

PHÂN LẬP VÀ NHẬN DIỆN VI KHUẨN NỘI SINH CÓ ĐẶC TÍNH TỐT VỀ KHẢ NĂNG CỐ ĐỊNH ĐẠM, HÒA TAN LÂN VÀ TỔNG HỢP IAA TRONG CÂY ĐẬU PHỘNG TRỒNG TRÊN ĐẤT XÁM BẠC MÀU TẠI TỈNH BÌNH ĐỊNH

Bùi Thanh Đạo¹, Ngô Thanh Phong², Cao Ngọc Diệp³

TÓM TẮT

Phân lập được 236 dòng vi khuẩn từ 152 mẫu nốt sần, rễ, thân cây đậu phộng (lạc) trồng ở vùng đất xám bạc màu tỉnh Bình Định (4 huyện: Phù Cát, Hoài Nhơn, Văn Canh, Tây Sơn), chúng đều tạo màng mỏng (pellicle), đều có khả năng cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA. Chọn lọc 20 dòng có đặc tính tốt về khả năng cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA để nhận diện bằng kỹ thuật PCR cho thấy 20 dòng này đều là vi khuẩn nội sinh. Giải trình tự ADN cho kết quả 20 dòng vi khuẩn thuộc 6 chi, trong đó 10 dòng thuộc chi *Acinetobacter*, 3 dòng thuộc chi *Enterobacter*, 1 dòng thuộc chi *Klebsiella*, 1 dòng thuộc chi *Sphingomonas*, 4 dòng thuộc chi *Bacillus*, 1 dòng thuộc chi *Burkholderia* với tỷ lệ tương đồng từ 98%-99%. Đề nghị tiến hành khảo sát hiệu quả ngoài đồng của các dòng này và ứng dụng sản xuất phân sinh học.

Từ khóa: Cố định đạm, đất xám bạc màu, hòa tan lân, tổng hợp IAA, phân sinh học, vi khuẩn nội sinh.

1. GIỚI THIỆU

Đậu phộng (lạc, đậu phụng) (*Arachis hypogaea* L.) là loài cây thực phẩm thuộc họ Đậu (Fabaceae), cũng là loài cây trồng để cải tạo đất vì sau vụ đậu sẽ để lại lượng đạm rất lớn cho đất khoảng 50-100 kg N/ha [10]. Bên cạnh vi khuẩn nốt sần, nhiều kết quả nghiên cứu cho thấy bên trong hệ thống mô của cây đậu phộng có chứa hệ vi khuẩn nội sinh. Vi khuẩn nội sinh giúp tăng cường sự sinh trưởng của cây [2], thúc đẩy các quá trình chuyển hóa trong cây, sự phát triển lông rễ một cách mạnh mẽ [7], tăng hàm lượng các chất khoáng, tăng khả năng kháng nhiều nguồn bệnh khác nhau của cây [5], [1], giúp cố định đạm sinh học, giảm tính miễn cảm với mầm bệnh và sự thay đổi của thời tiết gây tổn hại cho cây [20], hòa tan lân khó tan cho cây trồng hấp thụ tốt chất dinh dưỡng [9].

Bình Định thuộc vùng sinh thái duyên hải Nam Trung bộ, có nhiều nhóm đất, trong đó đất xám bạc màu chiếm diện tích lớn với 70.809 ha, chiếm 11,75% diện tích đất nông nghiệp. Đây là loại đất được hình thành ở địa hình cao của vùng đồng bằng, địa hình thấp, bằng của vùng chuyển tiếp giữa đồng bằng và

đồi núi, ở nơi có độ che phủ thấp trên trầm tích phù sa cổ và mẫu chất của đá macma axit, đá cát. Đất có phản ứng chua, độ phì nhiêu tự nhiên không cao, thành phần cơ giới nhẹ [18].

Để tiến tới một nền nông nghiệp bền vững, đậu phộng trồng trên đất xám bạc màu tại tỉnh Bình Định cần được nghiên cứu về những vi khuẩn nội sinh, xác định và đánh giá một số đặc tính tốt như cố định đạm, hòa tan lân, sinh tổng hợp kích thích tố tăng trưởng thực vật như IAA để ứng dụng những vi khuẩn nội sinh tốt cho cây trồng nói chung và cây đậu phộng nói riêng.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương pháp thu thập, xử lý mẫu và phân lập các dòng vi khuẩn

2.1.1. Thu thập và xử lý mẫu

Mẫu được thu tại 4 huyện của tỉnh Bình Định trồng đậu phộng trên vùng đất xám bạc màu (Phù Cát, Hoài Nhơn, Văn Canh, Tây Sơn).

Chọn cây đậu phộng đang ở giai đoạn tăng trưởng mạnh. Thu mẫu cả phần đất xung quanh rễ với đường kính là 15 cm, sâu 15 cm. Thu toàn bộ cây đậu phộng (cắt bỏ lá và thân từ độ cao trên 10 cm). Rửa thật sạch mẫu dưới vòi nước mạnh để loại bỏ đất, bụi bẩn; để ráo tự nhiên. Chọn các bộ phận (nốt sần, rễ, thân) không có dấu hiệu bệnh. Cắt mẫu thành từng đoạn ngắn (2 - 3 cm); để riêng từng loại mẫu

¹ NCS Viện NC&PT CNSH, Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

³ Viện NC&PT CNSH, Trường Đại học Cần Thơ

Email: daobt29@gmail.com

trong từng ống Falcon có ghi nhãn. Cắt mẫu rễ và thân đậu phộng đã qua xử lý thành từng đoạn nhỏ 1 cm, cắt nốt sẵn cho vào bình tam giác 250 ml. Cho cồn 96° vào bình tam giác vừa ngập mẫu, lắc nhẹ trong thời gian 10 phút. Rửa sạch mẫu bằng nước cất vô trùng 3 lần (5 phút/lần). Cho canxi hipoclorit 2% hoặc nước javen, lắc nhẹ trong 10 phút. Rửa sạch mẫu bằng nước cất vô trùng 4 lần (5 phút/lần). Hút 100 - 200 µl của nước rửa lần thứ 4 chủng trên các đĩa chứa môi trường TYGA (Tryptone – Yeast extract – glucose – agar), ủ ở 30°C. Sau 24 - 48 giờ, nếu trên các đĩa môi trường này không xuất hiện khuẩn lạc thì mẫu đã đạt yêu cầu khử trùng.

2.1.2. Phân lập các dòng vi khuẩn

Mẫu khử trùng đạt yêu cầu được cho vào cối chày vô trùng, giã nhuyễn. Cho thêm 0,5 - 1 ml nước cất vô trùng vào cối, khuấy đều và hút 100 µl dịch trích mẫu chủng vào các ống nghiệm chứa môi trường bán đặc (mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần). Mẫu thân và rễ phân lập ở môi trường PDA, mẫu nốt rễ phân lập ở môi trường G₆. Đậy kín các ống nghiệm, đem ủ ở 30°C khoảng 2 - 4 ngày. Sau 2 - 4 ngày, quan sát ống nghiệm, nếu thấy có một lớp màng mỏng (pellicle) gần bề mặt môi trường thì chứng tỏ có sự hiện diện của vi khuẩn nội sinh. Dùng kim cấy đã khử trùng đâm xuyên qua màng pellicle và cấy vào đĩa môi trường đặc tương ứng, ủ ở 30°C. Sau 24 - 48 giờ, các khuẩn lạc khác nhau mọc trên bề mặt môi trường được tiếp tục cấy chuyển sang các đĩa môi trường tương ứng vài lần đến khi các khuẩn lạc xuất hiện trên đường cấy rời nhau và hình thái khuẩn lạc thuần nhất. Kiểm tra độ rỗng bằng cách quan sát dưới kính hiển vi bằng phương pháp giọt ép. Khi thấy vi khuẩn đã thật sự rỗng (thuần nhất) thì cấy chuyển sang ống nghiệm chứa môi trường đặc tương ứng để trữ ở 4°C và được xem như một chủng (isolate) thuần [3].

2.2. Khảo sát đặc tính cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA

2.2.1. Định lượng amoni (khả năng cố định đạm)

Vi khuẩn được nuôi trong môi trường Burk's đặc không có N [14] và định lượng amoni hình thành trong mẫu bằng phương pháp Phenon phổ hóa nito natri hipoclorit để xác định hàm lượng NH₄⁺ được tạo ra bằng phản ứng so màu ở bước sóng 636 nm.

2.2.2. Định lượng lân hòa tan

Vi khuẩn được nuôi trong môi trường NBRIP [11] và định lượng lân hòa tan bằng thuốc thử axit ascobic – amoni molybdat – kali hidro tacrat và phương pháp so màu Oniani ở bước sóng 880 nm.

2.2.3. Định lượng IAA

Vi khuẩn được nuôi trong môi trường bổ sung 100 mg/l tryptophan và định lượng bằng thuốc thử Salkowski R2 và phương pháp so màu ở bước sóng 530 nm.

2.3. Nhận diện các dòng vi khuẩn

2.3.1. Kỹ thuật PCR

Tách chiết ADN vi khuẩn:

Quy trình được thực hiện theo Nguyễn Thị Thu Hà và ctv. (2009) [12].

Để nhận diện vi khuẩn sống nội sinh, sử dụng các đoạn mồi 16S rDNA được thiết kế theo Zinniel *et al.*, 2002 [20] với trình tự như đã trình bày theo Nguyễn Thị Thu Hà *et al.* (2009) [12].

2.3.2. Giải trình tự ADN

Sử dụng đoạn mồi 1 p515FPL trong phản ứng PCR để nhận diện vi khuẩn nội sinh đã mô tả ở phần trên. Sản phẩm PCR được loại bỏ các hóa chất PCR còn lại trong ống nghiệm bằng EDTA và cồn để thu được sản phẩm ADN sạch. Sản phẩm ADN này được sử dụng giải trình tự bằng hệ thống máy giải trình tự động ABI 3130. Sử dụng chương trình BLAST N và BioEdit để so sánh trình tự các đoạn ADN của 3 dòng vi khuẩn với trình tự ADN của bộ gen ở các loài vi khuẩn có trong ngân hàng gen (NCBI).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

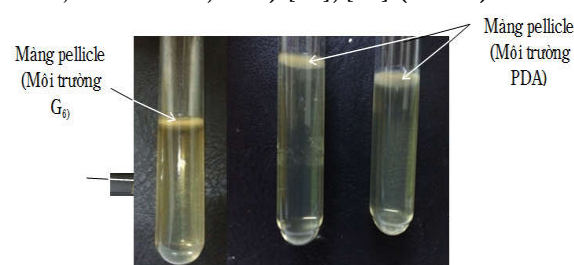
3.1. Phân lập vi khuẩn nội sinh

Từ 152 mẫu (38 mẫu thân, 38 mẫu rễ và 38 mẫu nốt sần) thu được 236 dòng, trong đó có 174 dòng phân lập trên môi trường PDA, 62 dòng phân lập trên môi trường G₆. 85 dòng phân lập từ rễ chiếm 36,02%, 89 phân lập từ thân chiếm 37,71% và 62 phân lập từ nốt rễ chiếm 26,27% (Bảng 1).

Bảng 1. Kết quả phân lập các dòng vi khuẩn trên hai môi trường PDA và G₆

Môi trường phân lập	Nguồn gốc	Số lượng	Tỷ lệ (%)
PDA	Thân	89	37,71%
	Rễ	85	36,02%
G ₆	Nốt rễ	62	26,27%

Các dòng vi khuẩn phân lập được đều có chung một đặc tính là sinh trưởng và phát triển ở điều kiện vi hiếu khí trong các môi trường bán đặc, chúng phát triển thành lớp màng mỏng cách mặt môi trường nuôi khoảng 2 – 5 mm. Kết quả này phù hợp với báo cáo của Weber *et al.* (1999) [19], theo nghiên cứu của Perin *et al.* (2006) [15] thì lớp màng mỏng hình thành cách mặt môi trường là 4 mm, kết quả của Santos *et al.* (2001) [17] là khoảng 1 – 4 mm và theo báo cáo của Nguyễn Thị Thu Hà *et al.* (2009) [12] thì lớp màng cách mặt môi trường từ 0,5 – 1 cm. Lớp màng mỏng hình thành trong môi trường bán đặc này có màu hơi trắng hoặc hơi vàng (Perin *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2001) [15], [17] (Hình 1).



Hình 1. Vi khuẩn sau 24 giờ nuôi trong môi trường bán đặc G_6 và PDA

3.2. Một số đặc tính của các dòng vi khuẩn nội sinh phân lập được

3.2.1. Khả năng cố định đạm

Tất cả 236 dòng vi khuẩn được khảo sát đều có khả năng tạo NH_4^+ cấy trên môi trường Burk đặc (agar) không đạm. Hàm lượng đạm sinh ra được đo vào ngày thứ 2, 4, 6, 8 sau nuôi cấy, trong đó dòng GN65b cố định đạm cao nhất với hàm lượng trung bình là 5,54 mg/L.

3.2.2. Khả năng hòa tan lân khó tan

Tất cả 236 dòng vi khuẩn được khảo sát đều có khả năng hòa tan lân khó tan trong môi trường NBRIP. Lượng lân hòa tan được đo vào các ngày 5, 10, 15, 20 sau nuôi cấy, dòng PT95a hòa tan được nhiều lân nhất với hàm lượng trung bình là 374,75 mg/L.

3.2.3. Khả năng tổng hợp indol-3-acetic acid (IAA)

Tất cả 236 dòng vi khuẩn nuôi cấy trong môi trường phân lập tương ứng có bổ sung 100 mg/l tryptophan được khảo sát đều có khả năng tổng hợp IAA. Lượng IAA được tổng hợp được đo vào các ngày 2, 4, 6, 8 sau nuôi cấy, dòng PT95b có khả năng tổng hợp IAA cao nhất với hàm lượng trung bình là 12,73 μ g/L.

Từ kết quả khảo sát trên, chọn ra 20 dòng có đặc tính tốt về cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA (Bảng 2) để tiến hành nhận diện bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự ADN.

Bảng 2. Các dòng vi khuẩn có đặc tính tốt về cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA*

Stt	Dòng vi khuẩn	Lượng đạm cố định trung bình (mg/L)	Lượng lân hòa tan trung bình (mg/L)	Lượng IAA tổng hợp trung bình (μ g/L)
1	PT14a	5,27	13,30	1,62
2	PT12b	4,79	38,88	2,42
3	PT16a	3,85	51,33	2,06
4	PR10b	3,71	4,49	1,80
5	PT12c	0,22	28,32	6,10
6	GN56b	0,04	93,97	3,57
7	GN57b	1,64	111,61	3,37
8	GN60b	4,24	114,56	3,78
9	GN65b	5,54	23,51	3,48
10	PR61a	0,04	111,60	5,84
11	PR66b2	0,31	229,61	0,60
12	PR67	0,11	198,69	0,98
13	PR68a	0,08	360,56	0,42
14	PT67	0,08	172,37	0,63
15	GN74c	0,62	248,09	2,02
16	PT95b	0,21	177,61	12,73
17	GN91a	0,05	109,55	12,49

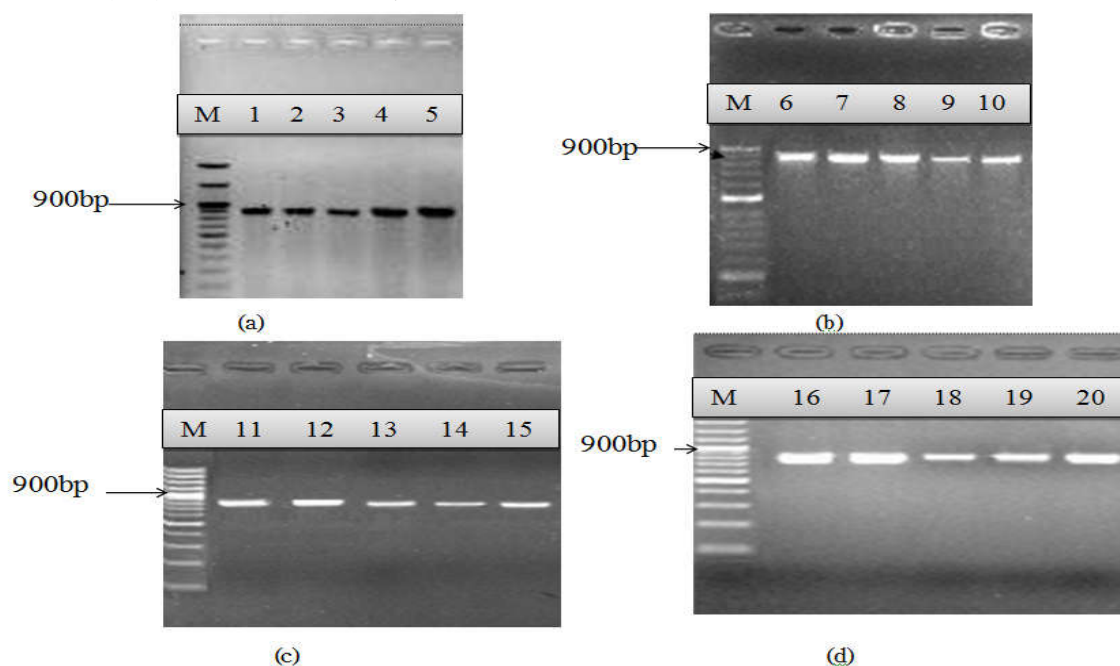
18	PT93a	0,17	230,85	3,35
19	PT95a	0,46	374,75	10,85
20	PR92a	0,40	149,77	10,50
	C.V. (%)	7,02	3,80	3,89

* Số liệu trung bình từ 4 huyện (Tây Sơn, Phù Cát, Hoài Nhơn, Văn Canh)

3.3. Nhận diện các dòng vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR

Khi phân tích PCR với 3 đoạn mỗi 16S rDNA (p515FPL, p-13B và PCR-1) để nhận diện các dòng vi khuẩn đã chọn lọc đều là vi khuẩn nội sinh, 20/20

dòng cho băng ADN ở vị trí khoảng 900 bp so với thang chuẩn (Hình 2a, 2b, 2c, 2d), phù hợp với kết quả nghiên cứu trước đây của Zinniel *et al.* (2002) [21], Nguyễn Thị Thu Hà *et al.* (2009) [12], Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Ái Chi (2009) [4].



Hình 2. Phổ điện di sản phẩm PCR được nhân lên từ ADN của các dòng vi khuẩn

(Ghi chú: M: thang chuẩn; 1: PT14a; 2: PT12b; 3: PT16a; 4: PR10b; 5: PT12c; 6: GN56b; 7: GN57b; 8: GN60b; 9: GN65b; 10: PR61a; 11: PR66b2; 12: PR67; 13: PR68a; 14: PT67; 15: GN74c; 16: PT95b; 17: GN91a; 18: PT93a; 19: PT95a; 20: PR92a.)

3.4. Kết quả giải trình tự ADN của một số dòng vi khuẩn

Sản phẩm PCR (với cặp mồi p515FPL – P13B – PCR1) của 20 dòng vi khuẩn được sử dụng để giải trình tự ADN và sử dụng phần mềm Blast N để so sánh với trình tự ADN của các dòng vi khuẩn có

trong ngân hàng dữ liệu NCBI. Kết quả cho thấy trình tự các dòng vi khuẩn có độ tương đồng với trình tự gen của dòng vi khuẩn trên ngân hàng dữ liệu rất cao 98%-99% và các dòng vi khuẩn tương đồng đều là các chi thuộc vi khuẩn nội sinh (Bảng 3).

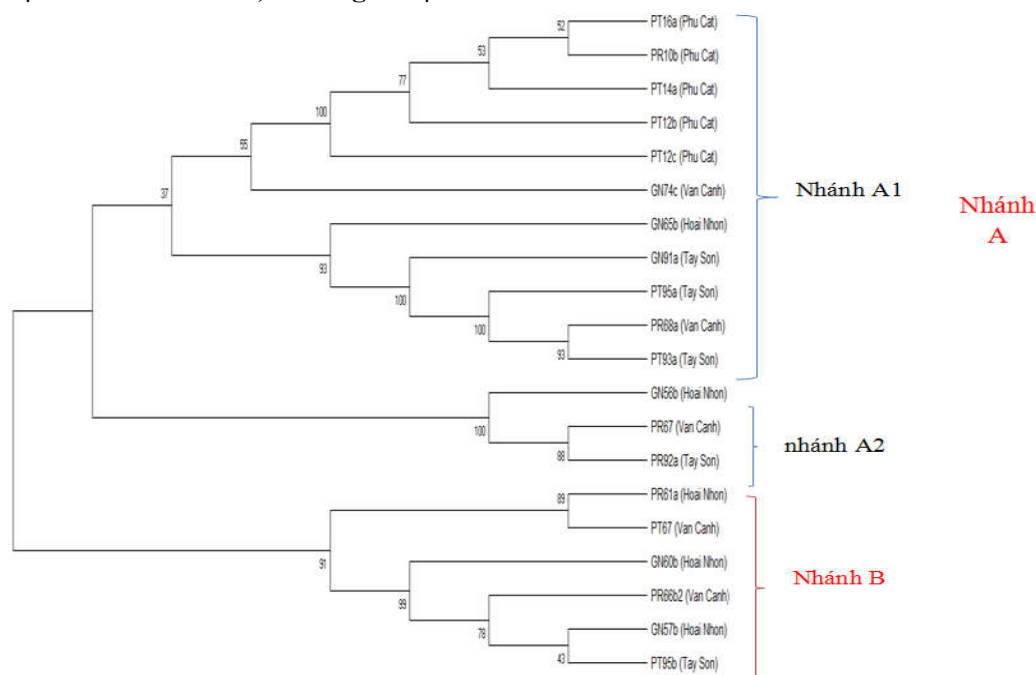
Bảng 3. Tổng hợp kết quả so sánh trình tự ADN của các dòng vi khuẩn trên NCBI

Tên dòng	Chiều dài (bp)	Các loài quan hệ	Mã số	Tương đồng
PT16a	860	<i>Acinetobacter sp.</i> strain SWSWS1	KX608736	99%
PT14a	859	<i>Acinetobacter seifertii</i> strain BT_HNGU_4	KY010311	99%
PT12b	859	<i>Acinetobacter nosocomialis</i> strain PE5	MF943157	99%
PR10b	858	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain NCTC7364	LT605059	99%

PT12c	715	<i>Enterobacter kobei</i> strain BM10	MF953259	99%
GN56b	860	<i>Klebsiella</i> sp. HK34 - 2	AY335553	99%
GN57b	865	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain IITG – ORWB3	MH036346	99%
GN60b	858	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain EH52	GU339280	99%
GN65b	849	<i>Sphingomonas pituitosa</i> strain C_G_AE - 1	KJ186947	98%
PR61a	857	<i>Acinetobacter junii</i> strain NF110	KP772089	99%
PR66b2	848	<i>Acinetobacter</i> sp. 3JJ_ W5-01	JF722673	99%
PR67	842	<i>Enterobacter cloacae</i> strain SS3(5)	MH488987	99%
PR68a	843	<i>Bacillus megaterium</i> strain TIL_CHIN_81	KT998828	99%
PT67	843	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> strain petra-09	GQ141870	99%
GN74c	836	<i>Burkholderia ambifaria</i> strain YL-CS2	MF419183	99%
PT95b	844	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	MH084921	99%
GN91a	844	<i>Bacillus subtilis</i>	KX950748	99%
PT93a	828	<i>Bacillus megaterium</i>	JQ833743	98%
PT95a	843	<i>Bacillus flexus</i>	KF417548	99%
PR92a	843	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	KT119349	99%

Bảng 3 cho kết quả 20 dòng vi khuẩn thuộc 6 chi, trong đó 10 dòng thuộc chi *Acinetobacter*, 3 dòng thuộc chi *Enterobacter*, 1 dòng thuộc chi

Klebsiella, 1 dòng thuộc chi *Sphingomonas*, 4 dòng thuộc chi *Bacillus*, 1 dòng thuộc chi *Burkholderia*.



Hình 3. Cây phả hệ (phylogenetic tree) trình bày mối quan hệ di truyền của 20 dòng vi khuẩn nội sinh

Cây phả hệ của 20 dòng vi khuẩn được xây dựng dựa theo phần mềm MEGA 6,06, với chỉ số bootstrap 1000. Phương pháp Maximum-Likelihood (liên kết các dòng tương cận) được chọn để xây dựng cây phả hệ.

Hình 3 cho thấy các dòng vi khuẩn nội sinh của huyện Phù Cát có sự tách biệt với các dòng của 3

huyện còn lại nằm trong nhánh A1, riêng nhánh A2 có sự xen kẽ của 3 dòng vi khuẩn từ 3 huyện. Các dòng ở huyện Hoài Nhon, Vân Canh và Tây Sơn có quan hệ di truyền gần gũi nhau, nằm trong nhánh B. Điều này có nghĩa có sự giao thoa về mặt di truyền giữa các dòng vi khuẩn nội sinh giữa 3 huyện và có thể lý giải là do vi khuẩn được phân tán theo nguồn

giống đậu phộng (giống sử dụng tại huyện Hoài Nhơn được sử dụng từ nguồn giống của huyện Văn Canh hoặc Tây Sơn hoặc ngược lại) và quá trình mua bán hay trao đổi giống đậu và vi khuẩn đi theo (thuyết Gene-flow).

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

- Phân lập được 236 dòng vi khuẩn nội sinh từ mẫu thân, rễ, nốt sần của cây đậu phộng. Trong đó có 174 dòng phân lập trên môi trường PDA, 62 dòng trên môi trường G_6 , 85 dòng phân lập từ rễ chiếm 36,02%, 89 từ thân chiếm 37,71% và 62 từ nốt sần chiếm 26,27%. Tất cả các dòng đều có khả năng cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA, trong đó, dòng GN65b cố định đạm cao nhất (5,54 mg/L), dòng PT95a hòa tan được nhiều lân nhất (374,75 mg/L), dòng PT95b có khả năng tổng hợp IAA cao nhất (12,73 μ g/L).

- Phân tích PCR với 3 đoạn mỗi 16S ADN (p515FPL, p-13B và PCR-1) để nhận diện các dòng vi khuẩn có đặc tính tốt về khả năng cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA cho thấy 20/20 dòng đều là vi khuẩn nội sinh.

- Giải trình tự ADN cho kết quả 20 dòng vi khuẩn thuộc 6 chi, trong đó 10 dòng thuộc chi *Acinetobacter*, 3 dòng thuộc chi *Enterobacter*, 1 dòng thuộc chi *Klebsiella*, 1 dòng thuộc chi *Sphingomonas*, 4 dòng thuộc chi *Bacillus*, 1 dòng thuộc chi *Burkholderia*.

4.2. Đề nghị

- Tiến hành đánh giá ngoài đồng những dòng vi khuẩn nội sinh có đặc tính tốt đã được định danh tiến tới nghiên cứu và sử dụng nguồn vi khuẩn nội sinh tốt làm phân sinh học để ứng dụng cho cây trồng.

- Tiếp tục phân lập và chọn lọc những dòng vi khuẩn nội sinh trong cây đậu phộng có đặc tính tốt ở những vùng đất khác của tỉnh Bình Định để bổ sung vào nguồn giống vi khuẩn nội sinh của địa phương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bandara, W. M. M. S., Gamini Seneviratne and S. A. Kulasoorya, 2006. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. *J. Biosci.* 31, pp. 645-650.

2. Barbieri, P., T. Zanelli, E. Galli and G. Zanetti, 1986. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. *FEMS Microbiology Letters* 36, 87-90.

3. Cao Ngọc Diệp, 2011. Vi khuẩn nội sinh thực vật (Endophytic bacteria). Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ, Cần Thơ.

4. Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Ái Chi, 2009. Phân lập và đặc tính của vi khuẩn nội sinh trong cây khóm trồng trên đất phèn huyện Bến Lức, tỉnh Long An, Việt Nam. Tuyển tập công trình nghiên cứu của hội nghị Công nghệ sinh học năm 2009 tổ chức tại thành phố Hồ Chí Minh, 23-24, tháng 10 năm 2009, trang 69-73.

5. Fahey, J. W., M. B. Dimock, S. F. Tomasino, J. M. Taylor, and P. S. Carlson, 1991. Genetically engineered endophytes as biocontrol agents: a case study from industry. In *Microbial ecology of leaves*. Springer-Verlag, London, United Kingdom. pp. 401-411.

6. FAOSTAT, 2017. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

7. Harari, A., J. Kigel and Y. Okon, 1988. Involvement of IAA in the interaction between *Azospirillum brasilense* and *Panicum milliaceum* roots. *Plant and Soil* 110:275-282.

8. Hoàng Thị Thái Hòa, Lê Hoài Nam, 2012. Nghiên cứu ảnh hưởng của các liều lượng bón đạm và kali đến năng suất lạc trên đất cát biển tỉnh Bình Định. *Tạp chí Khoa học - Đại học Huế*, tập 71, số 2.

9. Lăng Ngọc Dâu, Nguyễn Thị Xuân Mỹ và Cao Ngọc Diệp, 2007. Khả năng cố định đạm, hòa tan lân và sinh tổng hợp IAA của vi khuẩn *Azospirillum lipoferum*. Tuyển tập báo cáo Khoa học Hội nghị toàn quốc 2007. Nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống. Quy Nhơn 10-08-2007. NXB KH-KT. Trang 445- 448.

10. Nguyễn Hữu Hiệp và Trần Thị Tuyết Linh, 2009. Hiệu quả của vi khuẩn cố định đạm và hòa tan lân lên năng suất đậu phộng trồng trên đất cát tỉnh Trà Vinh. *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ*, 11b: 134 – 145.

11. Nautiyal, C. S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170, 265-270.

12. Nguyễn Thị Thu Hà, Hà Thanh Toàn và Cao Ngọc Diệp, 2009. Phân lập và đặc tính của những dòng vi khuẩn nội sinh trong một số cây cỏ chăn nuôi. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 7(2), 241-250.

13. Niên giám Thống kê tỉnh Bình Định (Bình định statistical yearbook), 2017. Nhà xuất bản Thống kê 2018.

14. Park M., Kim C., Yang J., Lee H., Shin W., Kim S. and Sa T., 2005. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiol. Res.* 160: 127-133.
15. Perin, L., L. Martinez-Aguilar, R. Castro-Gonzalez, P. Estrada-de los Santos, T. Cabellos-Avelar, H. V. Guedes, V. M. Reis and J. Caballero-Mellado, 2006. Diazotrophic Burkholderia Species Associated with Field-Grown Maize and Sugarcane. *Applied and environmental microbiology* 72, 5, pp. 3103-3110.
16. Rosenblueth M. and E. Martínez-Romero, 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Am. Phytopathol. Soc.* 19, 827-837.
17. Santos, Paulina Estrada-De Los, Doci'o Bustillos-Cristales and Jesús Caballero-Mellado, 2001. Burkholderia, a genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution. *Applied and Environmental Microbiology* 67, pp. 2790-2798.
18. Viện Quy hoạch và Thiết kế nông nghiệp, Phân viện QH&TKNN miền Trung, 2005. Chương trình điều tra bổ sung, chỉnh lý xây dựng bản đồ đất tỷ lệ 1/50.000 – 1/100.000 các tỉnh duyên hải Nam Trung bộ. Báo cáo bản đồ đất tỉnh Bình Định.
19. Weber, O. B., Baldani V. L. D., Teixeira K. R. S., Kirchof G., Baldani J. I. and Dobereiner J., 1999. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant and Soil* 210, 03-113.
20. Xu, H., M. Griffith, C. L. Patten and B. R. Glick, 1998. Isolation and characterization of an antifreeze protein with ice nucleation activity from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Can. J. Microbiol.* 44, 64-73.
21. Zinniel, K. D., P. Lambrecht, N. B. Harris, Z. Feng, D. Kuczmarski, P. Higley, C. A. Ishimaru, A. Arunakumari, R. G. Barletta and A. K. Vidaver, 2002. Isolation and characterization of endophytic bacteria from agronomic crops and Prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2198-2208.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA WITH GOOD CHARACTERISTICS AS NITROGEN FIXATION, PHOSPHATE SOLUBILIZATION AND IAA BIOSYNTHESIS FROM PEANUT (*Arachis hypogaea* L.) CULTIVATED ON ACRISOLS OF BINH DINH PROVINCE

Bui Thanh Dao, Ngo Thanh Phong, Cao Ngoc Diep

Summary

Two hundred and thirty-six bacterial isolates were isolated from one hundred and fifty-two peanut nodules, roots and stems cultivated on acrisols of Binh Dinh province (four districts: Phu Cat, Hoai Nhon, Van Canh, Tay Son), all of them formed pellicles in the semi-solid medium, and they had ability of nitrogen fixation, phosphate solubilization and IAA biosynthesis. Twenty isolates having the good characteristics were identified by PCR-16S-rDNA technique. Sequencing 16S-rDNA gene of these endophytes, DNA sequencing was compared with Genbank database of NCBI by BLAST N software. The result showed that twenty isolates belonged to six genera, including to ten isolates was *Acinetobacter* genus, three isolates were *Enterobacter* genus, one isolate was *Klebsiella* genus, one isolate was *Sphingomonas* genus, four isolates were *Bacillus* genus, one isolate was *Burkholderia* genus with high similarity (98-99%). Interestingly, these endophytes had the best composite characteristics, they will be suggested to evaluate in the field and bio-fertilizer production for peanut cultivation on the acrisols.

Keywords: Acrisols, bio-fertilizer, endophytic bacteria, IAA biosynthesis, nitrogen fixation, phosphate solubilization.

Người phản biện: TS. Bùi Huy Hiền

Ngày nhận bài: 25/11/2020

Ngày thông qua phản biện: 25/12/2020

Ngày duyệt đăng: 4/01/2021