

KHẢO SÁT ĐẶC TÍNH KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG THỰC VẬT CỦA CHỦNG VI KHUẨN NỘI SINH *Enterobacter* sp. RC20 PHÂN LẬP TỪ RỄ CÂY ĐIỀN THANH (*Sesbania sesban* L.)

**Nguyễn Thị Bích Thùy, Nguyễn Thị Hồng Hiền,
Phạm Gia Bảo, Nguyễn Yến Nhi, Nguyễn Văn Giang***

Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

**Tác giả liên hệ: nvgiang@vnua.edu.vn*

Ngày nhận bài: 01.04.2025

Ngày chấp nhận đăng: 09.09.2025

TÓM TẮT

Vi khuẩn nội sinh sống trong các mô của thực vật, cung cấp cho cây chủ nhiều lợi ích như bổ sung phytohormone, tăng khả năng hấp thụ dinh dưỡng. Trên cơ sở so sánh nồng độ IAA được tổng hợp, chủng RC20 được lựa chọn từ các chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ rễ cây điền thanh. Kết quả so sánh các đặc điểm hoá sinh và trình tự nucleotide 16S rRNA của chủng RC20 với một số trình tự trên GenBank xác định chủng RC20 thuộc chi *Enterobacter* và đặt tên *Enterobacter* sp. RC20. Chủng *Enterobacter* sp. RC20 thể hiện các đặc tính kích thích sinh trưởng cây trồng như phân giải phosphate khó tan, kali khó tan và sinh siderophore. Ở thí nghiệm *in vivo*, chủng *Enterobacter* sp. RC20 được bổ sung vào đất trồng đã làm tăng khả năng sinh trưởng và phát triển của cây ớt. Chiều cao, chiều dài rễ cây ớt được bổ sung chủng *Enterobacter* sp. RC20 so với cây ớt không được bổ sung chủng vi khuẩn này tăng lần lượt 27,63% và 46,32%. Trọng lượng cây ớt tươi và khô cũng tăng tương ứng 24,13% và 39,32% so với nhóm cây đối chứng không xử lý. Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng *Enterobacter* sp. RC20 là chủng vi khuẩn tiềm năng cho hướng nghiên cứu tiếp theo hướng tới sản xuất chế phẩm sinh học có lợi trong trồng trọt.

Từ khoá: Điền thanh, vi khuẩn kích thích sinh trưởng thực vật, IAA, vi khuẩn nội sinh, siderophore.

Characterization of Plant-growth Promoting Traits of Endophytic Bacterial Strain *Enterobacter* sp. RC20 Isolated from Roots of *Sesbania sesban* L.

ABSTRACT

Endophytic bacteria, which are able to live in the tissue of plants, are of interest to scientists due to various benefits they provide to the host plant, such as supplementing phytohormones and enhanced ability to absorb nutrients. This study aimed to select an endophytic bacterial strain from the roots of the *Sesbania sesban* L. that can stimulate plant growth. The bacterial strain RC20 was selected from isolated endophytic bacterial strains based on its ability to synthesize high IAA concentration. Comparison of biochemical characteristics and the 16S rRNA nucleotide sequence with those from the GenBank, the strain RC20 belonged to the genus *Enterobacter*, named as *Enterobacter* sp. RC20. Strain *Enterobacter* sp. RC20 exhibited some plant growth-promoting abilities, such as solubilizing phosphate and potassium, and producing siderophores. *In vivo* experiment *Enterobacter* sp. RC20 added into the growing medium increased the growth and development of chilli. The plant height and root length of chilli supplemented with *Enterobacter* sp. RC20 increased by 27.63% and 46.32% in comparison with the control. The fresh weight and dry weight of the treated chilli plants also showed superior growth compared to the untreated ones with a rate of 24.13% and 39.32%, respectively. These findings suggest *Enterobacter* sp. RC20 as a potential candidate for future research into beneficial agricultural bioproducts.

Keywords: *Sesbania sesban* L., plant-growth promoting bacteria, IAA, endophytic bacteria, siderophore.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vì khuẩn nội sinh là những vi khuẩn có khả năng sống bên trong các mô của cây, giúp cây chủ thu nhận dinh dưỡng, kháng bệnh hại và điều hòa phản ứng sinh lý của cây trong các điều kiện khắc nghiệt (Ahmed & cs., 2012). Chúng có thể làm tăng độ phì nhiêu cho đất thông qua phân giải các hợp chất phosphate khó tan và cố định nitơ tự do (Burrage & Jeon, 2021), tổng hợp các phytohormone kích thích sinh trưởng của thực vật như indole-3-acetic acid (IAA), gibberellin (Phạm Hồng Hiến & cs., 2021), tăng hàm lượng các chất khoáng, tăng khả năng kháng bệnh, chống lại các điều kiện bất lợi, tăng tính miễn dịch cho cây trồng (Eid & cs., 2019). Các chủng vi khuẩn này có tiềm năng ứng dụng làm chế phẩm sinh học cải thiện năng suất và chất lượng cây trồng (Mushtaq & cs., 2023). Vì thế, ngày càng có nhiều nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh để phát triển các giống cây trồng có năng suất cao và sinh khối lớn để sản xuất nhiên liệu sinh học (Burrage & Jeon, 2021).

Điền thanh hay điền điển (*Sesbania sesban* L.) thuộc họ Đậu (Fabaceae), nổi bật với khả năng sinh trưởng trên đất nghèo dinh dưỡng, đất mặn, đất chua hoặc đất bị xói mòn, là nguồn tài nguyên quý giá trong phát triển nông nghiệp bền vững (Nohwar & cs., 2019). Cây điền thanh được sử dụng làm nguồn phân xanh trong nông nghiệp vì có khả năng cố định nitơ nhờ vào quan hệ cộng sinh với vi khuẩn *Rhizobium* sống trong các nốt sần trên rễ cây, từ đó cải thiện độ phì nhiêu của đất và giảm phụ thuộc vào phân bón hóa học (Nigussie, 2013). Tại Việt Nam, đã có nhiều nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh từ cây họ Đậu thúc đẩy sinh trưởng thực vật như cây đậu phộng (Bùi Thanh Đạo & cs., 2021). Tuy nhiên, vi khuẩn nội sinh cây điền thanh vẫn chưa được khám phá và nghiên cứu nhiều. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm bổ sung thêm thông tin về vi khuẩn nội sinh trong cây điền thanh.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các mẫu rễ cây điền thanh được thu thập tại Viện Nghiên cứu và Phát triển cây trồng,

Học viện Nông nghiệp Việt Nam (21°00'37.0"N 105°55'56.0"E) theo hướng dẫn của TCVN 8551:2010 (ISO 21528 - 2002). Mẫu được bảo quản ở 4°C cho đến khi sử dụng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập vi khuẩn nội sinh

Các mẫu rễ cây điền thanh sau khi thu thập được rửa dưới vòi nước chảy để loại bỏ hoàn toàn đất bám xung quanh rễ. Rễ được ngâm trong ethanol 75%, 180 giây, rửa lại bằng nước cất vô trùng, tiếp tục khử trùng bằng NaClO 3% trong 150 giây, rửa lại bằng nước cất vô trùng. Sau đó, ngâm mẫu rễ trong ethanol 75% trong 30 giây, rửa lại bằng nước cất vô trùng nhiều lần nhằm loại bỏ vi sinh vật bám trên bề mặt rễ và để khô mẫu rễ trên giấy thấm đã được khử trùng. Kiểm tra độ sạch của bề mặt rễ sau khử trùng bằng cách hút 0,1ml nước rửa bề mặt mẫu rễ lần cuối cùng và cấy trang trên đĩa môi trường thạch Lurien Bertani (LB). Đĩa này được đặt trong tủ nuôi, quan sát sau 48 giờ, nếu không xuất hiện bất kỳ khuẩn lạc nào trên môi trường, chứng tỏ bề mặt mẫu đã được khử trùng sạch. Các đoạn rễ sau khử trùng sạch bề mặt sẽ được dùng để phân lập vi khuẩn nội sinh. Nghiền nhuyễn các mẫu rễ bằng chày và cối vô trùng, bổ sung 1-2ml nước cất vô trùng trộn đều và để yên cho lắng cặn, hút phần dịch trong và cấy trang trên đĩa môi trường LB, ủ 30°C trong 48 giờ (Kumar & cs., 2024). Các khuẩn lạc mọc trên đĩa phân lập được làm thuần và sử dụng ở các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.2. Khảo sát khả năng sinh tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn

Để tiến hành thí nghiệm này, sử dụng que cấy đầu tròn lấy một khuẩn lạc đơn của từng chủng vi khuẩn nội sinh sau khi được làm thuần và cấy chuyển vào trong ống nghiệm chứa 5ml LB lỏng được bổ sung 0,1% L-Tryptophan. Ống nghiệm này được đặt trên máy lắc 200 vòng/phút, tại 30°C trong 48 giờ. Hàm lượng IAA do chủng vi khuẩn tổng hợp được xác định bằng phương pháp so màu với thuốc thử Salkowski và đo độ hấp thụ quang (OD) (TCVN 10784: 2015). Sau 48 giờ nuôi, dịch nuôi từng

chủng vi khuẩn được ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút, 10 phút ở 4°C. Sử dụng pipet hút cẩn thận 1ml phần dịch nổi cho vào các ống nghiệm đã được khử trùng và bổ sung 2ml thuốc thử Salkowski. Đặt các ống nghiệm đã bổ sung thuốc thử trong tối 30 phút. Màu hồng xuất hiện cho biết sự có mặt của IAA trong dung dịch nuôi cấy. Độ hấp thụ màu được đo ở bước sóng $\lambda = 530\text{nm}$. Hàm lượng IAA được xác định theo phương trình $y = 0,0149x + 0,0271$ với y là kết quả đo $OD_{530\text{nm}}$ và x là hàm lượng IAA có trong dịch nuôi cấy chủng vi khuẩn, hệ số tương quan $R^2 = 0,9962$.

2.2.3. Định danh chủng vi khuẩn tuyển chọn

Xác định đặc điểm hình thái, phản ứng sinh hoá của chủng vi khuẩn tuyển chọn

Các đặc điểm của chủng vi khuẩn tuyển chọn được xác định theo hệ thống phân loại của Bergey bao gồm hình thái khuẩn lạc và tế bào; nhuộm Gram, phản ứng catalase, phản ứng methyl red (MR), Vogues-Proskauer (VP) và phản ứng citrate. Các bước nhuộm Gram được thực hiện theo mô tả của Moyes & cs. (2009). Phản ứng catalase được xác định như sau: sinh khối vi khuẩn được đặt lên lam kính hiển vi và nhỏ một giọt hydrogen peroxide 5% lên sinh khối. Hoạt tính sinh catalase được xác nhận dựa trên sự sủi bọt hình thành O_2 (Makowski & cs., 2021).

Nuôi cấy các chủng vi khuẩn trong ống nghiệm chứa môi trường thạch gồm citrate, muối amoni, đệm và bromthymol xanh. Sự chuyển màu từ xanh lá sang xanh dương biểu thị khả năng sử dụng citrate của chủng vi khuẩn (Church, 2016).

Chủng vi khuẩn được nuôi trong 5ml môi trường MR-VP (peptone 10g, glucose 5g). Phản ứng MR được thực hiện bằng cách nhỏ thuốc thử methyl red vào dịch nuôi cấy, nếu màu môi trường chuyển đỏ biểu hiện xảy ra phản ứng, nếu màu vàng - không có phản ứng. Phản ứng VP được xác định bằng cách nhỏ 6 giọt 5% α - naphthol và 2 giọt KOH 40% vào dịch nuôi, phản ứng dương tính xuất hiện màu đỏ, màu vàng biểu thị kết quả âm tính (Church, 2016).

Định danh bằng phương pháp xác định trình tự nucleotide 16S rRNA

DNA của các chủng vi khuẩn nội sinh được tách chiết theo phương pháp được Masoomi-Aladizgeh & cs. (2016) mô tả. Vùng gen mã hoá 16S rRNA của chủng vi khuẩn nội sinh được nhân bản bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3') theo chu trình nhiệt 95°C - 5 phút, 29 chu kỳ (95°C - 30 giây, 53°C - 30 giây, 72°C - 1 phút), 72°C trong 10 phút, giữ mẫu ở 12°C. Sản phẩm PCR được giải trình tự tại Công ty 1st BASE (Singapore). So sánh mức độ tương đồng về trình tự gen mã hoá 16S rRNA trên cơ sở dữ liệu GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) bằng công cụ BLAST. Cây phát sinh loài của chủng vi khuẩn được xây dựng bằng phần mềm MEGA11 với độ tin cậy được tính bằng thuật toán Neighbour-joining với bootstrap 1.000 lần lặp lại. Dựa vào cây phát sinh loài, mức độ tương đồng trên cơ sở dữ liệu của GenBank và giá trị bootstrap để xác định mối quan hệ di truyền của chủng vi khuẩn tuyển chọn.

2.2.4. Khảo sát một số đặc tính kích thích sinh trưởng thực vật của chủng vi khuẩn được tuyển chọn

Đánh giá khả năng phân giải phosphate

Các chủng vi khuẩn được cấy chấm điểm trên môi trường thạch NBRIP và ủ ở 30°C, trong 3-5 ngày. Nếu chủng vi khuẩn có khả năng phân giải phosphate khó tan, sẽ tạo vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc. Hàm lượng phosphate được định lượng bằng cách nuôi các chủng vi khuẩn trong môi trường NBRIP lỏng ở 30°C trong 72 giờ, lắc 200 vòng/phút. Ly tâm dịch nuôi cấy các chủng vi khuẩn với tốc độ 10.000 vòng/phút, 10 phút ở 4°C, thu dịch nổi để xác định hàm lượng PO_4^{3-} bằng thuốc thử Xanh - Molybdate và đo độ hấp phụ quang ở bước sóng 820nm (Ames & cs., 1966). Nồng độ PO_4^{3-} được xác định thông qua phương trình $y = 0,1922x - 0,0241$ với y là kết quả đo OD_{820} và x là nồng độ PO_4^{3-} , hệ số $R^2 = 0,9977$.

Đánh giá khả năng sinh tổng hợp siderophore

Các chủng vi sinh vật được cấy chấm điểm trên môi trường thạch CAS (Chrome azurol S).

Khảo sát đặc tính kích thích sinh trưởng thực vật của chủng vi khuẩn nội sinh *Enterobacter* sp. RC20 phân lập từ rễ cây điền thanh (*Sesbania sesban* L.)

Nếu môi trường thạch xung quanh khuẩn lạc xuất hiện vòng sáng màu vàng cam chứng tỏ chủng vi sinh vật đã tổng hợp siderophore (Schwyn & Neilands, 1987). Khả năng sinh tổng hợp siderophore được đánh giá bằng công thức: $ĐK (mm) = D - d$, với D: đường kính vòng màu vàng và d: đường kính lỗ thạch.

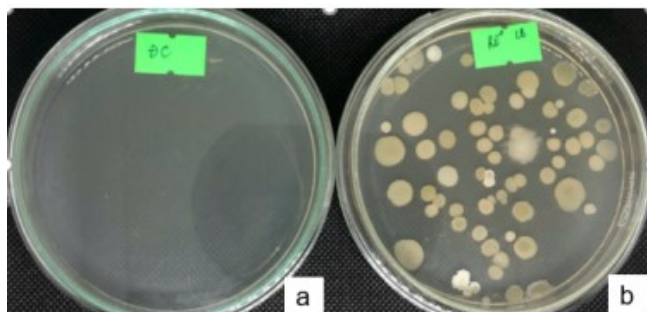
Đánh giá khả năng phân giải kali khó tan

Các chủng vi khuẩn được cấy trên môi trường thạch Aleksandrow chứa $KAlSi_3O_8$ khó tan và nuôi ở 30°C trong 5 ngày. Các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải kali khó tan sẽ tạo vòng sáng xung quanh khuẩn lạc (Setiawati & Mutmainnah, 2016). Khả năng phân giải kali được đánh giá bằng công thức: $ĐK = D - d$ (mm). Trong đó: D: đường kính vòng phân giải và d: đường kính lỗ thạch.

2.2.5. Đánh giá khả năng kích thích sinh trưởng của chủng vi khuẩn RC20 trên cây con ốt chuông

Khả năng kích thích sinh trưởng thực vật của một số chủng vi khuẩn tiềm năng được đánh giá bằng thử nghiệm *in vivo* trên cây ốt theo mô tả của Wang & cs. (2024). Hạt giống ốt chuông giống CALI-01 được khử trùng bề mặt bằng NaOCl 1% trong 3 phút, sau đó rửa 3 lần với nước cất. Hạt ốt được chuyển lên giấy ẩm và được ủ 30°C trong điều kiện tối từ 2 đến 4 ngày và chuyển ra bầu đất khi rễ và mầm xuất hiện. Chuẩn bị giá thể trồng cây: Trộn đất với xơ dừa theo tỉ lệ 2:1 và hấp khử trùng trong 15 phút ở nhiệt độ 121°C. Mỗi cây con được trồng vào một bầu có kích thước 10 × 10cm (200g giá thể/bầu)

và để cây phát triển trong điều kiện ánh sáng tự nhiên. Mỗi công thức gồm 20 cây. Một khuẩn lạc đơn của chủng vi khuẩn được nuôi trong 30ml môi trường LB lỏng ở 30°C, lắc 200 vòng/phút trong 12 giờ. Chuyển 1ml dịch huyền phù vào 100ml môi trường LB và ủ ở 30°C, lắc 200 vòng/phút trong 24 giờ. Sau đó, dịch nuôi được ly tâm 5.000 vòng/phút trong 10 phút ở 10°C, loại bỏ dịch nổi và thu sinh khối tế bào. Để loại bỏ các hợp chất ngoại bào còn sót lại trên tế bào, sinh khối tế bào được tái huyền phù trong nước cất, ly tâm 5.000 vòng/phút trong 10 phút ở 10°C, loại bỏ dịch nổi, thu sinh khối tế bào. Sinh khối tế bào được hòa trong nước cất để đạt giá trị $OD_{600} = 0,6$, tương đương 10^7 CFU/ml. Mỗi bầu cây trong các công thức thí nghiệm được bổ sung 2ml dịch huyền phù tế bào vi khuẩn, với tần suất 1 lần/tuần. Cây ốt ở công thức đối chứng không được bổ sung sinh khối tế bào chủng vi khuẩn. Vi khuẩn được bổ sung lần đầu tiên khi cây ốt bắt đầu có lá thật (sau bảy ngày kể từ khi hạt nảy mầm). Cây ở bầu đối chứng được tưới nước cất khử trùng. Sau 7 ngày tính từ khi tưới bổ sung vi khuẩn lần thứ hai (khi cây con đạt 21 ngày tuổi) thu 20 cây ốt của mỗi công thức thí nghiệm để xác định các chỉ tiêu: Chiều cao cây trung bình (cm): khoảng cách từ gốc cây đến đỉnh; chiều dài rễ trung bình (cm): khoảng cách từ gốc cây đến đỉnh của rễ sử dụng phần mềm ImageJ; khối lượng tươi trung bình (g) được cân ngay sau khi thu hoạch bao gồm trọng lượng của cây và rễ cây; khối lượng khô trung bình (mg) được xác định bằng cách sấy các mẫu cây trong tủ sấy ở 50°C đến khi khối lượng không đổi.



Ghi chú: a: Đĩa đối chứng được cấy trang bằng nước khử trùng bề mặt mẫu rễ cây điền thanh lần cuối cùng; b: Đĩa cấy bằng dịch nghiền từ rễ cây điền thanh sau khử trùng.

Hình 1. Kết quả phân lập vi khuẩn nội sinh từ rễ cây điền thanh

2.2.6. Xử lý số liệu

Dữ liệu sau khi thu thập và tổng hợp được tiến hành xử lý bằng thuật toán One-way ANOVA với mức độ tin cậy $P < 0,05$, sử dụng phần mềm GraphPad Prism phiên bản 10.3.0 (Dotmatics).

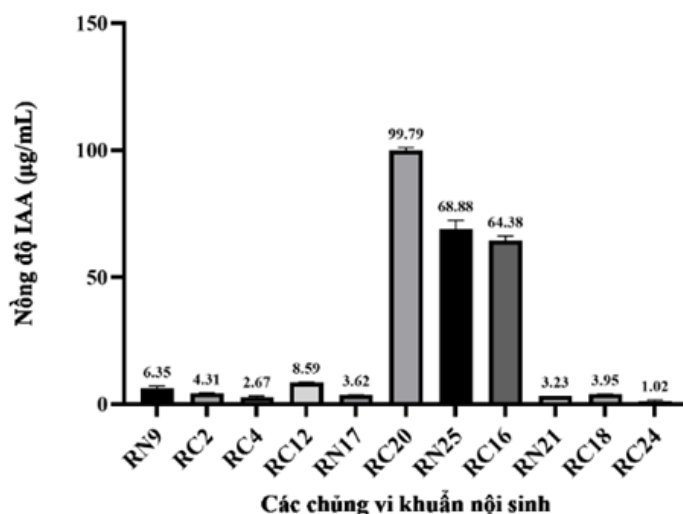
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn nội sinh từ rễ cây điền thanh

Từ rễ cây điền thanh, các chủng vi khuẩn nội sinh đã được phân lập và làm thuần dựa trên đặc điểm khác nhau của hình thái khuẩn lạc. Không có khuẩn lạc vi khuẩn nào xuất hiện trên các đĩa thạch đối chứng (Hình 1).

Các chủng vi khuẩn sau khi được làm thuần được khảo sát khả năng tổng hợp IAA vì IAA giúp tăng chiều cao cây và thúc đẩy sự phân chia của tế bào và kích thích hình thành rễ nhánh (Fu & cs., 2015). Trong số các chủng

được khảo sát, đánh giá, chủng vi khuẩn RC20 tổng hợp IAA nhiều nhất (99,79 $\mu\text{g/ml}$), chủng RN25 và RC16 lần lượt tổng hợp được 68,88 và 64,38 $\mu\text{g/ml}$, các chủng còn lại tổng hợp được từ 1,02 đến 8,5 $\mu\text{g/ml}$. Trong nghiên cứu của Majeed & cs. (2015), chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas rhizophila* AJK-3 và AJK-9 tổng hợp IAA đạt lần lượt 72,32 $\mu\text{g/ml}$ và 77,98 $\mu\text{g/ml}$, có hiệu quả kích thích sinh trưởng lúa mì. So sánh với nghiên cứu này, hàm lượng IAA được tổng hợp bởi chủng RC20 tương đối cao. Do đó, chủng RC20 được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo nhằm đánh giá hiệu quả kích thích sinh trưởng của cây. Kết luận của Patel & cs. (2017) cho thấy các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp IAA làm tăng đáng kể các chỉ tiêu sinh học của các cây ớt so với nhóm đối chứng đã củng cố thêm khả năng sử dụng hàm lượng IAA làm tiêu chí sàng lọc chủng vi khuẩn tiềm năng kích thích sinh trưởng của thực vật.

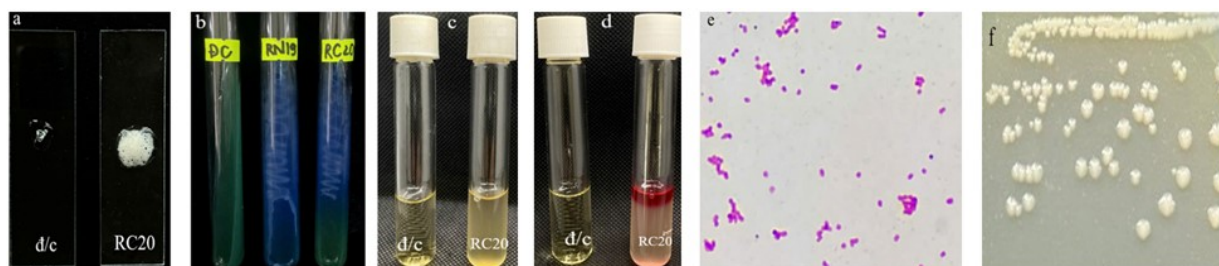


Hình 2. Nồng độ IAA được tổng hợp bởi các chủng vi khuẩn nội sinh phân lập từ rễ cây điền thanh

Bảng 1. Các chủng vi khuẩn có tỷ lệ tương đồng cao với chủng RC20 khi so sánh trình tự vùng 16S rRNA

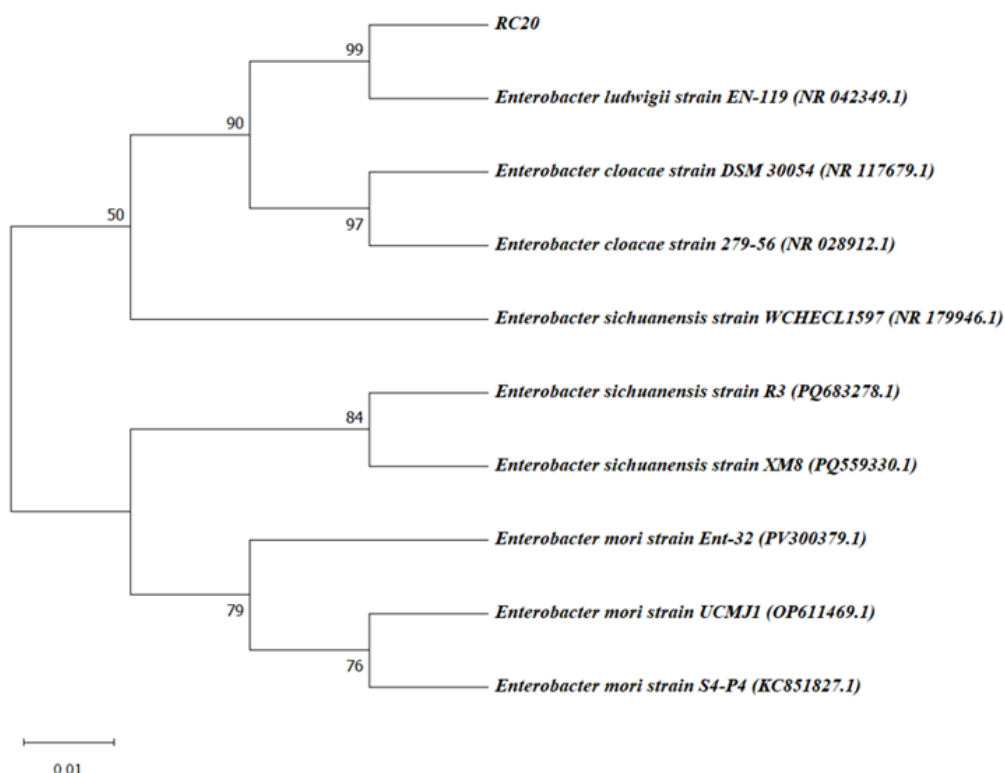
Chủng vi khuẩn	Mã trình tự	Độ bao phủ (%)	Độ tương đồng (%)
<i>Enterobacter ludwigii</i> strain EN-119	NR_042349.1	95	97,38
<i>Enterobacter wuhouensis</i> strain WCHes120002	NR_180450.1	96	97,06
<i>Enterobacter chuandaensis</i> strain 090028	NR_180237.1	96	97,06
<i>Enterobacter mori</i> strain YIM Hb-3	NR_16667.2	96	96,98

Khảo sát đặc tính kích thích sinh trưởng thực vật của chủng vi khuẩn nội sinh *Enterobacter* sp. RC20 phân lập từ rễ cây điền thanh (*Sesbania sesban* L.)



Ghi chú: a: Phản ứng catalase; b: Khả năng sử dụng citrate; c: Phản ứng âm tính với Methyl- Red; d: Phản ứng dương tính với Vogues-Proskauer; e: Hình ảnh nhuộm Gram và f: Hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn RC20.

Hình 3. Đặc điểm sinh hoá và hình thái của chủng vi khuẩn RC20



Ghi chú: Các giá trị bootstrap (1.000 lần lặp lại) được chỉ ra bên cạnh các nhánh. Phân tích tiến hóa được thực hiện trong phần mềm MEGA11.

Hình 4. Phân tích phát sinh loài của chủng vi khuẩn RC20 dựa trên vùng 16S rRNA bằng phương pháp neighbor-joining với mô hình bootstrap

3.2. Định danh phân tử chủng vi khuẩn RC20

Sản phẩm nhân bản đoạn gene mã hóa 16S rRNA của chủng RC20 được gửi tới Công ty 1st BASE (Singapore) để giải trình tự nucleotide. Trình tự nucleotide 16S rRNA của chủng RC20 được so sánh với trình tự nucleotide 16S rRNA của các chủng vi khuẩn khác trên ngân hàng GenBank (Bảng 1). Tế bào của chủng RC20 có

dạng que ngắn, Gram âm, dương tính với catalase và VP, âm tính với MR và có khả năng sử dụng citrate (Hình 3). Khuẩn lạc có màu trắng đục; bề mặt mịn, tròn, bóng. Những đặc điểm này tương đồng với đặc điểm của các chủng vi khuẩn chi *Enterobacter*. Dựa trên các đặc điểm hóa sinh và kết quả so sánh trình tự nucleotide 16S rRNA của chủng vi khuẩn RC20 với các chủng vi khuẩn khác trên GenBank, có thể kết luận chủng vi

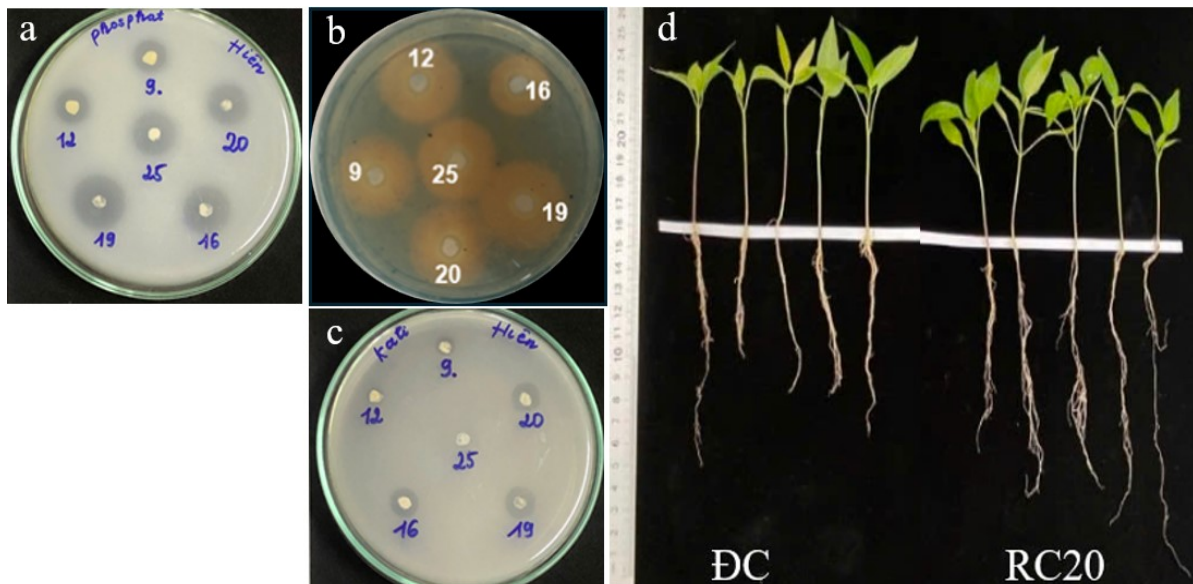
khuẩn RC20 thuộc chi *Enterobacter* và được đặt tên là *Enterobacter* sp. RC20.

Các chủng vi khuẩn thuộc chi *Enterobacter* spp. được phân lập từ cây ngô, *Enterobacter sakazakii* và *Enterobacter agglomerans* từ cây đậu tương, *Enterobacter cloacae* từ cây có mùi, *Enterobacter asburiae* từ cây khoai lang kích thích tăng trưởng thực vật thông qua tổng hợp IAA, hoà tan phosphate (Khalifa & cs., 2016). Trong nghiên cứu này, khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng vi khuẩn *Enterobacter* sp. RC20 cũng đã được chứng minh.

3.3. Đánh giá một số đặc điểm sinh hoá liên quan đến khả năng kích thích sinh trưởng cây trồng của chủng *Enterobacter* sp. RC20

Các vi khuẩn kích thích sinh trưởng thực vật trực tiếp và gián tiếp thúc đẩy sự phát triển và bảo vệ thực vật chống lại các tác nhân gây bệnh. Các cơ chế trực tiếp bao gồm sinh tổng hợp phytohormone, hòa tan phosphate, kali và kẽm (Fanai & cs., 2024). Nhằm đánh giá một số đặc điểm sinh hoá liên quan đến khả năng kích thích sinh trưởng của chủng *Enterobacter* sp. RC20, khả năng phân giải phosphate, kali và tổng hợp siderophore của chủng này được khảo

sát. Trên môi trường thạch NBRIP, xung quanh khuẩn lạc của chủng *Enterobacter* sp. RC20 xuất hiện vòng sáng trong suốt (Hình 5a) chứng tỏ chủng này có khả năng chuyển hóa các hợp chất phosphate khó tan thành dạng tan, dễ hấp thụ đối với cây trồng. Hàm lượng PO_4^{3-} được chủng *Enterobacter* sp. RC20 giải phóng sau khi nuôi cấy trong môi trường NBRIP lỏng đạt 8,26 mg/l. Các chủng vi sinh vật sử dụng các cơ chế khác nhau để hòa tan các hợp chất phosphate, như giảm pH do tổng hợp các axit hữu cơ khối lượng phân tử thấp làm chua hoá môi trường xung quanh, giải phóng các proton và khoáng hoá bằng cách tổng hợp phosphatase axit (Dwivedi, 2020), do đó hàm lượng PO_4^{3-} được giải phóng vào môi trường cũng khác nhau. Các axit hữu cơ có thể chelat hoá các cation, gắn với phosphate bằng các nhóm hydroxyl và carboxyl (Phạm Hồng Hiền & cs., 2021). Nguyễn Văn Giang & cs. (2021) báo cáo rằng các chủng vi khuẩn nội sinh ở rễ cây sù có khả năng giải phóng từ 4,6 đến 9,29 mg/l PO_4^{3-} từ các hợp chất phosphate khó tan. Trong nghiên cứu của Kumar & cs. (2024), các chủng vi khuẩn nội sinh phân lập từ *Sesbania sesban* L. có thể giải phóng vào môi trường nuôi vi khuẩn từ 11,9-19,3 mg/l PO_4^{3-} .



Ghi chú: (a): Khả năng phân giải phosphate khó tan; (b): Khả năng sinh tổng hợp siderophore; (c): Khả năng phân giải kali khó tan; (d): Khả năng kích thích sinh trưởng cây ớt. Chủng *Enterobacter* sp. RC20 trong ảnh (a), (b) và (c) được mã hóa bằng số 20.

Hình 5. Khả năng kích thích sinh trưởng thực vật của chủng *Enterobacter* sp. RC20

Khảo sát đặc tính kích thích sinh trưởng thực vật của chủng vi khuẩn nội sinh *Enterobacter* sp. RC20 phân lập từ rễ cây điền thanh (*Sesbania sesban* L.)

Đường kính vòng sáng màu vàng quanh khuẩn lạc chủng *Enterobacter* sp. RC20 trên môi trường thạch CAS đạt $21 \pm 0,4\text{mm}$ (Hình 5b) chứng tỏ chủng này tổng hợp siderophore mạnh. Cây trồng và vi sinh vật hữu ích có ái lực với sắt mạnh hơn các vi sinh vật gây bệnh nên đã giảm khả năng sinh trưởng của mầm bệnh và thúc đẩy sự sinh trưởng, phát triển của cây chủ (Phạm Hồng Hiển & cs., 2021). Chủng *Enterobacter* sp. RC20 khi nuôi trên môi trường thạch Aleksandrov chứa KAlSi_3O_8 , đã tạo vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc với đường kính là $5 \pm 0,4\text{mm}$ (Hình 5c).

3.4. Đánh giá khả năng kích thích sinh trưởng thực vật của chủng vi khuẩn nội sinh RC20 trên cây con ớt chuông

Sau 21 ngày được trồng trong bầu và bổ sung chủng vi khuẩn *Enterobacter* sp. RC20, cây ớt con được thu thập và đánh giá các chỉ tiêu như đã mô tả tại mục 2.2.5. Kết quả (Hình 5d và Bảng 2) cho thấy sự khác biệt giữa các chỉ tiêu này ở cây đối chứng và các cây bổ sung vi khuẩn ($P < 0,05$).

Chiều cao, chiều dài rễ cây ớt khi được bổ sung chủng *Enterobacter* sp. RC20 tăng tương ứng 27,63% và 46,32% so với chiều cao và chiều dài rễ cây ớt ở nhóm đối chứng. Trọng lượng tươi và khô của cây ớt được tưới dịch huyền phù vi khuẩn tăng lần lượt là 24,13% và 39,32% so với cây đối chứng (Bảng 2). Wang & cs. (2024) báo cáo chủng vi khuẩn R3 đã làm tăng chiều cao, số lá và trọng lượng tươi của cây ớt lần lượt 22,12%, 46,44% và 56,29% so với cây đối chứng. Trong nghiên cứu của Wei & cs. (2022) chiều dài thân và trọng lượng tươi của cỏ Bermudagrass

được bổ sung *Enterobacter ludwigii* B30 lần lượt tăng 19,47% và 84,84% so với cỏ không được bổ sung chủng vi khuẩn này. Chủng *Enterobacter* sp. RC20 kích thích tăng trưởng cây ớt thí nghiệm có thể do chủng này đã cung cấp IAA cho cây. Các kết quả thí nghiệm này đã củng cố thêm vai trò kích thích sinh trưởng thực vật của các chủng vi khuẩn thuộc chi *Enterobacter*.

Kết quả thí nghiệm cũng chỉ rõ chủng *Enterobacter* sp. RC20 có khả năng hoà tan phosphate và kali khó tan. Khám phá này phù hợp với nghiên cứu của Lee & cs. (2019) về chủng vi *Enterobacter ludwigii* GAK2. Chủng này có khả năng hòa tan silic và phosphate cao và đã thúc đẩy sự nảy mầm của hạt lúa, tăng chiều dài rễ, chiều dài thân, sinh khối tươi và hàm lượng diệp lục của cây lúa.

Sắt liên quan đến sự tổng hợp chlorophyll và cần thiết trong việc duy trì cấu trúc và chức năng của chloroplast của thực vật (Rout & Sahoo, 2015). Siderophore là hợp chất do vi khuẩn tiết ra để thu nhận sắt (Fe^{2+}) từ môi trường khi chúng sinh trưởng trong điều kiện thiếu sắt, qua đó hỗ trợ cây trồng bổ sung sắt. Khả năng tổng hợp siderophore của chủng cũng RC20 đã được chứng minh (Hình 5b). Khả năng này ở những chủng vi khuẩn thuộc chi *Enterobacter* cũng đã được báo cáo. Ning & cs. (2024) cho biết chủng *Enterobacter asburiae* D2 đã làm tăng chiều dài rễ và khối lượng khô của cây lúa và kích thích sinh trưởng của cây thông qua hoà tan phosphate, tổng hợp IAA và siderophore. Những đặc điểm được khảo sát của chủng *Enterobacter* sp. RC20 phần nào đã giải thích cơ chế giúp những cây ớt trong thí nghiệm tăng trưởng.

Bảng 2. Hiệu quả kích thích sinh trưởng cây ớt của chủng vi khuẩn *Enterobacter* sp. RC20

Công thức	Chiều cao trung bình của thân ($\text{cm} \pm \text{SE}$)	Chiều dài trung bình của rễ ($\text{cm} \pm \text{SE}$)	Khối lượng tươi trung bình của cây ($\text{g} \pm \text{SE}$)	Khối lượng khô trung bình của cây ($\text{mg} \pm \text{SE}$)
Đối chứng	$4,56^b \pm 0,84$	$8,16^b \pm 1,46$	$0,29^b \pm 0,049$	$20,55^b \pm 5,20$
Chủng vi khuẩn RC20	$5,82^a \pm 0,64$	$11,94^a \pm 1,97$	$0,36^a \pm 0,053$	$28,63^a \pm 5,68$
Hiệu quả kích thích sinh trưởng (%)	27,63	48,16	24,13	39,32

Ghi chú: Giá trị sau dấu $\pm$ đại diện cho độ lệch chuẩn (SE) giữa các cây trong mỗi nhóm công thức; các chữ cái khác nhau của mỗi cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa tại $P < 0,005$.

Như vậy, chủng vi khuẩn *Enterobacter* sp. RC20 có tiềm năng ứng dụng để sản xuất chế phẩm sinh học kích thích tăng trưởng cây trồng, tuy nhiên cần có thêm một số đánh giá khác về mức độ an toàn của chủng này.

4. KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn RC20 được tuyển chọn từ các chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ rễ cây điền thanh (*Sesbania sesban* L.) biểu hiện hoạt tính sinh tổng hợp IAA cao. Trên cơ sở so sánh và phân tích trình tự nucleotide 16S rRNA của chủng vi khuẩn này, kết hợp với đặc điểm hình thái, sinh hoá có thể kết luận chủng vi khuẩn này thuộc chi *Enterobacter* và được đặt tên là *Enterobacter* sp. RC20. Các đặc tính kích thích tăng trưởng thực vật của chủng RC20 đã được chứng minh.

Chủng *Enterobacter* sp. RC20 đã làm tăng 27,63% chiều cao, 48,16% chiều dài rễ, 24,13% trọng lượng tươi và 39,32% trọng lượng khô của các cây ớt thí nghiệm so với các cây ớt đối chứng. Chủng *Enterobacter* sp. RC20 là nguồn vật liệu tiềm năng trong sản xuất chế phẩm sinh học kích thích tăng trưởng cây trồng trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ahmed M., Hussain M., Dhar M.K. & Kaul S. (2012). Isolation of microbial endophytes from some ethnomedicinal plants of Jammu and Kashmir. *J Nat Prod Plant Resource*. 2(2): 215-220.

Ames B.N. (1966). Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. In Book: *Methods in enzymology* © Elsevier. pp.115-118.

Bùi Thanh Đạo, Ngô Thanh Phong & Cao Ngọc Diệp (2021). Phân lập và nhận diện vi khuẩn nội sinh có khả năng cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA trong cây đậu phộng (lạc) (*Arachis hypogaea* L.) trồng tại 03 huyện miền núi tỉnh Bình Định. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*. 57(6): 125-131.

Bộ Khoa học và Công nghệ (2015). TCVN 10784:2015. Vi sinh vật - xác định khả năng sinh tổng hợp axit 3-indole-axetic (IAA).

Bộ Khoa học và Công nghệ (2010). TCVN 8551:2010. Phương pháp lấy mẫu, chuẩn bị mẫu cây trồng.

Burragoni S.G. & Jeon J. (2021). Applications of endophytic microbes in agriculture, biotechnology, medicine, and beyond. *Microbiological research*. 245: 126691.

Church D.L. (2016). Biochemical Tests for the Identification of Aerobic Bacteria, Section 3. Aerobic Bacteriology, in the book: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, Editor: Amy L. Leber. Vol. 1-3, 4th Edition

Dwivedi M. (2020). *Gluconobacter*. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*. Elsevier. pp. 521-544. doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00025-3

Eid A.M., Salim S.S., Hassan S.E.-D., Ismail M.A. & Fouda A. (2019). Role of Endophytes in Plant Health and Abiotic Stress Management. In *Microbiome in Plant Health and Disease*. Springer Singapore. pp. 1190144.

Fanai A., Bohia B., Lalremruati F., Lalhriatpui N., Lalrokimi Lalmuanpui R., Singh P.K. & Zothanpuia (2024). Plant growth promoting bacteria (PGPB)-induced plant adaptations to stresses: an updated review. *Peer J*. 12: e17882.

Fu S.-F., Wei J.-Y., Chen H.-W., Liu Y.-Y., Lu H.-Y. & Chou J.-Y. (2015). Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. *Plant Signaling & Behavior*. 10(8): e1048052.

Khalifa A.Y., Alsyeed A.M., Almalki M.A. & Saleh F.A. (2016). Characterization of the plant growth promoting bacterium, *Enterobacter cloacae* MSR1, isolated from roots of non-nodulating *Medicago sativa*. *Saudi J Biol Sci*. 23(1): 79-86.

Kumar P., Vashistha H. & Kumar S. (2024). PGPR attributes and molecular identification of non-rhizobial Endophytes for growth enhancement of *Sesbania sesban* (L.) Merr. *J. Indian bot. Soc*. 104(3): 123-135.

Lee K.-E., Adhikari A., Kang S.-M., You Y.-H., Joo G.-J., Kim J.-H., Kim S.-J. & Lee I.-J. (2019). Isolation and characterization of the high silicate and phosphate solubilizing novel strain *Enterobacter ludwigii* GAK2 that promotes growth in rice plants. *Agronomy*. 9(3): 144

Makowski K., Leszczewicz M., Broncel N., Lipińska-Zubrycka L., Głębski A., Komorowski P. & Walkowiak B. (2021). Isolation, Biochemical Characterisation and Identification of Thermotolerant and Cellulolytic *Paenibacillus lactis* and *Bacillus licheniformis*. *Food Technology and Biotechnology*. 59(3): 325-336.

Majeed A., Abbasi M.K., Hameed S., Imran A. & Rahim N. (2015). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Frontiers in Microbiology*. 6.

Masoomi-Aladizgeh F., Jabbari L., Khayam Nekouei R. & Aalami A. (2016). A simple and rapid system for ADN and RNA isolation from diverse plants using handmade kit. *Protocol Exchange*.

Khảo sát đặc tính kích thích sinh trưởng thực vật của chủng vi khuẩn nội sinh *Enterobacter* sp. RC20 phân lập từ rễ cây điền thanh (*Sesbania sesban* L.)

- Moyes R.B. Reynolds J. & Breakwell D.P. (2009). Differential Staining of Bacteria: Gram Stain. Current Protocols in Microbiology. 15(1).
- Mushtaq S., Shafiq M., Tariq M.R., Sami A., Nawaz-Ul-Rehman M.S., Bhatti M.H.T., Haider M.S., Sadiq S., Abbas M.T. & Hussain M. (2023). Interaction between bacterial endophytes and host plants. Frontiers in plant science. 13: 1092105.
- Nguyễn Văn Giang, Vũ Thị Tươi, Vũ Thị Linh & Phạm Hồng Hiền (2021). Ảnh hưởng của môi trường và điều kiện nuôi cấy đến khả năng tổng hợp IAA của một số chủng vi khuẩn nội sinh phân lập từ rễ cây sù (*Aegiceras corniculatum*). Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam. 06(127).
- Nigussie Z. (2013). *Sesbania sesban* (L.) Merrill: Potential uses of an underutilized multipurpose tree in Ethiopia. African Journal of Plant Science. 7(10): 468-475.
- Ning Z., Lin K., Gao M., Han X., Guan Q., Ji X., Yu S. & Lu L. (2024). Mitigation of Salt Stress in Rice by the Halotolerant Plant Growth-Promoting Bacterium *Enterobacter asburiae* D2. Journal of Xenobiotics. 14(1): 333-349.
- Nohwar N., Khandare R. & Desai N. (2019). Isolation and characterization of salinity tolerant nitrogen fixing bacteria from *Sesbania sesban* (L) root nodules. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 21: 101325.
- Patel S., Jinal H.N. & Amareesan N. (2017). Isolation and characterization of drought resistance bacteria for plant growth promoting properties and their effect on chilli (*Capsicum annuum*) seedling under salt stress. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 12: 85-89.
- Phạm Hồng Hiền, Trần Thị Đào, Tạ Hà Trang, Hoàng Thị Liễu & Nguyễn Văn Giang (2022). Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng tổng hợp IAA của chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 20(12): 1640-1648.
- Rout G.R. & Sahoo S. (2015). Role of Iron in Plant Growth and Metabolism. Review in Agricultural Science. 3: 1-24. <https://doi.org/10.7831/ras.3.1>
- Schwyn B. & Neilands J. (1987). Siderophores from agronomically important species of the Rhizobiaceae. Acta Biochim Pol. 41(1): 7-11.
- Setiawati T.C. & Mutmainnah L. (2016). Solubilization of potassium containing mineral by microorganisms from sugarcane rhizosphere. Agriculture and Agricultural Science Procedia. 9: 108-117.
- Wang B., Tan S., Wu M., Feng Y., Yan W., Yun Q., Ji X., Lin R. & Zhao Z. (2024). Effects of two *Bacillus velezensis* strains isolated from different sources on the growth of *Capsicum annuum*. Frontiers in Microbiology. 15: 1504660.
- Wei H., He W., Li Z., Ge L., Zhang J. & Liu T. (2022). Salt-tolerant endophytic bacterium *Enterobacter ludwigii* B30 enhance bermudagrass growth under salt stress by modulating plant physiology and changing rhizosphere and root bacterial community. Frontiers in plant science. 13: 959427.