



## PHÂN LẬP VÀ KHẢO SÁT ĐẶC TÍNH CỦA VI KHUẨN NỘI SINH Ở CÂY TRINH NỮ (*Mimosa pudica* L.) TẠI TỈNH TRÀ VINH

Trần Trọng Hiếu<sup>1</sup> và Nguyễn Hữu Hiệp<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Nông nghiệp - Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 07/04/2016

Ngày chấp nhận: 26/10/2016

### Title:

Isolation and characterization of endophytic bacteria in *Mimosa pudica* L. collected in Tra Vinh province

### Từ khóa:

*Bacillus megaterium*, cây Trinh nữ, kháng khuẩn, *Klebsiella pneumoniae*, Trà Vinh, vi khuẩn nội sinh

### Keywords:

Antibacterial activity, *Bacillus megaterium*, endophytes, *Klebsiella pneumoniae*, *Mimosa pudica* L., Tra Vinh

### ABSTRACT

Forty four endophytic bacterial strains were isolated from samples of *Mimosa pudica* L. collected in Tra Vinh province using PDA medium (pH=6.5). Almost bacterial cells had rod shape, Gram negative, motile. All strains were able to fix nitrogen, synthesize IAA and could solubilize insoluble phosphate. The strain TH4 had the highest ability of N-fixing with 0.68 µg/mL, while strain RH5 gave highest amount of IAA at 51.8 µg/mL and strain LH7 had the highest ability of solubilize insoluble phosphate with E%=170. Sixteen strains showed antibacterial activity against *Aeromonas hydrophila*, twelve strains could against *Escherichia coli* and seven strains showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, eight strains showed antibacterial activity against *Aeromonas hydrophila* and *Escherichia coli*, four strains showed antibacterial activity against *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus* and one strain showed antibacterial activity against *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Comparing the nucleotide sequences of 16S ribosomal RNA with the gene bank database two isolates were indentified to the species level. The strain NH11 was determined as *Klebsiella pneumoniae* strain ZJ-02 (KF974478.1) (with 98% homogeneous level) and the strain TH10 had 99% homogeneous level, similarity to *Bacillus megaterium* strain LP35\_L05 (KM350269.1).

### TÓM TẮT

Bốn mươi bốn dòng vi khuẩn nội sinh đã được phân lập từ cây Trinh nữ tại tỉnh Trà Vinh trên môi trường dinh dưỡng PDA (pH=6,5). Đa số các dòng vi khuẩn này có dạng hình que, Gram âm và có khả năng chuyển động. Các dòng vi khuẩn phân lập có các đặc tính cố định đạm, tổng hợp IAA và hòa tan lân khó tan. Trong đó, dòng TH4 có khả năng cố định lượng đạm cao nhất (0,68 µg/mL). Nồng độ IAA cao nhất là 51,8 µg/mL (do dòng RH5 tổng hợp) và dòng LH7 có khả năng hòa tan lân cao nhất (E%=170). Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn cho thấy 16 dòng có tính kháng với *Aeromonas hydrophila*, 12 dòng có tính kháng với *Escherichia coli*, 7 dòng có tính kháng với *Staphylococcus aureus*, 8 dòng có tính kháng với cả *Aeromonas hydrophila* và *Escherichia coli*, 4 dòng có tính kháng với cả *Aeromonas hydrophila* và *Staphylococcus aureus*, 1 dòng có tính kháng với cả 3 loài vi khuẩn *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus*. Hai dòng vi khuẩn được chọn để nhận diện ở cấp độ loài bằng phương pháp giải trình tự vùng gene 16S-rRNA cho thấy dòng NH11 có độ đồng hình 98% với *Klebsiella pneumoniae* strain ZJ-02 (KF974478.1) và dòng TH10 có độ đồng hình 99% với *Bacillus megaterium* strain LP35\_L05(KM350269.1).

Trích dẫn: Trần Trọng Hiếu và Nguyễn Hữu Hiệp, 2016. Phân lập và khảo sát đặc tính của vi khuẩn nội sinh ở cây trinh nữ (*Mimosa pudica* L.) tại tỉnh Trà Vinh. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 46b: 23-29.

## 1 GIỚI THIỆU

Tập đoàn vi khuẩn nội sinh có lợi trong cây trồng đã kích thích cây trồng sinh trưởng và phát triển tốt nhờ chúng có khả năng cố định đạm, hòa tan lân khó tan, tổng hợp các kích thích tố tăng trưởng thực vật như IAA và các hợp chất kháng khuẩn tự nhiên có khả năng trực tiếp ức chế một số bệnh hoặc kích thích cây trồng sản xuất các hợp chất biến dưỡng thứ cấp chống lại các tác nhân gây bệnh (Hardoim *et al.*, 2008). Việt Nam có nguồn tài nguyên thực vật vô cùng phong phú và quý giá, đó luôn là đề tài hấp dẫn các nhà khoa học trong nước và trên thế giới. Trong đó, cây Trinh nữ là một trong những cây dược liệu phổ biến đã được Đông y cổ truyền sử dụng để điều trị nhiều loại bệnh. Theo Azmi *et al.* (2011) thì tất cả các bộ phận khác nhau của cây Trinh nữ có chứa nhiều chất có hoạt tính sinh học và dược lý quan trọng, có tác dụng chống lại các bệnh về thần kinh, tim mạch, rối loạn tiêu hóa, tiêu đường, chữa lành vết thương, chống oxy hóa, kháng độc, kháng khuẩn và kháng nấm. Theo Hardoim *et al.*, (2008) các vi khuẩn nội sinh với cây dược liệu có khả năng sản xuất trực tiếp các hợp chất kháng khuẩn tự nhiên và kích thích cây chủ sản xuất các hợp chất biến dưỡng trung gian, các hợp chất có tính kháng khuẩn. Vì thế, việc ứng dụng những dòng vi khuẩn nội sinh có lợi trong sản xuất phân vi sinh bón cho cây trồng nhằm giảm sử dụng phân bón hóa học và ứng dụng hiệu quả trong lĩnh vực y vi sinh để tạo ra các loại thuốc kháng sinh thảo dược thay thế một phần thuốc kháng sinh tân dược có nguồn gốc hóa học, góp phần bảo vệ sức khỏe con người và hệ sinh thái nông nghiệp bền vững là việc làm cấp thiết.

Mục tiêu nghiên cứu là phân lập, tuyển chọn và nhận diện các dòng vi khuẩn nội sinh ở cây Trinh nữ (*Mimosa pudica* L.) tại tỉnh Trà Vinh có các đặc tính tốt như khả năng cố định đạm, tổng hợp IAA, hòa tan lân khó tan, đặc biệt là có tính kháng khuẩn.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu

Mẫu thu gồm nốt rễ, rễ, thân và lá của cây Trinh nữ mọc hoang ở huyện Cầu Ngang, Châu Thành và Cầu Kè, tỉnh Trà Vinh được thu vào buổi sáng sớm và chiều mát, thu luôn phần đất xung quanh gốc cây với độ sâu khoảng 4-5 cm, bảo quản mẫu thu được trong túi nylon sạch khuẩn sau đó mang về để tiến hành xử lý mẫu và phân lập tại Phòng thí nghiệm Vi sinh vật thuộc Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại

học Cần Thơ. Nguồn vi khuẩn gây bệnh *E.coli* và *S.aureus* được cung cấp từ Phòng thí nghiệm Sinh học Phân tử thuộc Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Nguồn vi khuẩn gây bệnh *A.hydrophila* được cung cấp từ Bộ môn Bệnh cá thuộc Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

### 2.2 Phân lập vi khuẩn nội sinh

Mẫu được rửa sạch dưới vòi nước để loại bỏ phần đất bám vào rồi tách rời nốt rễ, rễ, thân và lá. Phần đất thu được xung quanh vùng rễ cũng được đưa về phòng thí nghiệm đo pH. Sau đó, mẫu được rửa sạch bằng nước cất vô trùng và cắt thành đoạn ngắn dài khoảng 2-3 cm rồi làm khô mẫu bằng giấy hút ẩm, khử trùng bề mặt mẫu (nốt rễ, rễ, thân, lá) bằng Ethanol 70% trong thời gian 2 phút, tiếp tục khử trùng bằng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% trong thời gian 5 phút. Cuối cùng, rửa mẫu bằng nước cất vô trùng 4 lần rồi làm khô mẫu bằng giấy thấm vô trùng. Kiểm tra vi sinh vật còn sót lại trên bề mặt mẫu: dùng micropipette hút 50  $\mu$ L nước rửa mẫu lần cuối trải lên đĩa petri có chứa môi trường PDA đặc (Atlas, 2010): (g/L): khoai tây, 200; dextrose, 20; agar, 18; pH=6,5, ủ ở 30°C trong thời gian 24 giờ nhằm kiểm tra có vi sinh vật nào xuất hiện hay không. Nếu không có vi sinh vật nào phát triển chứng tỏ mẫu đã được xử lý đạt yêu cầu. Vi khuẩn được phân lập sau này sẽ là vi khuẩn nội sinh. Các mẫu sau khi được khử trùng bề mặt được cắt thành miếng nhỏ cho vào cối đã khử trùng, giã nhuyễn (ngoại trừ phần nốt rễ). Sau đó, cho vào thêm 2 mL nước cất vô trùng, trộn đều và để yên 15 phút cho lắng phân cặn rồi dùng micropipette hút lấy phần dịch trích trong bên trên và cho vào tube eppendorf. Hút lấy 100  $\mu$ L phần dịch trích trong cho vào ống nghiệm chứa 5 mL môi trường Nfb bán đặc đã được chuẩn bị sẵn, đem ủ ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 24 giờ. Nếu quan sát thấy xuất hiện một lớp màng mỏng trắng đục (vòng pellicle) bên dưới, cách bề mặt môi trường PDA bán đặc trong ống nghiệm khoảng 2-5 mm, đó là dấu hiệu chứng tỏ có sự hiện diện của vi khuẩn nội sinh. Riêng phần nốt rễ sau khi được khử trùng như trên thì được nghiền nát hoặc cắt làm đôi, trải phần dịch thu được lên đĩa Petri có chứa môi trường PDA để phân lập cho đến khi rỗng, tiến hành quan sát và ghi nhận đặc điểm khuẩn lạc (hình dạng, màu sắc, dạng bia, độ nổi, kích thước). Kiểm tra độ rỗng (độ thuận) của vi khuẩn bằng phương pháp giọt ép dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 400 lần (Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Hữu Hiệp, 2002). Khi vi khuẩn đã rỗng, tiến hành nhuộm Gram và cấy chuyên từng dòng vi khuẩn sang ống nghiệm chứa môi trường PDA đặc tương ứng để trữ ở 4°C.

### 2.3 Khảo sát khả năng cố định đạm, tổng hợp IAA, hòa tan lân khó tan của những dòng vi khuẩn phân lập được

Các dòng vi khuẩn đã được tách ròng được khảo sát khả năng cố định đạm trong môi trường Nfb lỏng không đạm bằng phương pháp so màu Indophenol Blue ở bước sóng 636 nm ( $OD_{636nm}$ ); khảo sát khả năng tổng hợp IAA trong môi trường Nfb lỏng không đạm có bổ sung Tryptophan (100 mg/L) bằng phương pháp so màu Salkowsky ở bước sóng 530 nm ( $OD_{530nm}$ ); khảo sát khả năng hòa tan lân khó tan bằng phương pháp định tính sử dụng môi trường nuôi vi khuẩn NBRIP (Nautiyal, 1999): (g/L): sucrose, 10;  $Ca_3(PO_4)_2$ , 2,5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,25; KCl, 0,2;  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 5;  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,1; Bromthymol blue 0,5% trong KOH 0,2N,3; agar, 18; pH=7,2). Xác định hiệu quả hòa tan lân  $E\% = (\text{đường kính vòng sáng halo}/\text{đường kính khuẩn lạc}) \times 100$  (Nguyen *et al.*, 1992).

### 2.4 Khảo sát khả năng kháng khuẩn của những dòng vi khuẩn phân lập được

Vi khuẩn được tăng sinh trong môi trường dinh dưỡng PDA lỏng (đạt mật số  $2,5 \times 10^8$  CFU/mL), dùng giấy thấm có đường kính 8 mm đã được khử trùng nhúng vào phần dịch vi khuẩn. Sau đó, đặt giấy thấm lên bề mặt môi trường dinh dưỡng PDA đặc đã trải vi khuẩn gây bệnh từng dòng riêng biệt (*E. coli*, *A. hydrophila*, *S. aureus*), đem ủ ở 30°C. Sau 24 giờ ủ, tiến hành quan sát và đo đường kính vòng vô khuẩn. Trong đó, đường kính vòng vô khuẩn = đường kính vòng sáng – đường kính giấy thấm (Bauer *et al.*, 1966).

### 2.5 Nhận diện các dòng vi khuẩn triển vọng bằng kỹ thuật Sinh học Phân tử

Tiến hành chiết tách DNA theo mô tả của Trần Nhân Dũng (2011), sau đó tiến hành phản ứng PCR vùng gene 16S-rRNA bằng cặp mồi 27F và

1492R (Lane, 1991) với trình tự như sau: 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3'); 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTACGACT-3'). Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự bằng hệ thống máy giải trình tự tự động của Công ty Macrogen (Hàn Quốc). Sử dụng công cụ BLAST N để so sánh trình tự DNA của các dòng vi khuẩn triển vọng với trình tự DNA của bộ gene các loài vi khuẩn trong ngân hàng dữ liệu NCBI để định danh đến cấp độ loài, có kết hợp với các đặc điểm về mặt hình thái, sinh lý, sinh hóa đã được xác định.

Số liệu trong nghiên cứu được xử lý bằng chương trình Microsoft Excel 2010, phân tích Anova và kiểm định Duncan bằng phần mềm thống kê Statgraphics Centurion XVI version 16.1.18.

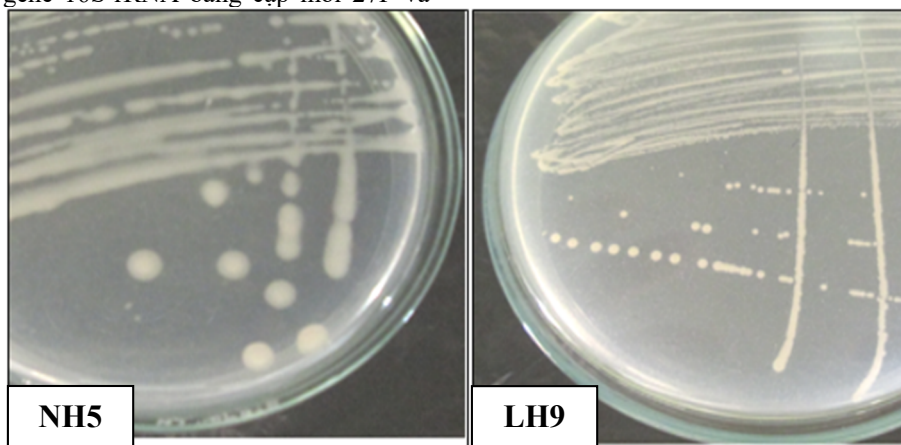
## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Phân lập vi khuẩn nội sinh

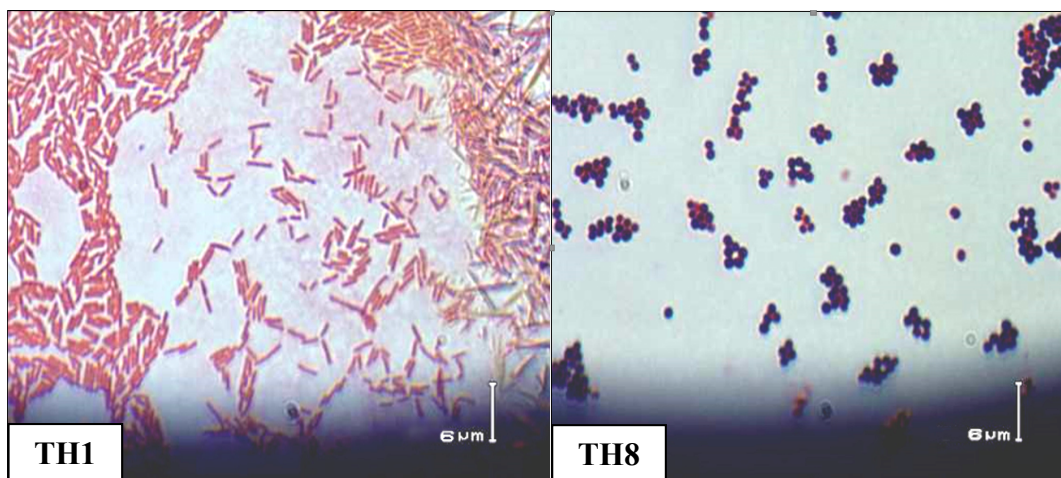
Từ 3 mẫu (mỗi mẫu bao gồm nốt rễ, rễ, thân và lá) thu tại 3 huyện ở tỉnh Trà Vinh, 44 dòng vi khuẩn đã được phân lập, trong đó 11 dòng từ nốt rễ, 8 dòng từ rễ, 14 dòng từ thân và 11 dòng từ lá. Các dòng được ký hiệu là NHx, RHx, THx, LHx với NH, RH, TH, LH lần lượt là các dòng vi khuẩn phân lập được từ nốt rễ, rễ, thân, lá và x là số thứ tự dòng vi khuẩn.

### 3.2 Đặc điểm hình thái của khuẩn lạc và các dòng vi khuẩn

Đa số các dòng vi khuẩn có khuẩn lạc tròn, màu trắng đục (Hình 1), độ nổi mô, tất cả đều có dạng bìa nguyên, kích thước khuẩn lạc dao động từ 1-2 mm. Khi quan sát vi khuẩn trong môi trường nước cất vô trùng dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 1000 lần, có 19 dòng dạng que ngắn, 14 dòng dạng que dài, 9 dòng dạng cầu đơn và 2 dòng dạng chuỗi. Kết quả nhuộm Gram có 8 dòng Gram dương và 36 dòng là Gram âm (Hình 2). Hầu hết các dòng đều chuyển động.



Hình 1: Khuẩn lạc của dòng NH5 và LH9 phân lập trên môi trường PDA



Hình 2: Vi khuẩn Gram âm (TH11) và vi khuẩn Gram dương (TH8) được quan sát bằng kính hiển vi ở độ phóng đại 1.000 lần

**3.3 Khả năng cố định đạm, tổng hợp IAA, hòa tan lân khó tan**

Bốn mươi bốn dòng vi khuẩn này vừa có khả năng cố định đạm vừa có khả năng tổng hợp IAA với một lượng nhất định (bắt đầu cố định và tạo ra lượng đạm vào ngày 2 nhưng ở mức thấp, lượng đạm tạo ra cao nhất vào ngày 4 sau khi chủng). Kết quả Bảng 1 cho thấy khả năng cố định đạm của sáu dòng vi khuẩn triển vọng sau 4 ngày ủ (Bảng 1). Nguyễn Tường Vi (2015) cho biết dòng vi khuẩn nội sinh NA1 phân lập từ nốt rễ Trinh nữ có nguồn gốc ở Vị Thanh, Hậu Giang có khả năng tổng hợp 0,47 μg/mL ammonium sau 4 ngày.

**Bảng 1: Hàm lượng ammonium (μg/mL) của các dòng vi khuẩn triển vọng**

Stt	Dòng	Ngày 2	Ngày 4
1	NH1	0,17 <sup>d</sup>	0,39 <sup>b</sup>
2	NH10	0,16 <sup>d</sup>	0,27 <sup>c</sup>
3	RH1	0,16 <sup>d</sup>	0,27 <sup>c</sup>
4	RH4	0,21 <sup>c</sup>	0,24 <sup>c</sup>
5	TH4	0,51 <sup>a</sup>	0,68 <sup>a</sup>
6	LH6	0,26 <sup>b</sup>	0,43 <sup>b</sup>
CV(%)		5,85	5,23

*Ghi chú: các giá trị trung bình trong cùng một cột có các mẫu tự theo sau giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 5%*

Về khả năng tổng hợp IAA thì tất cả đều có khả năng tổng hợp IAA. Kết quả Bảng 2 cho thấy lượng IAA tổng hợp được sau 4 ngày ủ của 7 dòng vi khuẩn triển vọng ứng dụng trong sản xuất phân vi sinh cho cây trồng được liệt. Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Tường Vi (2015) cho thấy hàm lượng IAA do các dòng vi khuẩn nốt rễ cây Trinh nữ tổng hợp biến thiên từ 9,68 μg/mL đến 25,6 μg/mL.

**Bảng 2: Hàm lượng IAA (μg/mL) của các dòng vi khuẩn triển vọng**

Stt	Dòng	Ngày 2	Ngày 4
1	NH2	35,3 <sup>b</sup>	46,2 <sup>b</sup>
2	NH11	16,1 <sup>d</sup>	46,8 <sup>b</sup>
3	RH5	33,9 <sup>b</sup>	51,8 <sup>a</sup>
4	TH5	35,1 <sup>b</sup>	45,6 <sup>b</sup>
5	TH12	41,3 <sup>a</sup>	46,4 <sup>b</sup>
6	LH6	26,7 <sup>c</sup>	51,2 <sup>a</sup>
7	LH10	35,5 <sup>b</sup>	45,6 <sup>b</sup>
CV(%)		3,27	2,86

*Ghi chú: các giá trị trung bình trong cùng một cột có các mẫu tự theo sau giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 5%*

Hai mươi chín dòng vi khuẩn có khả năng hòa tan lân từ dạng khó tan thành dạng dễ tan. Tuy nhiên, trong đó chỉ có 5 dòng có khả năng hòa tan lân tốt với hiệu quả hòa tan lân (E%) từ 135-170%. Lê Thị Huyền Trân (2015) tìm thấy các dòng vi khuẩn phân lập từ cây Trinh nữ có thể hòa tan lân với hiệu suất từ 15,9-104,8%.

**Bảng 3: Hiệu quả hòa tan lân (E%) của các dòng vi khuẩn triển vọng**

Stt	Dòng	Ngày 2	Ngày 4	Ngày 6
1	NH10	126 <sup>ab</sup>	130 <sup>a</sup>	135 <sup>c</sup>
2	RH1	146 <sup>a</sup>	154 <sup>a</sup>	165 <sup>ab</sup>
3	RH5	146 <sup>a</sup>	150 <sup>a</sup>	155 <sup>b</sup>
4	TH3	117 <sup>b</sup>	153 <sup>a</sup>	169 <sup>ab</sup>
5	LH7	133 <sup>ab</sup>	146 <sup>a</sup>	170 <sup>a</sup>
CV(%)		9,44	10,3	4,57

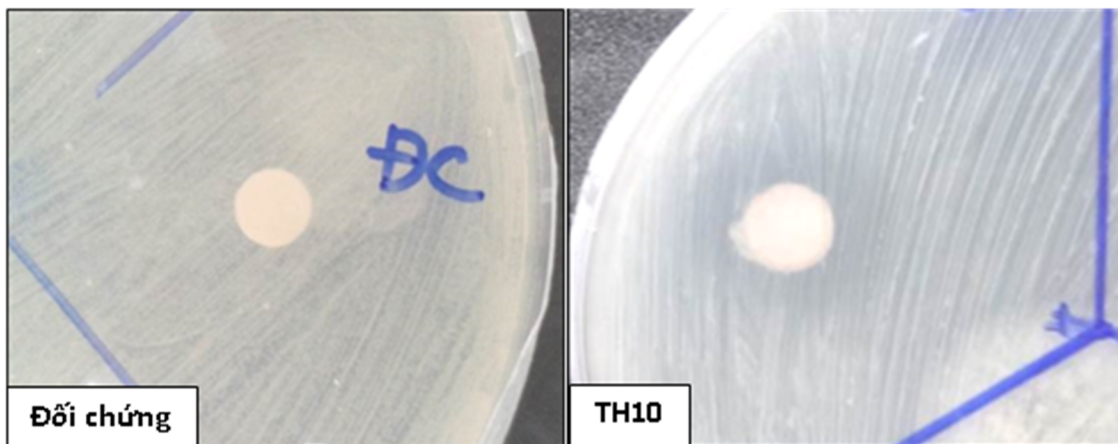
*Ghi chú: các giá trị trung bình trong cùng một cột có các mẫu tự theo sau giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 5%*

### 3.4 Khả năng kháng khuẩn

Kết quả nghiên cứu cho thấy có 16 dòng vi khuẩn kháng được với vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* gây bệnh đốm đỏ ở cá. Trong đó, dòng TH10 có đường kính vòng vô khuẩn lớn nhất (15,5 mm), 12 dòng vi khuẩn kháng vi khuẩn *Escherichia coli* gây bệnh tiêu chảy ở người và động vật, 7 dòng vi khuẩn kháng vi khuẩn

*Staphylococcus aureus* gây bệnh viêm da, trong đó dòng NH11 có đường kính vòng vô khuẩn lớn nhất là 8,00 mm (Bảng 4 và Hình 3).

Lê Thị Huyền Trân (2015) phát hiện vòng vô khuẩn cao nhất của các dòng vi khuẩn phân lập từ cây Trinh nữ đối với vi khuẩn *A. hydrophila*, *E. coli* và *S. aureus* theo thứ tự là 15,6 mm, 8,67mm và 7,7 mm.



Hình 3: Vòng vô khuẩn của dòng TH10 kháng với *A. hydrophila*

Bảng 4: Vòng vô khuẩn tạo ra bởi vi khuẩn phân lập từ cây Trinh nữ đối với ba dòng vi khuẩn gây bệnh

Vi khuẩn phân lập	Vòng vô khuẩn quanh vi khuẩn gây bệnh		
	<i>hydrophila</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
NH3	1,17g	1,83e	-
NH5	-	-	4,33b
NH6	1,83fg	-	-
NH8	-	-	4,50b
NH9	3,17ef	-	-
NH10	5,67d	4,83b	-
NH11	2,67fg	-	8,00a
RH5	3,00ef	2,67de	-
RH8	4,33de	-	3,17b
TH2	5,33d	-	7,50a
TH3	9,33b	4,17bc	4,00b
TH4	-	3,50cd	-
TH5	-	4,83b	-
TH10	15,50a	-	6,83a
TH11	10,30b	3,83bc	-
TH12	-	3,83bc	-
TH13	3,00ef	6,00a	-
TH14	15,00a	4,50bc	-
LH7	3,00ef	4,17bc	-
LH8	2,33fg	-	-
LH10	7,83c	4,67b	-
CV (%)	14,5	14,2	13,4

Ghi chú: các giá trị trung bình trong cùng một cột có các mẫu tự theo sau giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 5%. Dấu -: không có tính kháng khuẩn gây bệnh

### 3.5 Định danh các dòng vi khuẩn có tính kháng khuẩn triển vọng ứng dụng trong y học

Từ kết quả nghiên cứu 2 dòng vi khuẩn kháng khuẩn triển vọng được chọn để thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi là 27F và 1495R. Hai dòng NH11 và TH10 được giải trình tự sản phẩm PCR bằng gen mã hóa 16S-rRNA và so sánh trên ngân hàng dữ liệu NCBI cho kết quả như sau: dòng NH11 có tổng cộng 1.185 nucleotides của vùng gene 16SrDNA được giải trình tự 1.185bp có độ đồng hình 98% với trình tự DNA của *Klebsiella pneumoniae* strain ZJ-02 và dòng TH10 có tổng cộng 931 nucleotides của vùng gene 16SrDNA được giải trình tự 931bp có độ đồng hình 99% với trình tự DNA của *Bacillus megaterium* strain LP35\_L05.

Kết quả định danh dòng NH11 cũng phù hợp với những mô tả của Rueda-Puente *et al.* (2003), đã tìm thấy *Klebsiella pneumoniae* có tác dụng cố định đạm và giúp loài cây *Salicornia bigelovii* thích nghi tốt trong môi trường đất nhiễm mặn và khô cằn. Nguyễn Thu Hà và *ctv.* (2009) đã tìm thấy *Klebsiella pneumoniae* nội sinh ở một số loài cỏ chăn nuôi và có các đặc tính tốt như cố định đạm, hòa tan lân khó tan và tổng hợp kích thích tố tăng trưởng thực vật. Liu *et al.* (2011) tìm thấy *Klebsiella pneumoniae* NG14 nội sinh ở gốc lúa trồng có khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA. Kiriya *et al.* (2012) tìm thấy *Klebsiella pneumoniae* M-AI-2 có khả năng hòa tan lân khó

tan ở dạng  $AlPO_4$  và  $FePO_4$  trong đất trồng lúa và cà tím.

Kết quả định danh dòng TH10 cũng phù hợp với những mô tả của Ding *et al.* (2005), đã tìm thấy *Bacillus megaterium* có khả năng cố định đạm ở vùng rễ của cây lúa Mì, bắp, rơm rạ. Steven *et al.* (2008) đã phát hiện *Bacillus megaterium* strain MKB 135 có khả năng kiểm soát sinh học bệnh đốm *Septoria tritici* trên lúa Mì do nấm *Mycosphaerella graminicola* gây ra ở quy mô phòng thí nghiệm. Theo Malanicheva *et al.* (2012), *Bacillus megaterium* có tác dụng kháng vi khuẩn *S. aureus* strain INA00761, *Leuconostoc mesenteroides* strain VKPM B-4177, *Pseudomonas aeruginosa* strain ATCC 27853 và *E. coli* strain ATCC 25922. Suzane *et al.* (2013) đã tìm thấy loài *Bacillus megaterium* nội sinh ở rễ cây chuối có khả năng cố định đạm, tổng hợp IAA và hòa tan lân khó tan. Sang *et al.* (2014) cũng đã tìm thấy *Bacillus megaterium* strain MJ1212 có tác dụng hòa tan lân khó tan trong đất trồng cải, giúp tăng chiều dài rễ và trọng lượng tươi cây.

#### 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Bốn mươi bốn dòng vi khuẩn nội sinh đã được phân lập từ nốt rễ, rễ, thân và lá của cây Trinh nữ tại tỉnh Trà Vinh trên môi trường dinh dưỡng PDA (pH=6,5). Tất cả 44 dòng vi khuẩn này đều có khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA. Trong đó, có 29 dòng có khả năng hòa tan lân khó tan. Hai dòng NH11 và TH10 có khả năng cố định đạm, tổng hợp IAA, hòa tan lân, đặc biệt là có tính kháng khuẩn mạnh được định danh lần lượt là *Klebsiella pneumoniae* dòng NH11 và *Bacillus megaterium* dòng TH10. Các dòng vi khuẩn có tính kháng khuẩn triển vọng này cần được tiếp tục khảo sát thêm khả năng kháng khuẩn đối với một số loài vi khuẩn và nấm gây bệnh khác.

#### LỜI CẢM ƠN

Tác giả chân thành cảm ơn Trường Đại học Trà Vinh đã hỗ trợ kinh phí thực hiện đề tài nghiên cứu này.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Atlas, R. M., 2010. Handbook of Microbiological Media. 4th edition. CRC Press. 1953 pages. New York, USA.

Azmi, L., M.K. Singh and A.K. Akhtar, 2011. Pharmacological and biological overview on *Mimosa pudica* Linn. Int. J. of Pharm. & Life Sci. (IJPLS), 2 (11): 1226-1234.

Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris and M. Turck, 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Amer. J. Clin. Pathol., 45: 493-496.

Cao Ngọc Diệp và 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.

Ding, Y., J. Wang, Y. Liu and S. Chen, 2005. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacillus from plant rhizospheres in Beijing region. Journal of Applied Microbiology, 99: 1271-1281.

Hardoim, P.R., L.S. Van Overbeek and J.D. Van Elsas, 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends in Microbiology, 16: 463-471.

Kiriya, S., C.B. Iwai, M. Matsuoka, K. Ohnishi and S. Tanaka, 2012. Isolation of Phosphate-Solubilizing Bacteria from Different Fields Crop Productions. IJERD-International Journal of Environmental and Rural Development, 3 (1): 150-154.

Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., (Eds). John Wiley and Sons, New York, NY: pp.115-175.

Lê Thị Huyền Trân, 2015. Phân lập các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây Trinh nữ (*Mimosa pudica* L.) mọc hoang ở tỉnh Hậu Giang. Luận văn tốt nghiệp Đại học ngành Công nghệ Sinh học. Đại học Cần Thơ.

Liu, X.Y., W. Wu, E.T. Wang, B. Zhang, J. Macdermott and W.X. Chen, 2011. Phylogenetic relationships and diversity of beta rhizobia associated with *Mimosa* spp. grown in Sishuangbanna, China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 61: 334-342.

Malanicheva, I.A., D.G. Kozlov, I.G. Sumarukova, O.V. Efremenkova, V.A. Zenkova, G.S. Katrukha, M.I. Reznikova, O.D. Tarasova, S.P. Sineokii and S.P. El'-Registan, 2012. Antimicrobial activity of *Bacillus megaterium* strains. Microbiology, 81: 178-185.

Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters. 170 (1):265-270.

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

Nguyen, C., W. Yan, F. L. Tacon and F. Lapayrie, 1992. Genetic variability of phosphate solubilising activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton. Plant and Soil, 143: 193-199.

Nguyễn Tường Vi, 2015. Phân lập và khảo sát đặc tính của vi khuẩn nội sinh ở cây Trinh nữ (*Mimosa pudica* L.) tại tỉnh Hậu Giang. Luận

- văn tốt nghiệp Cao học ngành Công nghệ Sinh học. Đại học Cần Thơ.
- Rueda-Puente, E., T. Castellanos, E. Troyo-Diéguez, J.L. Díaz de León-Alvarez and B. Murillo-Amador, 2003. Effects of a Nitrogen-Fixing Indigenous Bacterium (*Klebsiella pneumoniae*) on the Growth and Development of the Halophyte *Salicornia bigelovii* as a New Crop for Saline Environments. *J. Agronomy & Crop Science*, 189: 323-332.
- Sang, M.K., R. Radhakrishnan, Y. Young-Hyun, J. Gil-Jae, L. In-Jung, L. Ko-Eun and K. Jin-Ho, 2014. Phosphate Solubilizing *Bacillus megaterium* mj1212 Regulates Endogenous Plant Carbohydrates and Amino Acids Contents to Promote Mustard Plant Growth. *Indian J. Microbiol.*, 54 (4): 427-433.
- Steven, K., V. Ransbotyn, R.K. Mojibur, B. Fagan, G. Leonard, E. Mullins and M.D. Fiona, 2008. *Bacillus megaterium* shows potential for the biocontrol of *Septoria tritici* blotch of wheat. *Biological Control*, 47: 37-45.
- Suzane, A.S., A.X. Adelica, R.C. Márcia, M.S.C. Aceide, C.T.P. Marlon and N. Silvia, 2013. Endophytic bacterial diversity in banana (*Musa* spp.) roots. *Genetics and Molecular Biology*, 36 (2): 252-264.
- Trần Nhân Dũng, 2011. *Sổ tay Thực hành Sinh học Phân tử*. Nhà xuất bản Trường Đại học Cần Thơ. 169 trang.