhất, đạt  $11,0 \pm 0,65$  mg/l. Khả năng tổng hợp IAA cao cũng được ghi nhận ở các dòng vi khuẩn AC1-R3, LP1-R1 và LP2-L1 lần lượt là  $9,95 \pm 0,76$ ,  $7,93 \pm 1,50$  và  $7,53 \pm 0,07$  mg/l. Hàm lượng IAA được tổng hợp trong khoảng từ  $5,22 \pm 0,20$  đến  $6,93 \pm 0,06$  mg/l đối với các dòng vi khuẩn LP5-L1, LP1-R4, AC1-L1, CL4-R2, LP3-R1, CL2-R3 và CL1-R1 trong khi đó khả năng tổng hợp IAA thấp nhất ( $0,92 \pm 0,12$  mg/l) được ghi nhận ở dòng LP2-L2.

Vi khuẩn nội sinh có khả năng tổng hợp axit indole-3-acetic (IAA) cũng góp phần thúc đẩy sự phát triển của cây trồng thông qua tăng sinh khối cây trồng, tăng chiều dài rễ và số lượng rễ (Ali & cs., 2017). Vì vậy, sử dụng các dòng vi khuẩn đã tuyển chọn sẽ kích thích sự tăng trưởng của cây trồng, đặc biệt, cây đinh lăng là cây dược liệu nên việc thu sinh khối là rất quan trọng. Do đó, ngoài chức năng cố định đạm, vi khuẩn nội sinh cũng sở hữu các chức năng khác như hòa tan lân và tổng hợp IAA. Vì thế, dòng vi khuẩn được chọn là LP1-R4 có khả năng cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA, với hàm lượng lần lượt là  $31,6 \pm 0,39$ ,  $18,8 \pm 0,78$  và  $6,65 \pm 0,26$  mg/l.

**Bảng 3. Hàm lượng đạm, lân và IAA được tổng hợp  
của các dòng vi khuẩn nội sinh từ cây đinh lăng trong môi trường lỏng**

| Ký hiệu dòng vi khuẩn | Hàm lượng đạm (mg/l)       | Hàm lượng lân (mg/l)       | Hàm lượng IAA (mg/l)       |
|-----------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| AC1-L1                | 22,1 <sup>ef</sup> ± 0,06  | 5,98 <sup>opq</sup> ± 0,74 | 6,17 <sup>ef</sup> ± 0,52  |
| AC1-R3                | 15,2 <sup>ijk</sup> ± 0,82 | 8,79 <sup>ij</sup> ± 0,41  | 9,95 <sup>b</sup> ± 0,76   |
| AC1-R4                | 10,9 <sup>lmn</sup> ± 2,51 | 4,82 <sup>rs</sup> ± 0,24  | 4,54 <sup>h</sup> ± 0,16   |
| AC2-L1                | 11,5 <sup>lm</sup> ± 0,89  | 5,81 <sup>pq</sup> ± 0,91  | 1,20 <sup>st</sup> ± 0,10  |
| AC2-R1                | 3,19 <sup>qr</sup> ± 0,01  | 6,31 <sup>nop</sup> ± 0,07 | 3,30 <sup>ij</sup> ± 0,10  |
| AC3-L1                | 26,5 <sup>d</sup> ± 3,81   | 11,4 <sup>e</sup> ± 0,50   | 1,75 <sup>p-s</sup> ± 0,30 |
| AC3-R1                | 5,10 <sup>pq</sup> ± 0,90  | 10,2 <sup>fg</sup> ± 0,49  | 1,43 <sup>rst</sup> ± 0,02 |
| AC4-R1                | 18,7 <sup>l</sup> ± 6,22   | 12,4 <sup>d</sup> ± 1,24   | 1,50 <sup>rst</sup> ± 0,12 |
| CL1-L3                | 7,21 <sup>op</sup> ± 0,20  | 14,4 <sup>c</sup> ± 0,19   | 2,16 <sup>opq</sup> ± 0,13 |
| CL1-L4                | 1,38 <sup>r</sup> ± 0,20   | 6,97 <sup>l-o</sup> ± 0,40 | 1,10 <sup>st</sup> ± 0,03  |
| CL1-R1                | 7,51 <sup>m-p</sup> ± 0,52 | 6,56 <sup>m-p</sup> ± 0,34 | 1,99 <sup>o-r</sup> ± 0,12 |
| CL2-R1                | 16,8 <sup>hij</sup> ± 1,81 | 5,23 <sup>qr</sup> ± 0,66  | 5,22 <sup>g</sup> ± 0,20   |
| CL2-R2                | 17,8 <sup>g-j</sup> ± 0,39 | 7,96 <sup>kl</sup> ± 0,25  | 3,17 <sup>ijk</sup> ± 0,35 |
| CL2-R3                | 11,3 <sup>lm</sup> ± 0,73  | 6,31 <sup>nop</sup> ± 0,25 | 5,42 <sup>g</sup> ± 0,03   |
| CL2-R4                | 30,2 <sup>bc</sup> ± 1,39  | 5,13 <sup>qr</sup> ± 0,17  | 2,25 <sup>m-p</sup> ± 0,32 |
| CL2-R5                | 15,8 <sup>ijk</sup> ± 1,00 | 6,89 <sup>mno</sup> ± 0,17 | 2,22 <sup>nop</sup> ± 0,06 |
| CL3-R1                | 3,79 <sup>qr</sup> ± 0,55  | 9,12 <sup>hi</sup> ± 0,57  | 3,62 <sup>j</sup> ± 0,27   |
| CL3-R2                | 5,80 <sup>pq</sup> ± 1,41  | 15,2 <sup>c</sup> ± 0,99   | 2,84 <sup>j-n</sup> ± 0,36 |
| CL3-R3                | 16,6 <sup>hij</sup> ± 0,04 | 9,53 <sup>ghi</sup> ± 0,83 | 4,24 <sup>h</sup> ± 0,23   |
| CL3-R4                | 8,21 <sup>m-p</sup> ± 0,03 | 9,27 <sup>ghi</sup> ± 0,12 | 2,99 <sup>i-l</sup> ± 0,13 |
| CL4-L1                | 11,5 <sup>lm</sup> ± 0,89  | 8,79 <sup>ij</sup> ± 0,58  | 3,09 <sup>ijk</sup> ± 0,32 |
| CL4-L2                | 22,6 <sup>e</sup> ± 2,82   | 11,4 <sup>e</sup> ± 0,15   | 3,07 <sup>ijk</sup> ± 0,04 |
| CL4-R1                | 2,99 <sup>qr</sup> ± 0,92  | 11,5 <sup>e</sup> ± 0,18   | 1,20 <sup>st</sup> ± 0,01  |
| CL4-R2                | 14,9 <sup>jk</sup> ± 0,69  | 6,39 <sup>nop</sup> ± 0,50 | 6,02 <sup>f</sup> ± 0,18   |
| CL4-R3                | 0,48 <sup>r</sup> ± 0,10   | 9,29 <sup>ghi</sup> ± 0,25 | 3,20 <sup>ijk</sup> ± 0,11 |
| LP1-R1                | 21,0 <sup>efg</sup> ± 0,50 | 6,97 <sup>l-o</sup> ± 0,91 | 7,93 <sup>c</sup> ± 1,50   |
| LP1-R2                | 22,3 <sup>e</sup> ± 3,13   | 3,49 <sup>tu</sup> ± 0,25  | 2,39 <sup>l-o</sup> ± 0,26 |
| LP1-R3                | 12,8 <sup>kl</sup> ± 0,98  | 6,22 <sup>nop</sup> ± 0,49 | 3,19 <sup>ijk</sup> ± 0,19 |
| LP1-R4                | 31,6 <sup>b</sup> ± 0,39   | 18,8 <sup>b</sup> ± 0,78   | 6,65 <sup>de</sup> ± 0,26  |
| LP2-L1                | 9,41 <sup>l-o</sup> ± 1,41 | 7,47 <sup>klm</sup> ± 0,74 | 7,53 <sup>c</sup> ± 0,07   |
| LP2-L2                | 29,9 <sup>bc</sup> ± 1,69  | 22,5 <sup>a</sup> ± 1,01   | 0,92 <sup>t</sup> ± 0,12   |
| LP3-L1                | 25,7 <sup>d</sup> ± 0,20   | 8,13 <sup>jk</sup> ± 0,08  | 11,0 <sup>a</sup> ± 0,65   |
| LP3-L2                | 27,5 <sup>cd</sup> ± 1,61  | 3,08 <sup>u</sup> ± 0,32   | 3,45 <sup>ij</sup> ± 0,16  |
| LP3-R1                | 22,4 <sup>e</sup> ± 0,50   | 6,56 <sup>m-p</sup> ± 0,17 | 5,73 <sup>fg</sup> ± 0,17  |
| LP3-R2                | 21,6 <sup>ef</sup> ± 2,31  | 10,8 <sup>ef</sup> ± 0,41  | 2,86 <sup>j-m</sup> ± 0,02 |
| LP4-R2                | 19,9 <sup>e-h</sup> ± 0,66 | 10,0 <sup>gh</sup> ± 0,32  | 1,56 <sup>q-t</sup> ± 0,17 |
| LP4-R3                | 14,9 <sup>jk</sup> ± 3,11  | 6,97 <sup>l-o</sup> ± 0,58 | 1,17 <sup>st</sup> ± 0,07  |
| LP5-L1                | 35,3 <sup>a</sup> ± 5,24   | 4,15 <sup>st</sup> ± 0,24  | 6,93 <sup>d</sup> ± 0,06   |
| LP5-L2                | 10,4 <sup>l-o</sup> ± 0,20 | 7,96 <sup>kl</sup> ± 0,08  | 2,61 <sup>k-o</sup> ± 0,03 |
| LP5-R3                | 7,81 <sup>m-p</sup> ± 0,20 | 5,73 <sup>pqr</sup> ± 0,66 | 1,59 <sup>qrs</sup> ± 0,26 |
| LP5-R4                | 21,4 <sup>ef</sup> ± 0,47  | 7,22 <sup>k-n</sup> ± 0,32 | 3,03 <sup>ijk</sup> ± 0,35 |
| Mức ý nghĩa           | *                          | *                          | *                          |
| CV (%)                | 12,0                       | 6,29                       | 9,25                       |

Ghi chú: Trong cùng một cột các số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không ý nghĩa qua phân tích thống kê theo phép thử Duncan, \*: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.



Hình 1. Cây phả hệ về mối quan hệ di truyền của dòng vi khuẩn nội sinh được tuyển chọn

### 3.4. Định danh vi khuẩn nội sinh cố định đạm cây đinh lăng được tuyển chọn

Dòng vi khuẩn nội sinh cố định đạm được định danh thuộc chi *Bacillus* và loài *circulans* với tỷ lệ tương đồng 100% và được đặt tên *Bacillus circulans* LP1-R4 (Hình 1). Tuy nhiên, các dòng còn lại không được tuyển chọn nên không được định danh. Kết quả hình 1 cho thấy chủng cần định danh tương đồng 100% với các chủng *B. circulans* A-2-9B-AP (MT492088.1) và *B. circulans* KB-9 (MT311676.1)

Nhiều nghiên cứu cho thấy các dòng vi khuẩn nội sinh cải thiện sự phát triển của cây trồng thông qua các chức năng cố định đạm (Li & cs., 2018), hòa tan lân (Zega & Suryanto, 2018), tổng hợp chất điều hòa sinh trưởng thực vật như auxin, axit indole acetic, gibberellins và cytokinin (Olanrewaju & cs., 2017), cũng như tăng khả năng chống chịu trong điều kiện bất lợi của cây trồng (Sagar & cs., 2020). Hơn nữa, Eid & cs. (2021) cũng báo cáo rằng vi khuẩn nội sinh hỗ trợ cây trồng tổng hợp các chất biến dưỡng thứ cấp có hoạt tính sinh học với tiềm năng ứng dụng trong y học và công nghiệp dược phẩm. Do đó, dòng vi khuẩn nội sinh LP1-R4 có khả năng cung cấp N, P và IAA có tiềm năng để giảm phân bón hóa học cho cây đinh lăng.

## 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 4.1. Kết luận

Nghiên cứu phân lập được 51 dòng vi khuẩn nội sinh lá và rễ cây đinh lăng trồng tại huyện Tri Tôn, tỉnh An Giang, với 41 dòng chịu được môi trường pH 5,0. Trong đó, dòng vi khuẩn LP5-L1 có khả năng cố định đạm tốt nhất, đạt  $35,3 \pm 5,24$  mg/l. Khả năng hòa tan lân và tổng hợp IAA được ghi nhận cao nhất ở dòng vi khuẩn LP2-L2 và LP3-L1, với hàm lượng  $22,5 \pm 1,01$  và  $11,0 \pm 0,65$  mg/l, theo cùng thứ tự. Tuy nhiên, dòng vi khuẩn LP1-R4 được chọn với hàm lượng đạm, lân hòa tan và IAA lần lượt là  $31,6 \pm 0,39$ ,  $18,8 \pm 0,78$  và  $6,65 \pm 0,26$  mg/l. Dòng vi khuẩn được tuyển chọn được định danh là *Bacillus circulans* LP1-R4 với mức độ tương đồng 100% với dòng *B. circulans* A-2-9B-AP và *B. circulans* KB-9.

### 4.2. Đề nghị

Khảo sát khả năng thay thế phân hóa học của các dòng vi khuẩn nội sinh cố định đạm *Bacillus circulans* LP1-R4 trên cây đinh lăng trong điều kiện phòng thí nghiệm và ngoài đồng.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Afzal I., Shinwari Z. K., Sikandar S. & Shahzad S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria:

- mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*. 221: 36-49.
- Agtuca B.J., Stopka S.A., Tuleski T.R., do Amaral F.P., Evans S., Liu Y., Xu D., Monteiro R.S., Koppenaal D.W., Paša-Tolić L., Anderton C.R., Vertes A. & Stacey G. (2020). *In-situ* metabolomic analysis of *Setaria viridis* roots colonized by beneficial endophytic bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 33(2): 272-283.
- Ahmad E., Khan M.S. & Zaidi A. (2013). ACC deaminase producing *Pseudomonas putida* strain PSE3 and *Rhizobium leguminosarum* strain RP2 in synergism improves growth, nodulation and yield of pea grown in alluvial soils. *Symbiosis*. 61(2): 93-104.
- Ali S., Charles T.C. & Glick B.R. (2017). Endophytic phytohormones and their role in plant growth promotion. In *Functional importance of the plant microbiome*. Springer, Cham. pp. 89-105.
- Annapurna K., Govindasamy V., Sharma M., Ghosh A. & Chikara S.K. (2018). Whole genome shotgun sequence of *Bacillus paralicheniformis* strain KMS 80, a rhizobacterial endophyte isolated from rice (*Oryza sativa* L.). *3 Biotech*. 8: 223.
- Aryantha I.P. & Hidiyah A.R.M. (2018.). Colonization and performance of diazotroph endophytic bacteria on palm oil (*Elaeis guineensis* Jacq L.) leaves. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 166: 012012.
- Bean A.R. (2015). A conspectus of *Polyscias* JR Forst. & G. Forst. (Araliaceae) in Queensland, Australia. *Austrobaileya*. pp. 445-456.
- Bui Dinh Thach, Le Nguyen Tu Linh, Diep Trung Cang, Trinh Thi Ben, Tran Thi Linh Giang, Nguyen Pham Ai Uyen & Ngo Ke Suong (2016). Protocol establishment for multiplication and regeneration of *Polyscias fruticosa* L. Harms. An important medicinal plant in vietnam. *European Journal of Biotechnology and Genetic Engineering*. 3(1): 31-37.
- Çakmakçı R., Mosber G., Milton A.H., Alatürk F. & Ali B. (2020). The effect of auxin and auxin-producing bacteria on the growth, essential oil yield, and composition in medicinal and aromatic plants. *Current Microbiology*. 77(4): 564-577.
- 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.
- Compant S., Mitter B., Colli-Mull J.G., Gangl H. & Sessitsch A. (2011). Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microbial Ecology*. 62(1): 188-197.
- Eid A.M., Fouda A., Abdel-Rahman M.A., Salem S.S., Elsaied A., Oelmüller R., Hijri M., Bhowmik A., Elkelish A. & Hassan S.E.D. (2021). Harnessing bacterial endophytes for promotion of plant growth and biotechnological applications: An Overview. *Plants*. 10(5): 935.
- Elmagzob A.A.H., Ibrahim M.M. & Zhang G.F. (2019). Seasonal diversity of endophytic bacteria associated with *Cinnamomum camphora* (L.) Presl. *Diversity*. 11(7): 112.
- Emami S., Alikhani H.A., Pourbabae A.A., Etesami H., Motasharezaeh B. & Sarmadian F. (2020). Consortium of endophyte and rhizosphere phosphate solubilizing bacteria improves phosphorous use efficiency in wheat cultivars in phosphorus deficient soils. *Rhizosphere*. 14: 100196.
- 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.
- Joshi S., Singh A.V. & Prasad, B. (2018). Enzymatic activity and plant growth promoting potential of endophytic bacteria isolated from *Ocimum sanctum* and *Aloe vera*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 7(6): 2314-2326.
- Lã Đình Môi, Châu Văn Minh, Trần Văn Sung, Phạm Quốc Long, Phan Văn Kiêm, Trần Huy Thái, Trần Minh Hợi, Ninh Khắc Bản & Lê Mai Hương (2013). Họ nhân sâm (Araliaceae Juss.)-Nguồn hoạt chất sinh học đa dạng và đầy triển vọng ở Việt Nam. *Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 5*. Ngày 18/10/2013. Hà Nội. tr. 1152-1158.
- Li L., Mohamad O.A., Ma J., Friel A.D., Su Y. Wang Y. Musa Z., Liu Y., Hedlund B.P. & Li W. (2018). Synergistic plant-microbe interactions between endophytic bacterial communities and the medicinal plant *Glycyrrhiza uralensis* F. Antonie Van Leeuwenhoek. 111(10): 1735-1748.
- Lucero C.T., Lorda G.S., Anzuay M.S., Ludueña L.M. & Taurian T. (2021). Peanut endophytic phosphate solubilizing bacteria increase growth and P content of soybean and maize plants. *Current Microbiology*. 78(5): 1961-1972.
- Mahmud K., Makaju S., Ibrahim R. & Missaoui A. (2020). Current progress in nitrogen fixing plants and microbiome research. *Plants*. 9(1): 97.
- Montañez A., Blanco A.R., Barlocco C., Beracochea M. & Sicardi M. (2012). Characterization of

- cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. *Applied Soil Ecology*. 58: 21-28.
- Moreau D., Bardgett R.D., Finlay R.D., Jones D.L. & Philippot L. (2019). A plant perspective on nitrogen cycling in the rhizosphere. *Functional Ecology*. 33(4): 540-552.
- Murphy J.A.M.E.S. & Riley J.P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*. 27: 31-36.
- 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.
- Nguyễn Hữu Hiệp & Nguyễn Thị Mai Khanh (2010). Phân lập và nhận diện một số chủng vi khuẩn cố định nitơ trên cây bắp. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 16(a): 151-156.
- 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 bắp lai. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. 23: 17-23.
- Olanrewaju O.S., Glick B.R. & Babalola O.O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 33(11): 1-16.
- Rana K.L., Kour D., Kaur T., Devi R., Yadav A. & Yadav A.N. (2021). Bioprospecting of endophytic bacteria from the Indian Himalayas and their role in plant growth promotion of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 9(03): 41-50.
- Sagar A., Riyazuddin R., Shukla P.K., Ramteke P.W. & Sayyed R.Z. (2020). Heavy metal stress tolerance in *Enterobacter* sp. PR14 is mediated by plasmid. *Indian Journal of Experimental Biology*. 58: 115-121.
- Schaller J., Faucherre S., Joss H., Obst M., Goeckede M., Planer-Friedrich B., Peiffer S., Gilfedder B. & Elberling B. (2019). Silicon increases the phosphorus availability of Arctic soils. *Scientific Reports*. 9(1): 1-11.
- 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.
- Zega A. & Suryanto D. (2018). An ability of endophytic bacteria from nutgrass (*Cyperus rotundus*) from lafau beach of north nias in producing indole acetic acid and in solubilizing phosphate. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 130: 012007.