

Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn nội sinh có khả năng cố định đạm từ cây Diếp cá (*Houttuynia cordata* Thunb)

Trần Ngọc Chi^{1,2,*}, Phan Thị Hồng Ngọc¹

¹Khoa Nông nghiệp và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Tiền Giang

²Chi Hội nữ Trí thức Đồng bằng Sông Cửu Long

*tranngocchi@tgu.edu.vn

Tóm tắt

Cây Diếp cá, ngoài công dụng là một loại rau, còn là một trong những cây dược liệu từ lâu đã được Đông y dùng chữa các bệnh về tiêu hóa, phát ban, tắc sữa. Mục tiêu của nghiên cứu là phân lập và định danh được một dòng vi khuẩn nội sinh ở cây Diếp cá có khả năng cố định đạm cao. Mười một dòng (chủng) vi khuẩn được phân lập từ vùng rễ của cây Diếp cá thu từ huyện Châu Thành, tỉnh Tiền Giang trên môi trường Nutrient agar (NA) được khẳng định là vi khuẩn nội sinh nhờ việc kiểm tra với cặp mồi đặc hiệu nhận diện vi khuẩn nội sinh. Trong 11 dòng phân lập chỉ có 6 dòng có khả năng cố định đạm. Trong đó, dòng R03 tốt nhất với lượng đạm tổng hợp được là 10,67 mg/L, có tiềm năng cao trong việc ứng dụng để sản xuất phân đạm sinh học. Dòng vi khuẩn R03 được xác định có tỉ lệ tương đồng với *Bacillus flexus* MP-9 là 99,93 %. Cây Diếp cá được phun dịch vi khuẩn gốc cho năng suất cao nhất, thể hiện ở khối lượng tươi thu được, cho thấy ảnh hưởng tích cực đến sự sinh trưởng của cây.

Nhận 04/09/2024

Được duyệt 14/12/2024

Công bố 28/02/2025

Từ khóa

Bacillus flexus,

cây Diếp cá,

cố định đạm,

vi khuẩn nội sinh

© 2025 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Vi khuẩn nội sinh sống trong mô thực vật được tìm thấy ở vùng rễ, thân, lá, quả của thực vật. Vùng rễ là nơi xuất hiện nhiều vi khuẩn nội sinh xâm nhập vào bên thân cây thông qua rễ từ đó lên thân, lá để sống cộng sinh với cây trồng. Sau khi xâm nhập vào cây chủ, vi khuẩn có thể tập trung tại vị trí xâm nhập hoặc di chuyển đi khắp nơi trong cây đến các hệ mạch của rễ, thân, lá,

hoa, thúc đẩy các quá trình chuyển hóa trong cây, gây sự phát triển lông rễ một cách mạnh mẽ và giảm sự kéo dài rễ [1]. Các nhà nghiên cứu quan tâm nhiều đến những loài vi khuẩn nội sinh có đặc tính tốt như vi khuẩn có khả năng cố định nitơ trong không khí, tổng hợp kích thích tố auxin, tăng hàm lượng các chất khoáng, tăng khả năng kháng bệnh, hòa tan lân khó tan giúp cho cây trồng có thể hấp thụ tốt chất dinh dưỡng



[2]. Đã có nhiều nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh trong các loài cây ở Việt Nam. Với nghiên cứu phân lập vi khuẩn nội sinh trong cây lúa mùa đã phát hiện nhiều chủng vi khuẩn nội sinh bên trong cây lúa mùa với nhiều đặc tính tốt và có thể ứng dụng cho cây trồng [3]. Phân lập vi khuẩn nội sinh trong cây khóm cho thấy tiềm năng trong nghiên cứu và ứng dụng của vi khuẩn nội sinh hiện nay [4].

Ở Việt Nam, Diếp cá (*Houttuynia cordata* Thunb.) là một loại rau. Cây có dược tính quý giúp cho việc điều trị các bệnh do vi khuẩn gây cho người và động vật. Nhiều nghiên cứu cho thấy các cây trồng không thuộc họ đậu cũng có các nhóm vi sinh vật có ích sống trong cây hoặc ở vùng rễ cây đã kích thích cây trồng phát triển tốt nhờ khả năng cố định đạm, phân giải lân, tổng hợp hormone tăng trưởng và các hợp chất có khả năng trực tiếp ức chế một số bệnh cho cây trồng, hoặc kích thích cây trồng sản xuất các hợp chất biến dưỡng thứ cấp giúp cây chống lại các tác nhân gây bệnh. Việc phân lập được vi khuẩn nội sinh có khả năng cố định đạm có thể hỗ trợ làm giảm việc sử dụng phân đạm hóa học trong trồng trọt, giảm sự thay đổi tính chất lý hóa của đất, giảm mất cân bằng sinh thái, giảm kinh phí và thân thiện với môi trường.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu

Mẫu cây Diếp cá (DC) thu tại huyện Châu Thành, tỉnh Tiền Giang. Phần rễ được sử dụng để phân lập vi khuẩn.

2.2 Phương pháp thu mẫu

Thu toàn bộ cây, rửa sạch đất bám ở rễ; sau đó cắt rời rễ cây ra và tiến hành khử trùng mẫu rễ theo tài liệu tham khảo [5]. Để loại trừ các vi sinh vật có khả năng còn bám ở bề mặt, mẫu sau khi thu thập được xử lý như sau: rửa sạch phần rễ dưới vòi nước mạnh, tiếp tục rửa

lại bằng nước cất vô trùng rồi cắt rễ thành những đoạn nhỏ (1-2) cm, làm khô mẫu bằng giấy hút ẩm. Tiếp theo, mẫu được lần lượt khử trùng mẫu bằng cồn 96 % trong 3 phút, hypochloride 1 % trong 3 phút, hydrogen peroxide 3 % (H_2O_2) trong 3 phút và rửa lại với nước cất vô trùng 4 lần để loại các hóa chất còn thừa.

2.3 Phân lập vi khuẩn nội sinh từ rễ của cây DC

Các mẫu rễ đã khử trùng được cho vào các ống nghiệm chứa 10 mL nước cất vô trùng, dùng thìa thủy tinh đã khử trùng nghiền mịn mẫu. Lấy 200 μ L dịch nghiền của rễ cho vào các ống nghiệm chứa 10 mL môi trường nutrient agar (NA) bán đặc, ủ ở 30 °C trong 48 giờ. Các ống nghiệm chứa môi trường NA bán đặc có xuất hiện một lớp màng mỏng cách mặt môi trường nuôi khoảng 0,5 cm chỉ thị có sự hiện diện của vi khuẩn nội sinh [6].

Vi khuẩn từ lớp màng mỏng của môi trường NA bán đặc được cấy chuyển sang các đĩa môi trường NA đặc để tách dòng các khuẩn lạc. Sau vài lần cấy chuyển trên các môi trường đặc, chọn các khuẩn lạc rời và nằm trên đường cấy quan sát dưới kính hiển vi và bảo quản bằng glycerol ở 4 °C.

2.4 Quan sát hình dạng, khả năng chuyển động và tế bào của vi khuẩn

Sau khi phân lập tiến hành quan sát hình thái khuẩn lạc, tế bào vi khuẩn và nhuộm gram. Quan sát và mô tả hình thái khuẩn lạc vi khuẩn gồm hình dạng, màu sắc, độ nổi khuẩn lạc. Riêng tế bào vi khuẩn, tiến hành nhuộm gram và khả năng di động của vi khuẩn bằng phương pháp nhuộm xanh methylene theo tài liệu tham khảo [7].

2.5 Nhận diện vi khuẩn nội sinh dựa vào phản ứng PCR
Tách chiết DNA của các dòng vi khuẩn đã phân lập, DNA của vi khuẩn được tách chiết theo các bước sau: lấy khuẩn lạc trên môi trường NA cho vào tuýp 2 mL. Thêm 250 μ L dung dịch TE 1X và đánh tan sinh khối.

Sau đó, cho thêm 50 μL dung dịch SDS 10 %. Ly tâm 13 000 rpm trong 5 phút để phá vỡ màng tế bào của vi khuẩn. Bổ sung thêm 5 μL protein K (20 mg/mL). Ủ ở 65 °C trong 20 phút (5 phút đảo ngược tuýp 1 lần) để loại protein ra khỏi DNA. Thêm 400 μL CTAB 10 %/NaCl 0,7 M và ủ tiếp ở 65 °C trong 20 phút. Cho tiếp 600 μL chloroform-isoamyl alcohol (24/1) vào tuýp và lắc đều. Sau đó, ly tâm 12 000 rpm trong 10 phút. Chuyển phần dịch trong bên trên sang tuýp mới. Thêm 1 mL isopropanol vào tuýp và lắc đều, ủ ở -20 °C ít nhất 30 phút. Ly tâm 13 000 rpm trong 10 phút, đổ nhẹ để loại bỏ nước bên trên, DNA tủa ở đáy tuýp. Rửa DNA với 1 mL cồn 70 %, ly tâm 12 000 rpm trong 5 phút (lặp lại 2 lần). Để khô DNA ở nhiệt độ phòng trong (1-2) giờ. Hòa tan DNA với 30 μL nước cất 2 lần vô trùng, trữ lạnh ở -20 °C nếu chưa sử dụng.

Để nhận diện vi khuẩn nội sinh trong cây, sử dụng các đoạn mồi khuếch đại vùng 16S rDNA được thiết kế bởi với cặp mồi p515FPL (5'-GTGCCAGCAGCCGCGTAA-3') và p13B (5'-AGGCCCCGGAACGTATTCAC-3') [1].

Sau khi ly trích DNA, phản ứng PCR được thực hiện bằng máy PCR Eppendorf (Mastercycler Nexus gradient) với 2 đoạn mồi trên [6]. Lưu giữ sản phẩm ở -20 °C. Các sản phẩm sau khi được khuếch đại bằng phản ứng PCR, tiếp tục đem điện di trên agarose gel 2 % có bổ sung thêm safe view. Quan sát các band DNA trên gel bằng hệ thống chụp hình gel GelDoc Go (Bio-Rad Laboratories, Inc) để nhận diện các dòng vi khuẩn bằng cách quan sát các băng xuất hiện trên gel, so sánh kích thước sản phẩm PCR với thang DNA chuẩn để xác định các dòng vi khuẩn nội sinh đã phân lập với kích thước của băng DNA vào khoảng 900 bp.

2.6 Khảo sát khả năng cố định đạm của vi khuẩn nội sinh trong cây DC

Vi khuẩn có khả năng cố định đạm có thể phát triển tốt trên môi trường không đạm do chúng có khả năng tổng hợp đạm từ không khí. Cây chuyển tất cả dòng vi khuẩn nội sinh trên cây DC lên môi trường Burk không đạm và ủ ở 30 °C và theo dõi sự phát triển của vi khuẩn từ (1-2) ngày, dòng nào có khả năng phát triển trên môi trường Burk không đạm thì có khả năng cố định đạm. Sau đó, chọn những dòng vi khuẩn phát triển mạnh để khảo sát khả năng cố định đạm.

Định lượng đạm tổng hợp: xây dựng đường chuẩn NH_4^+ gồm 6 ống nghiệm được đánh số thứ tự 0-1-2-3-4 và 5 với ống 0 là ống đối chứng âm, lần lượt thêm các thành phần vào mỗi ống nghiệm theo [6]. Các ống nghiệm được trộn đều trên máy vortex và để ổn định ở nhiệt độ 30 °C khoảng (15-20) phút để phản ứng tạo màu xảy ra. Chuẩn bị mẫu đo: chuẩn bị mỗi ống nghiệm cho mỗi mẫu và lần lượt cho các thành phần sau: 2 mL nước cất, 0,5 mL dịch mẫu, 2,5 mL dung dịch phenol-sodium nitroprusside, 2,5 mL dung dịch sodium hypochloride. Các ống nghiệm được khuấy trộn trên máy vortex và để ổn định khoảng (15-20) phút. Đo hàm lượng NH_4^+ bằng phương pháp so màu ở bước sóng 640 nm ($\text{OD}_{640\text{nm}}$) trên máy đo quang phổ tử ngoại khả biến 2 chùm tia UH5300 (Hitachi, Japan).

Khảo sát khả năng cố định đạm của vi khuẩn nội sinh: tiến hành dựng đường chuẩn ở bước sóng 640nm $Y = aX + b$, trong đó X là nồng độ mẫu đo (mg/L), Y là độ hấp thụ ($\text{OD}_{640\text{nm}}$). Dựa vào phương trình đường chuẩn và giá trị $\text{OD}_{640\text{nm}}$ của mẫu để tính hàm lượng đạm NH_4^+ tương đương hàm lượng NH_4^+ có trong mẫu theo công thức:

$X = (Y - b) : a$. Đường chuẩn chỉ sử dụng được khi R^2 có giá trị trong khoảng 0,95-1.

2.7 Khảo sát đánh giá ảnh hưởng của chủng vi khuẩn nội sinh cố định đạm đến sự sinh trưởng và phát triển của cây DC



Chuẩn bị dịch vi khuẩn: các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường Burk ở điều kiện nhiệt độ phòng với tốc độ lắc 120 rpm trong thời gian nuôi cấy 48 giờ để thu dịch vi khuẩn gốc. Dịch pha loãng được chuẩn bị bằng cách pha loãng $\frac{1}{2}$ dịch vi khuẩn gốc với nước cất vô trùng. Dịch vi khuẩn nghiên cứu được bảo quản ở nhiệt độ 4 °C.

Chuẩn bị cây DC thí nghiệm: dùng thùng xốp có đường kính 25 cm và chiều cao 20 cm, cho hỗn hợp đất sạch có phối trộn trấu (tỉ lệ 2:1) và tiến hành gieo hạt DC. Khảo sát sự ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của vi khuẩn đối với cây DC được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố, gồm 3 nghiệm thức, được lặp lại 5 lần. Các nghiệm thức bao gồm: dịch vi khuẩn gốc, dịch vi khuẩn pha loãng $\frac{1}{2}$ và đối chứng là không phun vi khuẩn. Thể tích phun dịch vi khuẩn là 5 mL cho một nghiệm thức và phun ở 2 thời điểm là 14 ngày và 28 ngày sau khi gieo hạt.

Các chỉ tiêu theo dõi: chiều cao cây (cm) được đo từ thân đến đỉnh sinh trưởng của cây, đường kính lá (cm)

đo tại vị trí rộng nhất của lá, số lượng lá, khối lượng cây tươi (g/cây) được xác định bằng cách cân toàn bộ khối lượng các bộ phận trên mặt đất của cây.

2.8 Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được tổng hợp và xử lý thống kê theo phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) một nhân tố, dùng phép kiểm định LSD test ở mức $P < 0,05$ hoặc $P < 0,01$ để so sánh sự sai khác nhau giữa các công thức thí nghiệm sử dụng phần mềm thống kê SPSS.

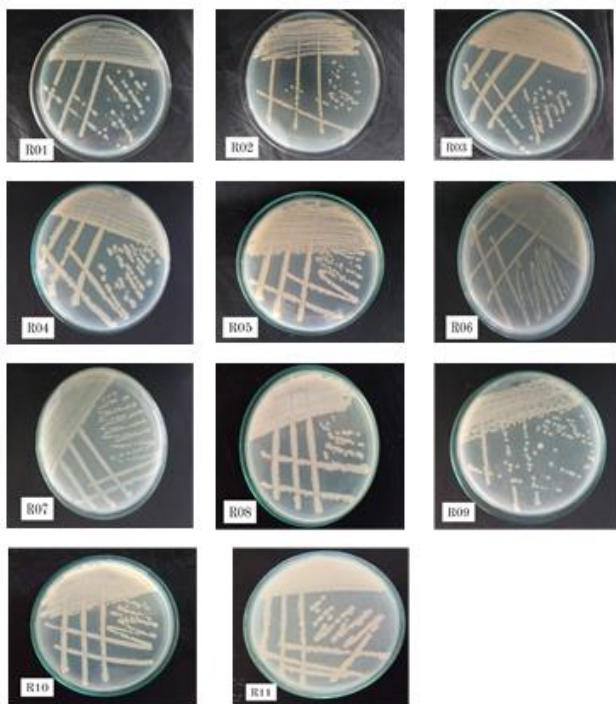
3. Kết quả và thảo luận

3.1 Phân lập vi khuẩn nội sinh từ rễ của cây DC

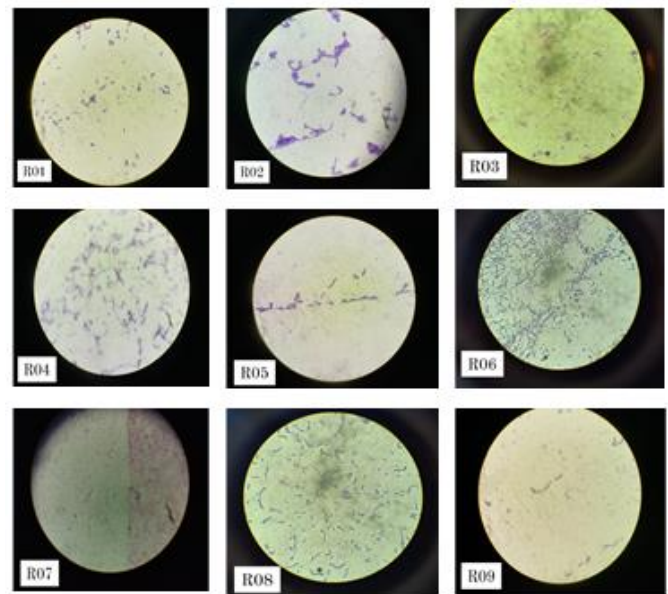
Từ 10 mẫu rễ của cây DC thu tại huyện Châu Thành, tỉnh Tiền Giang, đã phân lập được 11 dòng vi khuẩn trên môi trường NA. Các chủng vi khuẩn nội sinh phân lập có hình thái, kích thước khuẩn lạc và màu sắc đa dạng được thể hiện qua Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của 11 dòng vi khuẩn phân lập được thể hiện qua Hình 1 và Hình 2 thông qua việc quan sát và ghi nhận như hình dạng khuẩn lạc, màu sắc, bề mặt, dạng bìa, chuyển động, hình dạng tế bào vi khuẩn và nhuộm gram.

Bảng 1 Kết quả phân tích đặc điểm khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn nội sinh ở cây DC

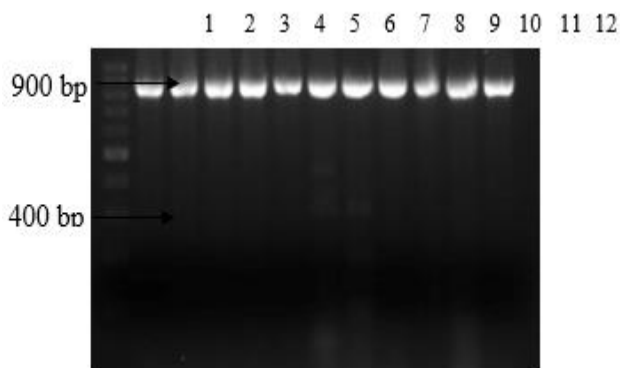
STT	Dòng	Hình dạng khuẩn lạc	Màu sắc	Bề mặt	Dạng bìa	Chuyển động	Hình dạng vi khuẩn	Gram
1	R01	Tròn	Trắng ngà	Bóng ướt	Nguyên	—	Que ngắn	+
2	R02	Không đều	Trắng ngà	Bóng ướt	Răng cưa	—	Que dài	+
3	R03	Tròn	Vàng nhạt	Bóng ướt	Nguyên	—	Que ngắn	+
4	R04	Không đều	Vàng nhạt	Hơi nhẵn, ướt	Răng cưa	—	Que dài	+
5	R05	Tròn	Vàng nhạt	Bóng ướt	Nguyên	—	Que dài	+
6	R06	Tròn	Vàng nhạt	Bóng ướt	Nguyên	+	Que ngắn	+
7	R07	Tròn	Trắng	Bóng ướt	Nguyên	+	Que ngắn	—
8	R08	Tròn	Trắng ngà	Hơi nhẵn, ướt	Nguyên	+	Que ngắn	+
9	R09	Không đều	Trắng	Bóng ướt	Răng cưa	—	Chuỗi	+
10	R10	Tròn	Trắng	Bóng ướt	Nguyên	+	Que dài	+
11	R11	Tròn	Trắng	Bóng ướt	Nguyên	—	Que dài	+



Hình 1 Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của 11 dòng vi khuẩn phân lập



Hình 2 Đặc điểm hình thái tế bào của 11 dòng vi khuẩn phân lập



Hình 3 Phổ điện di sản phẩm PCR được nhân lên từ DNA của các dòng vi khuẩn nội sinh trên gel agarose (1: thang chuẩn 100 bp; 2-12: là các dòng vi khuẩn R01, R02, R03, R04, R05, R06, R07, R08, R09, R11 và R12)

3.2 Nhận diện các dòng vi khuẩn nội sinh cây DC

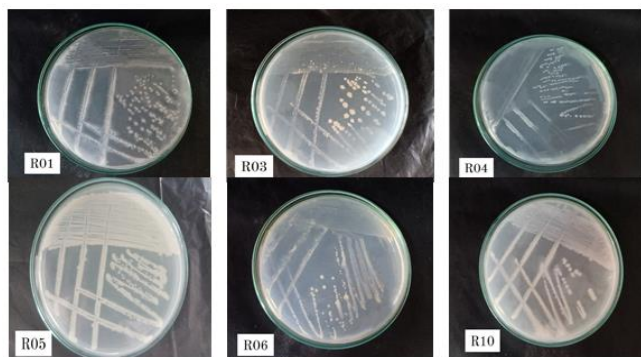
Kết quả phân tích PCR vùng gen 16S rDNA với 2 đoạn mồi p515FPL và p-13B (là cặp mồi chuyên biệt dùng để nhận diện vi khuẩn nội sinh với kích thước sản phẩm là 900 bp) để nhận diện vi khuẩn nội sinh cho thấy có 11/11 dòng cho băng DNA ở vị trí nằm trong khoảng

900 bp so với thang chuẩn. Do đó, có thể kết luận tất cả dòng vi khuẩn trên đều là vi khuẩn nội sinh.

3.3 Khả năng cố định đạm của vi khuẩn nội sinh trong cây DC

3.3.1 Khả năng cố định đạm của các dòng vi khuẩn nội sinh trên môi trường Burk không đạm đặc

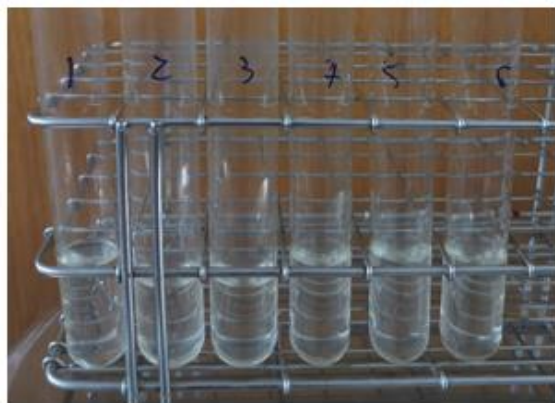
Trong 11 dòng vi khuẩn nội sinh được nuôi cấy trên môi trường Burk không đạm, sau 2 ngày nuôi ở 30 °C thì chỉ có 6 dòng vi khuẩn (dòng R01, R03, R04, R05, R06 và R10) phát triển mạnh và 5 dòng vi khuẩn (dòng R02, R07, R08, R09 và R11) phát triển rất yếu, thậm chí không phát triển. Như vậy, theo kết quả kiểm tra trên môi trường Burk không đạm ta có thể kết luận rằng có 6 dòng vi khuẩn nội sinh đã phân lập được có khả năng cố định đạm (chiếm 54,55 %).



Hình 4 Các dòng vi khuẩn nội sinh phát triển trên môi trường Burk

3.3.2 Khả năng cố định đạm của các dòng vi khuẩn đã phân lập

Sau khi kiểm tra bằng cách cấy các dòng vi khuẩn đã phân lập trên môi trường Burk không đậm đặc, 6 dòng vi khuẩn sơ tuyển được tiếp tục nuôi cấy trong môi trường Burk không đậm lỏng để xác định chính xác hơn khả năng cố định đạm của chúng. Mẫu được thu vào thời điểm 2 ngày sau khi nuôi ủ để đo lượng đạm có trong môi trường nuôi cấy bằng phương pháp so màu ở bước sóng 640 nm. Lượng đạm được vi khuẩn cố định có trong dung dịch phản ứng với thuốc thử tạo thành dung dịch có màu vàng nhạt đến xanh lá nhạt, lượng đạm được vi khuẩn cố định càng nhiều thì màu xanh lá của dung dịch phản ứng càng đậm.



Hình 5 Phản ứng màu của vi khuẩn cố định đạm

Kết quả cho thấy tất cả 6 dòng vi khuẩn đã khảo sát đều có khả năng cố định đạm. Sau 2 ngày nuôi cấy,

dòng vi khuẩn nội sinh R03 có khả năng tổng hợp NH_4^+ cao nhất (10,67 mg/L), tiếp theo là dòng R10 (6,48 mg/L), R06 (5,23 mg/L), R04 (3,38 mg/L), R05 (1,4 mg/L) và thấp nhất là R01 (0,64 mg/L). Đây là những vi khuẩn tiềm năng có khả năng ứng dụng trong trồng cây rau DC. So với kết quả phân lập vi khuẩn *Burkholderia* nội sinh cây khóm với kết quả vi khuẩn nội sinh trong cây DC có hàm lượng NH_4^+ tổng hợp cao nhất sau 2 ngày nuôi cấy (10,67 mg/L) so với kết quả vi khuẩn phân lập từ khóm tổng hợp đậm mức cao nhất sau 4 ngày nuôi cấy. Từ kết quả này, dòng vi khuẩn nội sinh R03 được lựa chọn giải trình tự và khảo sát ảnh hưởng của dòng này đến sự sinh trưởng và phát triển của cây DC [8].

3.4 Kết quả nhận diện các dòng vi khuẩn nội sinh

Kết quả giải trình tự định danh đoạn 16S rDNA của dòng R03 có đoạn DNA dài 1 453 bp có tỉ lệ đồng hình 99,93 % với trình tự DNA của *Bacillus flexus* dòng MP-9 (MH005063.1).

```
ACGACTTCCCCAATCATCTGTCCACCTTAG
GCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCCACCGAC
TTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGG
GCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCA
CCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGAT
TCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACA
ATCCGAAGTGAAGATGGTTTTATGGGATTGGC
TTGACCTCGCGGTCTTGACGCCCTTTGTACCA
TCCATTGAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAA
GGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT
CCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAG
TGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAAGATCAAG
GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT
CTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCAC
CACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGGAACGC
TCTATCTCTAGAGTTGTCAGAGGATGTCAAGA
```

CCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTA
 AACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC
 GTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCG
 TACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGC
 TGCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACA
 CTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTION
 AGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACCTTTC
 GCGCTCAGCGTCAGTTACAGACCAAAAAGC
 CGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCT
 ACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCGCT
 TTTCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCA
 ATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCA
 CATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCGCGCTT
 TACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCAC
 CTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTT
 AGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGG
 TACAAGCAGTTACTCTTGTACTTGTCTTCCCT
 AACAACAGAGTTTACGACCCGAAAGCCTTC
 ATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTT
 CGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCT
 CCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCA
 GTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGCTATG
 CATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCA
 ACTAGCTAATGCACCGCGGGCCCATCTGTAAG
 TGATAGCCGAAACCATCTTTCAATTTTCTCTT
 ATGCAAGAAAAAATGTTATCCGGTATTAGCTC
 CGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGC
 AGGTTGCCACGTGTTACTACCCGTCCGCCG
 CTAACGTCATAGAAGCAAGCTTCTAATCAGTT
 CGCTCGACTTGCA

Bacillus flexus là vi khuẩn gram dương có hình dạng khuẩn lạc tròn màu vàng nhạt, bề mặt bóng ướt, dạng bìa nguyên, không chuyển động, dạng vi khuẩn hình que ngắn. Chúng rất phổ biến, không độc và không gây hại cho người, động vật và môi trường [9]. Nhiều

nghiên cứu đã chỉ ra rằng *Bacillus flexus* có quan hệ mật thiết với thực vật, có khả năng kích thích sinh trưởng phát triển cây trồng, gia tăng khả năng hấp thu dinh dưỡng và bảo vệ cây khỏi một số tác nhân gây hại [10]. Ngoài ra, chúng là những vi khuẩn có khả năng hình thành bào tử nên dễ nhân sinh khối, dễ dàng được sản xuất dưới dạng bột, bột thấm nước trong khi vẫn giữ duy trì được khả năng sống vì chúng có thể sống tiềm sinh trong thời gian dài khi gặp điều kiện ngoại cảnh bất lợi [11]. Kết quả của nghiên cứu này khẳng định thêm rằng *B. flexus* còn có khả năng tổng hợp lượng NH_4^+ cao cũng như thúc đẩy sinh trưởng và phát triển của cây DC. Tại Việt Nam, Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên trong những năm qua đã tiến hành nghiên cứu và phân lập các chủng vi khuẩn nội sinh trên cả cà phê chè và cà phê vối. Với nghiên cứu trên cà phê chè ở Lâm Đồng đã phân lập được 30 chủng vi khuẩn cố định đạm nội sinh trong rễ và tuyển chọn được chủng *B. cereus* M15 là chủng có hoạt tính cố định N và phân giải P cao nhất [12]. Theo nghiên cứu trên cây cà phê cũng thu được kết quả *B. flexus* được phát hiện là vi khuẩn nội sinh trong cây cà phê [13]. Trong báo cáo khác cũng cho thấy dòng *Bacillus* sp. được phân lập từ *Speranskia tuberculata* (Bge.) Baill có tác dụng kháng nấm *Botrytis cinerea* Pers. gây sự thối rữa một cách mạnh mẽ, đạt hiệu quả đến 71,1 % trong điều kiện *in vitro* và 52,4 % trong thí nghiệm ngoài đồng [14]. *B. subtilis* được phân lập từ cây nho và có tác dụng ức chế bệnh Pierce [15]. Trong một vài nghiên cứu khác cũng phát hiện vi khuẩn *Bacillus* nội sinh trong cây tiêu, đặc biệt dòng IISBP 17 được xác định là *B. megaterium* có hoạt tính mạnh chống lại *Phytophthora capsici*, một loại nấm gây ra bệnh thối rễ [16] và nghiên cứu về tiềm năng kiểm soát sinh học của vi khuẩn nội sinh, cũng

xác định được vi khuẩn *B. licheniformis* có tác dụng kháng lại nấm *Fusarium moniliforme* [17]. Kết quả thí nghiệm cho thấy nguồn vi khuẩn nội sinh *Bacillus* sp. phong phú trong cây đã giúp cho cây phát triển tốt là nguồn tài nguyên quý giá cần được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi.

3.5 Ảnh hưởng của chủng vi khuẩn nội sinh tuyển chọn đến sự sinh trưởng và phát triển của DC

Khối lượng và số lá của cây DC là một trong những chỉ tiêu rất quan trọng ảnh hưởng đến chất lượng và năng suất của cây. Kết quả theo dõi các chỉ tiêu trên cây DC cho thấy việc xử lý các dịch vi khuẩn ở các mức khác nhau đã ảnh hưởng có ý nghĩa (Bảng 2).

Bảng 2 Kết quả khảo sát ảnh hưởng của chủng vi khuẩn nội sinh R03

Dịch vi khuẩn R03	Chiều cao (cm)	Số lá	Đường kính lá (cm)	Khối lượng cây tươi (g)
1 (Phun dịch vi khuẩn gốc)	14,7	8,6 ^a	3,35 ^a	6,74 ^a
2 (Phun ½ dịch vi khuẩn)	14,5	7,0 ^a	2,96 ^{ab}	5,55 ^b
3 (Không phun)	14,5	4,2 ^b	2,73 ^b	5,32 ^b
CV (%)		20,51	11,28	12,54
F	ns	**	*	*

Số liệu trong Bảng là trung bình của 5 lần lặp lại, trong cùng một cột các số mang chữ số mũ giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê 5 % (*) hoặc 1 % (**).

Kết quả phân tích phương sai ANOVA cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa ở mức 1 % và 5 % ở các chỉ tiêu số lá, đường kính lá và khối lượng cây tươi giữa các nghiệm thức. Số lá dao động từ 4,2 đến 8,6, hệ số biến thiên là 20,51 %. Kiểm định LSD ở mức 0,01 cho thấy nghiệm thức 1 và nghiệm thức 2 có số lá lớn hơn các nghiệm thức không phun. Đường kính lá của các nghiệm thức dao động từ 2,73 cm đến 3,35 cm, hệ số biến thiên 11,28 %. Không có sự phân hạng rõ rệt giữa các nghiệm thức. Khối lượng cây tươi có hệ số biến thiên 12,54 %, khối lượng cây tươi dao động từ 5,32 g đến 6,74 g. Nghiệm thức 1 (phun dịch vi khuẩn gốc) có khối lượng cây tươi cao nhất so với các nghiệm thức

còn lại (khối lượng trung bình là 6,74 g). Qua kết quả phân tích thống kê các chỉ tiêu thu được, cho thấy nghiệm thức 1 (phun dịch vi khuẩn gốc) cho năng suất cao nhất thể hiện ở khối lượng tươi của cây DC cao nhất. Kết quả nghiên cứu tương tự như kết quả khảo sát của nghiên cứu khi khảo sát ảnh hưởng của hỗn hợp 2 dòng vi khuẩn nội sinh trong cây cà phê vối (*B. subtilis* EK17 và *B. pumilus* BMT14) đã ghi nhận được kết quả hỗn hợp vi khuẩn này đã có tác động tích cực làm gia tăng số quả/chùm so với công thức đối chứng không xử lý [18]. Trong một nghiên cứu khác cũng đã khảo sát ảnh hưởng của 2 dòng vi khuẩn nội sinh (*B. cereus* và *B. subtilis*) đến khả năng gia tăng số lượng quả ớt. Kết quả cho thấy số quả ớt trung bình tăng từ 3,5 % đến 22,6 % tùy vào mức vi khuẩn và phương pháp xử lý [19].



NT 1: Phun dịch vi khuẩn gốc



NT2: Phun dịch vi khuẩn pha loãng 1/2



NT 3 không phun

Hình 6 Kết quả thử nghiệm phun vi khuẩn trên cây DC

4 Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập được 11 dòng vi khuẩn từ vùng rễ cây DC ở huyện Châu Thành, tỉnh Tiền Giang và được xác định là vi khuẩn nội sinh bằng kỹ thuật PCR với sản phẩm vùng 16S rDNA được nhận diện với kích thước 900 bp khi sử dụng cặp mồi chuyên biệt. Kết quả khảo sát đặc tính của các dòng vi khuẩn đã xác định được 6/11 dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm cao

(0,64-10,67) mg/L, trong đó dòng R03 là tốt nhất với lượng NH_4^+ tổng hợp được là 10,67 mg/L. Dòng vi khuẩn R03 được xác định có tỉ lệ tương đồng với *Bacillus flexus* MP-9 ở mức 99,93 %. Qua phân tích thống kê các chỉ tiêu thu được, nghiệm thức phun dịch vi khuẩn gốc cho năng suất cao nhất, thể hiện ở khối lượng tươi cao nhất nên có thể chọn lựa nghiệm thức này để nghiên cứu đánh giá sự ảnh hưởng tích cực đến sự sinh trưởng của cây DC.

Tài liệu tham khảo

1. Zinniel D.K., Lambrecht P., Harris N.B., Feng Z., Kuezmarski D., Highley P., Ishimaru C., Arunakumari A., Barletta G.R., Vidaver A.K. (2002). Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied Environment Microbiology*. 59:2198-2208.
2. Lăng Ngọc Đậu, Cao Ngọc Điệp, Nguyễn Thị Xuân My. (2007). Khả năng cố định đạm, hòa tan lân và sinh tổng *Azospirillum lipoferum*. hợp IAA của vi khuẩn *Tạp chí Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong Khoa học sự sống*, (số 6), tr. 445-448.
3. Cao Ngọc Điệp, Phạm Thị Khánh Vân, Lăng Ngọc Đậu. (2007). Phát hiện vi khuẩn *Azospirillum lipoferum* nội sinh trong cây lúa mùa cao sản (*Oryza sativa* L.) trồng ở Đồng bằng sông Cửu Long. Tuyển tập Báo cáo Khoa học Hội nghị toàn quốc 2007 – Nghiên cứu cơ bản trong Khoa học sự sống, 10/08/2007, Quy Nhơn. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật: 456-459.
4. Phan Thị Nhã. (2009). Phân lập vi khuẩn nội sinh trong cây khóm trồng ở thị xã Vị Thanh, tỉnh Hậu Giang. *Luận văn Thạc sĩ ngành Sinh thái học, khoa Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ*.
5. 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*, (số 16), tr. 151-156.
6. Cao Ngọc Điệp. (2010). *Sách chuyên khảo vi khuẩn nội sinh thực vật*, Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ: 33-46.
7. Cao Ngọc Điệp, Nguyễn Hữu Hiệp. (2002). *Thực tập vi sinh đại cương*, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
8. Trần Thanh Phong, Cao Ngọc Điệp, (2011). Phân lập và đặc tính vi khuẩn nội sinh trong cây khóm (*Ananas comosus* [L.] trồng trên đất phèn huyện Tân Phước, tỉnh Tiền Giang. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, số 9 (1): 125-132.
9. Huang H., Fairweather N.F., Cutting S.M., Jenny C. (2011). Immunization with *Bacillus* Spores Expressing Toxin A Peptide Repeats Protects against Infection with *Clostridium difficile* Strains Producing Toxins A and B. *ASM Journals*. 79:1-6.
10. Ramezani M., Moghaddam E.M., Ravari S.B., Rouhani H. (2013). The nematocidal potential of local *Bacillus* species against the root-knot nematode infecting greenhouse tomatoes. *Biocontrol Science and Technology*. 24:279-290.
11. Turner, Backman. (1991). Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. *Plant Disease* 75(4): 347-353.
12. Nguyễn Ngọc Mỹ (2012). Nghiên cứu, phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn cố định đạm nội sinh trong rễ cây cà phê chè ở Tây Nguyên. *Luận văn Thạc sĩ Sinh học, Đại học Tây Nguyên*.
13. Fernando, E. V, M. Pava-Ripoll, F. Posada, J.S. Buyer. (2005). Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. J. *Basic Microbiol*. 45, 371-380.
14. Wang H., Wen K., Zhao X., Wang X., Li A., Hong H. (2009). The inhibitory activity of endophytic *Bacillus* sp. strain CHM1 against plant pathogenic fungi and its plant growth-promoting effect. *Crop Protection*. 28:634-639.

15. Kirkpatrick, B., M. Wilhelm. (2007). Evaluation of grapevine endophytic bacteria for control of Pierce's disease. *University of California*, pp. 203-207.
16. Aravind, R., A. Kumar, S.J. Eapen, K.V. Ramana. (2009). Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum* L.) genotype: isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsici*. *Letters in Applied Microbiology* 48,58-64.
17. Bacon, C. W., D. M. Hinton. (2002). Endophytic and Biological Control Potential of *Bacillus mojavensis* and Related Species. *Biological Control* 23, 274-284.
18. Đỗ Thị Kiều An. (2019). Nghiên cứu ảnh hưởng của một số chủng vi khuẩn nội sinh chọn lọc đến sinh trưởng, phát triển cây cà phê vối. *Luận án Tiến sĩ Nông nghiệp, Trường Đại học Tây Nguyên*.
19. Zhou H., Cheng Q., Yaou S., Lang C., Yong L. (2014). Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization. *PNAS*. 14:5235-5140.

Isolation and selection of endophytic bacteria with nitrogen fixing ability from *Houttuynia cordata* Thunb.

Tran Ngoc Chi^{1,2,*}, Phan Thi Hong Ngoc¹

¹Faculty of Agriculture and Food Technology, Tien Giang University

²Association of Women Intellectuals in the Mekong Delta

*tranngocchi@tgu.edu.vn

Abstract *Houttuynia cordata* Thunb. is a popular vegetable in the daily meals of Vietnamese families. In addition, *H. cordata* is also one of the medicinal plants that has long been used in traditional medicine to treat digestive diseases, rashes, blocked milk ducts, etc. The objective is to isolate and identify the endophytic bacterial strains in *H. cordata* that have high nitrogen-fixing ability. Results have shown that eleven bacterial strains were isolated from *H. cordata* root collected from Chau Thanh district, Tien Giang province on Nutrient agar (NA) medium and were confirmed as endophytic bacteria, using specific primers of endophytic bacteria. Of the 11 isolated strains, only 6 strains had the ability to fix nitrogen. Among them, strain R03 with the highest synthesized nitrogen content of 10.67 mg/L. This strain was identified as 99.93% similar to *Bacillus flexus* strain MP-9.

Keywords *Bacillus flexus*, endophytic bacteria, *Houttuynia cordata*, nitrogen fixation.

