



DOI:10.22144/ctujos.2024.365

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN CHỊU MẶN TẠI HUYỆN CẦN GIỜ, THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH CÓ HOẠT TÍNH CỐ ĐỊNH ĐẠM VÀ HÒA TAN LÂN

Giang Cẩm Tú¹, Võ Lê Huyền Trang¹ và Lê Thanh Khang^{2*}¹Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành²Trường Đại học Quy Nhơn

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): lethanhkhang@gnu.edu.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 09/05/2024

Sửa bài (Revised): 03/07/2024

Duyệt đăng (Accepted): 11/08/2024

Title: Isolation and selection of salt tolerant bacteria in Can Gio District, Ho Chi Minh City with fixed nitrogen and phosphate solubilizing activity

Author(s): Giang Cam Tu¹, Vo Le Huyền Trang¹ and Le Thanh Khang^{2*}

Affiliation(s): ¹NTT Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University; ²Quy Nhơn University

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu nhằm phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có hoạt tính cố định đạm và hòa tan lân trên môi trường Luria Bertani (LB) có bổ sung muối NaCl 4‰ từ các mẫu đất vùng rễ trồng xoài bị nhiễm mặn ở huyện Cần Giờ, TP. Hồ Chí Minh. Kết quả đã tuyển chọn được 23 dòng vi khuẩn chịu mặn. Kết quả nghiên cứu cho thấy, có hai dòng vi khuẩn có hoạt tính cố định đạm cao hơn những dòng còn lại là X4.1 và X1.1 với nồng độ NH_4^+ lần lượt là 3,42 mg/L và 3,29 mg/L sau sáu ngày nuôi cấy. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, có hai dòng vi khuẩn có hoạt tính hòa tan lân cao hơn những dòng khác là X7.1 và X6.1 với chỉ số hòa tan lân (SI) lần lượt là 8,8 và 5,3 sau sáu ngày nuôi cấy. Sau 15 ngày nuôi cấy, hai dòng vi khuẩn X4.1 và X8.2 cho kết quả về chiều dài rễ và chiều cao thân tốt nhất sau khi bổ sung vào hạt lúa trong ống nghiệm. Dựa vào sự tương đồng về trình tự gen 16S-rRNA, hai dòng vi khuẩn có hoạt tính cố định đạm cao được định danh lần lượt là *Pantoea* sp. X4.1 và *Bacillus subtilis* X8.2.

Từ khóa: Cần Giờ, chịu mặn, cố định đạm, hòa tan lân, vi khuẩn

ABSTRACT

The purpose of this study was conducted to isolate and select bacteria with fixing nitrogen and inorganic phosphorus solubilising activity on Luria Bertani (LB) medium containing sodium chloride 4‰ from mango cultivated soil samples under salt stress conditions in Can Gio district, Ho Chi Minh city. In this study, 23 salt tolerants were isolated. The fixing nitrogen activities of two strains were much higher than the remaining ones, including X4.1 and X1.1, with variable NH_4^+ concentrations (3.42 mg/L and 3.29 mg/L, respectively) after six days of culture. The ability of solubilizing phosphate of two strains was higher than the others, including X7.1 and X6.1 (with soluble index (SI) 8.8 and 5.3, respectively) after six days of culture. Two strains of bacteria X4.1 and X8.2 provided the best results for root length and stem height after being added to rice seeds in test tubes for 15 days. Based on the 16S-rRNA gene sequence similarity, two nitrogen-fixing bacterial strains were identified as *Pantoea* sp. X4.1 and *Bacillus subtilis* X8.2.

Keywords: Can Gio, salt tolerance, N_2 fixing, salt tolerance, phosphate solubilization, bacteria

1. GIỚI THIỆU

Vi khuẩn chịu mặn có thể phát triển ở nồng độ muối từ 1 đến 33%. Vi khuẩn có khả năng chịu mặn kém có thể phát triển ở nồng độ muối 1 – 8%, vi khuẩn chịu mặn trung bình từ 8 – 15% và vi khuẩn có khả năng chịu mặn cao có thể phát triển ở nồng độ muối từ 15% trở lên (Helge, 1986). Vi khuẩn chịu mặn sử dụng các chiến lược khác nhau để phát triển và tồn tại trong môi trường nước mặn. Những chiến lược này bao gồm giảm thiểu sự hấp thu muối của các thành phần cấu trúc của màng tế bào hoặc thành tế bào; điều chỉnh nồng độ ion nội bào bằng cách bơm các ion ra khỏi tế bào thông qua các kênh vận chuyển Na^+/H^+ và K^+/Na^+ ; tích lũy các chất hòa tan tương thích như sucrose, trehalose, glycosylglycerol và glycine betaine tổng hợp nội sinh; tạo ra các protein và enzyme thích nghi với nồng độ muối cao, tổng hợp các polysaccharide ngoại bào và tạo thành màng sinh học ngăn chặn sự hấp thụ muối (Silke et al., 2013; Yuan et al., 2016). Vi khuẩn chịu mặn đóng vai trò quan trọng trong nông nghiệp vì có thể hỗ trợ cây trồng chịu mặn và cải thiện năng suất cây trồng ở các vùng khô và mặn. Shweta et al. (2011) đã phân lập được các dòng *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas mendocina*, *Arthrobacter* sp., *Halomonas* sp. và *Nitriticola lacisaponensis* có khả năng chịu được độ mặn 2 – 25% NaCl và có các đặc tính kích thích tăng trưởng thực vật, chẳng hạn như hòa tan lân (Shweta et al., 2011). Shiyong et al. (2018) đã phân lập được 305 dòng vi khuẩn chịu mặn từ đất vùng rẫy lúa ở tỉnh Giang Tô, Trung Quốc, trong đó có 162 dòng vi khuẩn chịu được nồng độ muối lên tới 150 g/L NaCl. Kết quả phân loại 74 dòng chịu mặn cho thấy các dòng vi khuẩn thuộc các bộ Bacillales (72%), Actinomycetales (22%), Rhizobiales (1%) và Oceanospirillales (4%). Hầu hết các dòng phân lập đều có khả năng cải thiện khả năng chịu mặn, tăng trưởng và năng suất lúa (Shiyong et al., 2018).

Theo Saharan & Nehra (2011), vi khuẩn cố định đạm được chia thành hai nhóm chính: vi khuẩn cộng sinh và vi khuẩn sống tự do. Nhóm một là vi khuẩn cố định đạm sống cộng sinh, được chia thành hai nhóm nhỏ gồm: vi khuẩn cộng sinh với cây họ Đậu gồm: giống *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Sinorhizobium* và *Mesorhizobium* cộng sinh bắt buộc với cây họ đậu; vi khuẩn sống cộng sinh với cây không phải họ Đậu gồm *Frankia* và vi khuẩn lam. Nhóm hai là vi khuẩn cố định đạm sống tự do có thể liên kết hoặc nội sinh vào bên trong các bộ phận của cây bao gồm: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus*,

Pseudomonas, *Klebsiella*, *Clostridium*,... (Saharan & Nehra, 2011).

Vi khuẩn hòa tan lân là vi khuẩn có khả năng hòa tan lân khó hòa tan thành dạng dễ tiêu cho cây trồng. Một số lượng lớn vi khuẩn hòa tan lân tập trung ở vùng rễ của thực vật và các hoạt động trao đổi chất của vi khuẩn bắt nguồn từ nhiều nguồn khác nhau (Vazquez et al., 2000).

Vi khuẩn đất vùng rễ (rhizosphere bacteria) là vi khuẩn cư trú vùng quanh bộ rễ của thực vật. Hiện nay vẫn chưa có một phương pháp thống nhất nào để xác định phạm vi của hệ rễ. Theo Kennedy (1999), vùng rễ là vùng đất tiếp xúc trực tiếp với rễ cây và chứa các hợp chất do rễ cây và vi sinh vật tiết ra (Kennedy, 1999). Có nhiều loại hợp chất khác nhau kích thích hoạt động của vi khuẩn, bao gồm: carbohydrate, axit hữu cơ, vitamin, nucleotide, flavonoid, enzyme, hormone và các hợp chất dễ bay hơi (Prescott et al., 1999). Các chất hữu cơ kể trên cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn, vì vậy quần thể vi khuẩn có xu hướng tập trung gần rễ cây hơn là ở những vùng xa rễ. Sự giảm số lượng vi khuẩn trong đất vùng rễ xảy ra khi thực vật gặp phải những điều kiện không thuận lợi như độ pH thấp, nhiệt độ cao và lượng mưa thấp trong quá trình sinh trưởng của cây (Frommel et al., 1993). Ở cây trồng, điều kiện phát triển không thuận lợi cũng có thể làm giảm số lượng vi khuẩn trong đất (Dobbelaere et al., 2001). Sự chênh lệch nhiệt độ cũng là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự phát triển của vi khuẩn (Okon & Labandera Gonzalez, 1994). Ngoài ra, khi phân hủy chất hữu cơ, vi khuẩn tạo thành chất dẻo có khả năng liên kết các hạt đất. Lớp vỏ nhầy và màng nhầy bao quanh vi khuẩn cũng đóng vai trò bám dính của các hạt đất. Mỗi loài thực vật tiết ra các chất khác nhau từ rễ, khi rễ chết sẽ bị phân hủy thành các chất khác nhau. Vì vậy, loài thực vật cũng quyết định số lượng và thành phần vi khuẩn sống ở vùng rễ. Số lượng và thành phần vi khuẩn cũng thay đổi tùy theo giai đoạn phát triển của cây, phụ thuộc vào hàm lượng các chất do hệ rễ tiết ra. Do rễ cây tiết ra nhiều hợp chất hữu cơ nên mật độ vi khuẩn đạt giá trị tối đa trong thời kỳ cây sinh trưởng và đạt giá trị tối thiểu khi thu hoạch (Hiệp & Diệp, 2009).

Xâm nhập mặn hiện đang gia tăng nhanh chóng trên khắp thế giới, làm tăng nguy cơ mất an ninh lương thực ở một số quốc gia. Các vùng đồng bằng của Ấn Độ, Myanmar và Bangladesh là những vùng sản xuất lúa gạo lớn trên thế giới và phải đối mặt với những mối đe dọa nghiêm trọng về an ninh lương thực do tình trạng nhiễm mặn ở đất ven biển. Ở Việt

Nam, hiện tượng xâm nhập mặn diễn ra không đều ở các vùng ven biển, đặc biệt là vùng đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), gây thiệt hại lớn cho sản xuất nông nghiệp, đặc biệt là lúa nước (Nthur & Điệp, 2014). Theo thông kê năm 2015, ước tính khoảng 35,5% diện tích lúa ở tám tỉnh ven biển bị ảnh hưởng. Xâm nhập mặn đạt mức cao kỷ lục trong năm 2016, gây thiệt hại 139.000 ha lúa ở ĐBSCL, sản lượng ước giảm 30 – 70%. Năm 2020, xâm nhập mặn đã gây thiệt hại khoảng 34.600 ha tại các tỉnh Cà Mau, Kiên Giang, Bến Tre và Sóc Trăng, năng suất ước tính giảm 30 – 70%. Có nhiều biện pháp có thể thực hiện để ngăn chặn sự xâm nhập của nước mặn, bao gồm: xây dựng hệ thống ngăn chặn xâm nhập mặn, tạo ra các giống cây trồng chịu mặn và tăng diện tích rừng ngập mặn ven biển. Những phương pháp này đòi hỏi nhiều thời gian và kinh phí. Gần đây, nhiều nghiên cứu đã được tiến hành trên khắp thế giới sử dụng các vi khuẩn chịu mặn để giảm thiểu tác động tiêu cực của các stress sinh học và phi sinh học khác nhau đối với thực vật. Kết quả cho thấy vi khuẩn chịu mặn với hoạt tính cố định đạm và hòa tan lân có thể được sử dụng để hỗ trợ cây trồng chống chịu stress mặn cũng như tăng cường và nâng cao năng suất hệ sinh thái đất nông nghiệp khu vực đã được thực hiện. Ở Việt Nam, việc sử dụng vi khuẩn chịu mặn để tăng khả năng chịu mặn của cây trồng chưa được quan tâm. Nghiên cứu mới tập trung phân lập các dòng vi khuẩn có hoạt tính sinh học như cố định đạm và hòa tan lân. Tuy nhiên, các nghiên cứu thực hiện ở huyện Cần Giỏi, Thành phố Hồ Chí Minh, một khu vực giáp biển cũng chịu nhiều ảnh hưởng từ nhiễm mặn vẫn còn nhiều hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu này được tiến hành nhằm phân lập và tuyển chọn được các dòng vi khuẩn chịu mặn có hoạt tính cố định đạm và hòa tan lân.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phân lập vi khuẩn có hoạt tính chịu mặn từ đất vùng rễ cây xoài

Thu mẫu đất: Mẫu đất vùng rễ sử dụng để phân lập vi khuẩn chịu mặn có hoạt tính cố định đạm và hòa tan lân được thu ngẫu nhiên tại các vườn xoài huyện Cần Giỏi, Thành phố Hồ Chí Minh. Tiến hành thu tám mẫu đất quanh vùng rễ (ở độ sâu khoảng 30 cm). Mẫu đất được giữ trong túi nilon, đặt nhãn giấy ghi thông tin về mẫu như mã số, địa chỉ thu mẫu, thời gian thu mẫu,.... Nên để mẫu nơi mát mẻ, tránh ánh nắng mặt trời. Mẫu đất có thể được lưu trữ ở nhiệt độ 4 – 8°C cho đến khi phân lập vi khuẩn (Hào & Thu, 2012; Fo et al., 2019).

Phân lập và tách ròng vi khuẩn từ các mẫu đất vùng rễ thu được: Các mẫu đất được trộn đều, cân

mỗi mẫu 5 g đất cho vào bình tam giác có chứa 50 mL nước cất đã khử trùng. Bình tam giác và các vật chứa dung dịch đất khác phải có nắp đậy để hạn chế sự nhiễm bẩn không khí vào mẫu. Nuôi lắc với tốc độ 150 vòng/phút trong một giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, lấy phần dịch đất đem pha loãng ở các nồng độ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} và 10^{-4} . Rút 100 μ L dung dịch đã pha loãng ở mỗi nồng độ lần lượt cho vào các đĩa môi trường LB (pepton 10 g, yeast 5 g, agar 20 g, nước cất vừa đủ 1 lít) có bổ sung 4 ‰ NaCl. Dùng que trải thủy tinh để trải đều mẫu trên đĩa môi trường. Các đĩa đã được trải ủ ở nhiệt độ 30°C cho đến khi các khuẩn lạc xuất hiện. Khi khuẩn lạc xuất hiện, những khuẩn lạc vi khuẩn có đặc điểm khác nhau được chọn và chuyển sang đĩa petri mới chứa môi trường LB. Cây truyền nhiều lần cho đến khi thu được vi khuẩn thuần chủng. Khi quan sát dưới kính hiển vi, vi khuẩn được coi là thuần chủng nếu vi khuẩn có hình dạng và kích thước giống nhau (Fo et al., 2019).

Quan sát và mô tả đặc điểm của khuẩn lạc: Khi các dòng vi khuẩn đã được phân lập, tiến hành quan sát hình thái các dạng khuẩn lạc bao gồm các đặc điểm về: màu sắc, hình dạng, độ nổi và dạng bề mặt khuẩn lạc bằng mắt thường. Tuy nhiên đối với khuẩn lạc có kích thước quá nhỏ thì có thể dùng kính lúp để quan sát. Tiến hành quan sát và mô tả hình thái khuẩn lạc: hình dạng khuẩn lạc (hình tròn, không đều, hình rễ cây và hình thoi); bề mặt khuẩn lạc (bia nguyên, bia gợn sóng, bia chia thủy, bia răng cưa và bia sợi); độ nổi của khuẩn lạc (phẳng, lồi, mô và cầu chông) và màu sắc khuẩn lạc (đục, trong, vàng, cam, xám, đen,...) (Điệp & Hiệp, 2008).

Quan sát đặc điểm của tế bào vi khuẩn: Sau khi phân lập vi khuẩn, tiến hành quan sát hình dạng tế bào và nhuộm Gram theo bộ KIT của Công Ty TNHH Dịch Vụ Và Thương Mại Nam Khoa (Điệp & Hiệp, 2008).

2.2. Khảo sát hoạt tính cố định đạm

Các dòng vi khuẩn chịu mặn tiếp tục được đánh giá hoạt tính cố định đạm. Các dòng vi khuẩn chịu mặn chọn lọc được cấy trên môi trường Ashby (mannitol 20 g, K_2HPO_4 0,2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g, NaCl 0,2 g, K_2SO_4 0,1 g, $CaCO_3$ 5 g, agar 20 g, nước cất vừa đủ 1 lít). Những dòng vi khuẩn có khả năng phát triển trên môi trường Ashby là dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm. Chọn những dòng vi khuẩn sinh trưởng mạnh (khuẩn lạc to và rõ) trên môi trường thạch Ashby. Chuyển sang môi trường Ashby dịch thể nuôi lắc 150 vòng/phút, sau 2, 4 và 6 ngày thu thập dịch nuôi để ly tâm lấy dịch trong để xác định hàm lượng NH_4^+ sinh ra bằng phương

pháp so màu với thuốc thử Nessler. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Đường chuẩn NH_4^+ được dựng với các mẫu có nồng độ NH_4^+ chuẩn khác nhau có dạng $y = ax + b$ để tính lượng NH_4^+ (Adriana & Luciane, 2017).

2.3. Khảo sát hoạt tính hòa tan lân

Các dòng vi khuẩn chịu mặn tiếp tục được đánh giá hoạt tính hòa tan lân không tan trên môi trường NBRIP (glucose 10 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g, KCl 0,2 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 g, agar 20 g, nước cất vừa đủ 1 lít). Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Khả năng hòa tan lân thể hiện qua chỉ số hòa tan lân (phosphate solubilizing index, SI). Công thức tính chỉ số hòa tan lân (Abdallah et al., 2019):

$$SI = \frac{(\text{đường kính khuẩn lạc} + \text{đường kính vòng phân giải})}{\text{đường kính khuẩn lạc}}$$

2.4. Đánh giá hiệu quả sáu dòng vi khuẩn cố định đạm lên khả năng sinh trưởng cây lúa trong điều kiện phòng thí nghiệm

Các dòng vi khuẩn cố định đạm cao được nuôi tăng sinh riêng biệt trong đĩa petri chứa môi trường Ashby đặc trong ba ngày. Sau đó, khối vi khuẩn được tiến hành thu sinh bằng cách chuyển dung dịch vi khuẩn sang dung dịch phosphate buffer (31,2 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ và 39,3 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) đã được thanh trùng và để nguội. Đối với mỗi dòng vi khuẩn, tiến hành hiệu chỉnh dung dịch vi khuẩn về mật số 10^6 , 10^8 và 10^{10} CFU/mL bằng nước khử khoáng tiệt trùng và được sử dụng để ngâm hạt lúa. Lúa giống OM 4218 được khử trùng bằng cách cho hạt vào bình tam giác và bổ sung cồn 70°, ngâm khoảng 3 phút đổ bỏ cồn, cho vào sodium hypochlorite (NaOCl) 1 % ngâm trong 3 phút, sau đó rửa lại 3 – 4 lần với nước cất đã khử trùng. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên, gồm các dòng vi khuẩn x ba nồng độ và một đối chứng. Mỗi nghiệm thức lặp lại ba lần cho mỗi nồng độ mật số vi khuẩn, mỗi ống nghiệm chứa hai hạt lúa. Tiến hành ngâm hạt lúa trong dung dịch huyền phù mỗi dòng vi khuẩn riêng biệt đã được chuẩn bị trong 24 giờ. Sau đó chuyển hạt lúa vào ống nghiệm ở điều kiện tối của phòng thí nghiệm. Hạt lúa được ngâm với dung dịch huyền phù vi khuẩn theo từng nồng độ 10^6 , 10^8 và 10^{10} CFU/mL. Nghiệm thức đối chứng được thực hiện

tương tự nhưng hạt lúa chỉ ngâm với nước cất tiệt trùng thay cho dịch huyền phù vi khuẩn. Sau 15 ngày ghi nhận các chỉ tiêu chiều dài rễ, chiều cao thân (đơn vị tính: cm) và khối lượng khô: sấy cây lúa ở 60°C trong sáu giờ, sau đó cân cây lúa mỗi 1,5 giờ, khi hai lần cân liên tiếp của cùng một cây lúa có khối lượng không đổi, ghi nhận kết quả (đơn vị tính: g) (Hoben & Somasegaran, 1982).

2.5. Nhận diện những dòng vi khuẩn chịu mặn có hoạt tính cố định đạm

Dòng vi khuẩn chịu mặn có hoạt tính cố định đạm cao nhất sau khi được đánh giá trên cây mạ trong ống nghiệm được trích ADN và khuếch đại đoạn gen 16S-rRNA bằng đoạn mồi 27F (5'AGAGTTTGATCTGGCTCAG3') và 1492R (5'CGGTTACCTTGTACGACTT3'). Gen 16S-rRNA được giải trình tự bằng máy giải trình tự tự động 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Mỹ). Trình tự ADN của gen 16S-rRNA ở các dòng vi khuẩn được phân tích bằng phần mềm Geneious, sau đó được so sánh với các trình tự nucleotide trên cơ sở dữ liệu của trung tâm quốc gia về thông tin công nghệ sinh học của Mỹ (National Center for Biotechnology Information, NCBI) bằng chương trình BLASTN để so sánh mức độ tương đồng của gen 16S-rRNA của vi khuẩn đã phân lập với gen tương ứng của các vi khuẩn hiện có trong cơ sở dữ liệu.

2.6. Thống kê phân tích số liệu

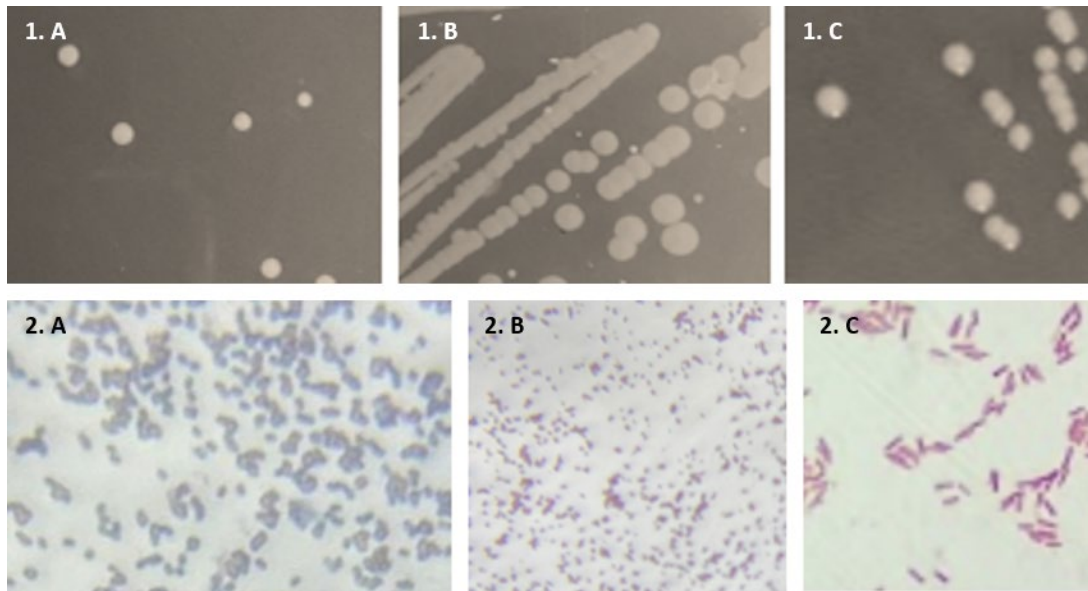
Kết quả được phân tích thống kê bằng phần mềm Minitab 16.0. Giá trị trung bình giữa các mẫu thử được so sánh bằng phép thử Tukey. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Vi khuẩn cố định đạm chịu mặn từ đất vùng rễ cây xoài

Các dòng vi khuẩn từ đất vùng rễ xoài được phân lập trên môi trường LB bổ sung 4% NaCl. Từ tám mẫu đất vùng rễ cây xoài thu được ở huyện Cần Giò, Thành phố Hồ Chí Minh, kết quả đã tuyển chọn và phân lập được 23 dòng vi khuẩn thể hiện hoạt tính chịu mặn.

Đặc điểm khuẩn lạc của ba dòng vi khuẩn trên thạch dinh dưỡng sau 24 giờ ủ, màu trắng đục đối với X1.5 và X3.4, màu vàng nhạt đối với X6.2. Khuẩn lạc của cả ba dòng vi khuẩn đều có hình dạng tròn, bìa nguyên (Hình 1).



Hình 1. Đặc điểm hình thái của một số dòng vi khuẩn chịu mặn phân lập được

1: Hình thái khuẩn lạc. 2: Nhuộm Gram.

Dòng vi khuẩn X1.5 (A): khuẩn lạc trắng đục, dạng tròn, bìa nguyên, Gram âm

Dòng vi khuẩn X3.4 (B): khuẩn lạc trắng đục, dạng tròn, bìa nguyên, Gram âm

Dòng vi khuẩn X6.2 (C): khuẩn lạc trắng đục, dạng tròn, bìa nguyên, Gram dương

Bảng 1. Đặc điểm của các dòng vi khuẩn có hoạt tính chịu mặn

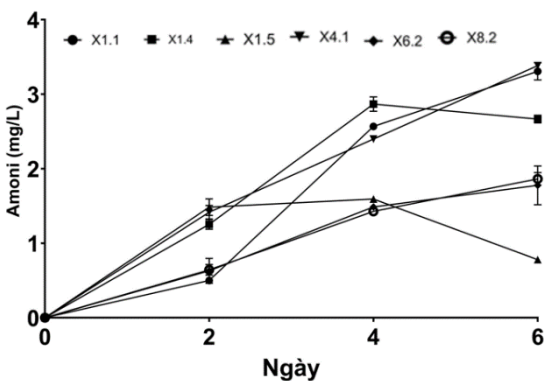
Dòng vi khuẩn	Đặc điểm khuẩn lạc				Đặc điểm tế bào	
	Màu sắc	Hình dạng	Bìa	Độ nổi	Hình dạng	Gram
X1.1	Trắng đục	Không đều	Nguyên	Lài	Que	+
X1.2	Trắng đục	Tròn	Nguyên	Mô	Que	+
X1.3	Trắng đục	Tròn	Nguyên	Mô	Que	-
X1.4	Trắng đục	Tròn	Răng cưa	Lài	Que	-
X1.5	Trắng đục	Tròn	Nguyên	Lài	Que	-
X2.1	Trắng đục	Không đều	Nguyên	Mô	Que	-
X2.2	Trắng đục	Tròn	Nguyên	Mô	Que	+
X3.1	Trắng đục	Tròn	Nguyên	Mô	Que	+
X3.2	Trắng đục	Tròn	Nguyên	Mô	Que	+
X3.3	Trắng đục	Tròn	Nguyên	Mô	Que	-
X3.4	Trắng đục	Tròn	Nguyên	Lài	Que	-
X4.1	Vàng nhạt	Tròn	Nguyên	Mô	Que	-
X4.2	Trắng đục	Không đều	Nguyên	Mô	Que	-
X5.1	Trắng đục	Tròn	Nguyên	Mô	Que	-
X5.2	Trắng đục	Tròn	Nguyên	Mô	Que	+
X5.3	Trắng đục	Tròn	Nguyên	Mô	Que	-
X6.1	Trắng đục	Tròn	Nguyên	Mô	Que	-
X6.2	Vàng nhạt	Tròn	Nguyên	Mô	Que	+
X7.1	Vàng	Tròn	Nguyên	Mô	Que	-
X7.2	Trắng đục	Tròn	Nguyên	Mô	Que	-
X7.3	Trắng đục	Tròn	Nguyên	Lài	Que	-
X8.1	Trắng đục	Tròn	Nguyên	Mô	Que	+
X8.2	Vàng nhạt	Tròn	Nguyên	Mô	Que	+

Ký hiệu (-) thể hiện Gram âm và (+) Gram dương

Từ số liệu được ghi nhận ở Bảng 1 cho thấy hình dạng khuẩn lạc không đều chiếm 13,04 % (03 dòng vi khuẩn), bìa nguyên hoặc răng cưa. Màu sắc đa số là màu trắng đục có 19 dòng vi khuẩn (82,61 %). Hình dạng tế bào dạng đều là hình que (chiếm 100 %).

3.2. Hoạt tính cố định đạm

Hoạt tính cố định đạm là một trong những tiêu chí quan trọng để lựa chọn vi khuẩn làm phân bón vi sinh. Vi khuẩn cố định đạm có thể tồn tại tự do trong đất, nước và không khí hoặc cộng sinh và nội sinh với các sinh vật khác. Sàng lọc hoạt tính cố định đạm được thực hiện từ 23 dòng vi khuẩn chịu mặn. Các dòng vi khuẩn được cấy trên môi trường Ashby agar không có nguồn đạm. Các dòng vi khuẩn sinh trưởng và phát triển trên môi trường thạch Ashby là các dòng vi khuẩn có hoạt tính cố định đạm. Kết quả sàng lọc các dòng vi khuẩn có hoạt tính cố định đạm cho thấy có 06/23 dòng vi khuẩn có hoạt tính cố định đạm sau 6 ngày nuôi cấy. Các dòng vi khuẩn có hoạt tính cố định đạm được nuôi cấy trên môi trường lỏng Ashby không chứa đạm ở nhiệt độ phòng và lắc ở tốc độ 150 vòng/phút. Sau 2, 4 và 6 ngày nuôi cấy, hoạt tính cố định đạm được đánh giá dựa trên hàm lượng amoni tạo thành trong dung dịch nuôi cấy. Kết quả trình bày ở Hình 2. Hai dòng vi khuẩn chịu mặn X4.1 và X1.1 thu được từ đất vùng rễ xoài có hoạt tính cố định đạm với hàm lượng amoni lần lượt là 3,42 mg/L và 3,29 mg/L sau 6 ngày nuôi cấy. Kết quả của nghiên cứu tương tự so với các dòng vi khuẩn trong nghiên cứu của Nguyễn Anh Huy và Cao Ngọc Diệp (2018) với hàm lượng amoni cao nhất là 3,73 mg/L.

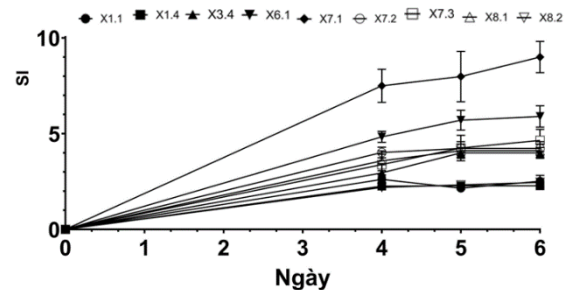


Hình 2. Hàm lượng amoni sinh ra từ các dòng vi khuẩn chọn lọc

3.3. Hoạt tính hòa tan lân

Khả năng hòa tan lân được sàng lọc từ 23 dòng vi khuẩn chịu mặn. Việc sàng lọc cho thấy có 09/23 dòng vi khuẩn chịu mặn khả năng phát triển trên môi

trường thạch NBRIP và kích hoạt chu trình phân hủy CaCO₃. Kết quả được trình bày ở Hình 3. Chín dòng vi khuẩn chịu mặn phân lập từ đất vùng rễ cây xoài có hoạt tính hòa tan lân với chỉ số hòa tan lân (SI) dao động từ 2,16 đến 8,8. Đặc biệt, có một số dòng vi khuẩn chịu mặn có hoạt tính hòa tan lân rất cao như X7.1 (8,8) và X6.1 (5,3) sau 6 ngày nuôi cấy. Theo nghiên cứu của Tripti et al. (2012), dòng vi khuẩn *Bacillus* có chỉ số hòa tan lân cao nhất là 3,1; trong khi dòng vi khuẩn *Pseudomonas* có chỉ số hòa tan lân là 3. Russ and Jena (2013) đã nghiên cứu hoạt tính hòa tan lân của một số dòng vi khuẩn và nhận thấy dòng vi khuẩn *Bacillus* và *Pseudomonas* có chỉ số SI từ 1,22 đến 1,26 và dòng vi khuẩn *Pseudomonas* có hoạt tính hòa tan lân cao nhất với chỉ số SI là 1,93. Sinha and Paul (2013) đã phân lập và tuyển chọn một số dòng vi khuẩn có hoạt tính hòa tan lân, trong đó, dòng vi khuẩn *Bacillus* JPSB16 có chỉ số SI cao nhất (3,14) và dòng vi khuẩn *Pseudomonas* có chỉ số SI cao nhất là 2,83.



Hình 3. Chỉ số hòa tan lân (SI) từ các dòng vi khuẩn chọn lọc

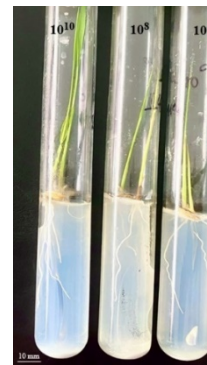
3.4. Hiệu quả sáu dòng vi khuẩn cố định đạm lên khả năng sinh trưởng cây lúa trong điều kiện phòng thí nghiệm

Kết quả đánh giá sáu dòng vi khuẩn kích thích sinh trưởng cây lúa được trồng trong ống nghiệm 15 ngày sau khi cấy được trình bày ở Hình 5. Kết quả phân tích thống kê cả sáu dòng vi khuẩn đều có khả năng kích thích sinh trưởng cây lúa OM 4218 ở giai đoạn 15 ngày tuổi về chiều dài rễ, chiều cao thân, sinh khối cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) khi so với nghiệm thức đối chứng không chủng vi khuẩn. Đối với chỉ tiêu chiều dài rễ: Các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn có chiều dài rễ khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê (p<0,05) so với nghiệm thức đối chứng không bổ sung vi khuẩn. Đối với nghiệm thức có bổ sung, dòng vi khuẩn X4.1 và X8.2 ở nồng độ 10¹⁰ CFU/mL thì chiều dài rễ đạt giá trị cao nhất (5,667 cm) so với các nghiệm thức còn lại và chiều dài rễ thấp nhất (1,133 cm) ở nghiệm thức bổ sung dòng vi khuẩn X1.5 với nồng độ 10⁸ CFU/mL. Kết quả này chứng tỏ khi bổ sung các

dòng vi khuẩn vào hạt lúa đã giúp cây lúa tăng chiều dài rễ so với các nghiệm thức không được bổ sung vi khuẩn. Điều này phù hợp với nghiên cứu của Choudhury et al. (2004), rằng khi bổ sung các dòng vi khuẩn có hoạt tính cố định đạm giúp thúc đẩy sinh trưởng và cải thiện hình thái rễ của cây lúa. Tương tự, ở nghiên cứu của Tien et al. (1979) cũng đã phân lập được các dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm giúp tăng số lượng rễ bên và độ dài rễ chính làm thay đổi hình thái rễ. Đối với chiều cao thân: ở tất cả các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn cho kết quả chiều cao thân khác biệt có ý nghĩa thống kê so với mẫu đối chứng không có vi khuẩn. Dòng vi khuẩn X8.2 khi cộng sinh với hạt lúa cho kết quả về chiều cao thân cao nhất (7,967 cm) và kết quả chiều cao thân thấp nhất là khi được bổ sung với dòng vi khuẩn X1.5 (3,567 cm) ở nồng độ vi khuẩn là 10^8 CFU/mL. Đối với chỉ tiêu về trọng lượng khô: Các nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn khác biệt có ý nghĩa thống kê so với mẫu đối chứng. Các nghiệm thức có chiều dài rễ và chiều cao thân cao thì có trọng lượng khô cũng cao. Hiệu quả mà sáu dòng vi khuẩn cố định đạm tác động lên các chỉ tiêu chiều dài rễ, chiều cao thân và trọng lượng khô của cây lúa trong ống nghiệm 15 ngày không hoàn toàn tương đồng với hàm lượng đạm đo được khi nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng. Cụ thể như dòng vi khuẩn X8.2 khi nuôi trong môi trường dinh dưỡng không bổ sung đạm thì hàm lượng đạm cố định được chỉ ở mức trung bình so với các dòng vi khuẩn còn lại.

Tuy nhiên, khi dòng vi khuẩn X8.2 cộng sinh với cây lúa thì hiệu quả cố định đạm tốt hơn nhiều so với các dòng vi khuẩn còn lại, nguyên nhân là do hoạt tính sinh học của vi khuẩn không chỉ phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy mà còn phụ thuộc vào các yếu tố ngoại cảnh khác. Nhìn chung, các dòng vi khuẩn cố định đạm được tuyển chọn có tác động tích cực đến sự sinh trưởng và phát triển của cây lúa, có tiềm năng ứng dụng cao trong sản xuất. Kết quả này tương đồng với nhiều nghiên cứu trong và ngoài

nước của nhiều tác giả về vai trò quan trọng của vi khuẩn cố định đạm cộng sinh vùng rễ đối với nhiều loại cây trồng. Theo nghiên cứu của Araújo et al. (2013) cho thấy dòng vi khuẩn *Burkholderia vietnamiensis* sau 14 ngày được bổ sung trên cây lúa giúp tăng số lượng rễ lên 57 %, khả năng đâm chồi 33 %, lúa trồng ngoài đồng tiết kiệm được phân đạm 25 – 30 kg/ha. Ở Brazil, nhiều dòng vi khuẩn được phân lập từ rễ, thân và lá của lúa giúp tăng sinh khối cây lên 22 mg/cây (Araújo et al., 2013). Ở Việt Nam, khi kết hợp dòng vi khuẩn nốt rễ và dòng vi khuẩn *Pseudomonas* spp. làm tăng chiều cao cây, tăng hàm lượng protein trong hạt gạo giúp gia tăng năng suất lúa cao sản (Điệp, 2022).



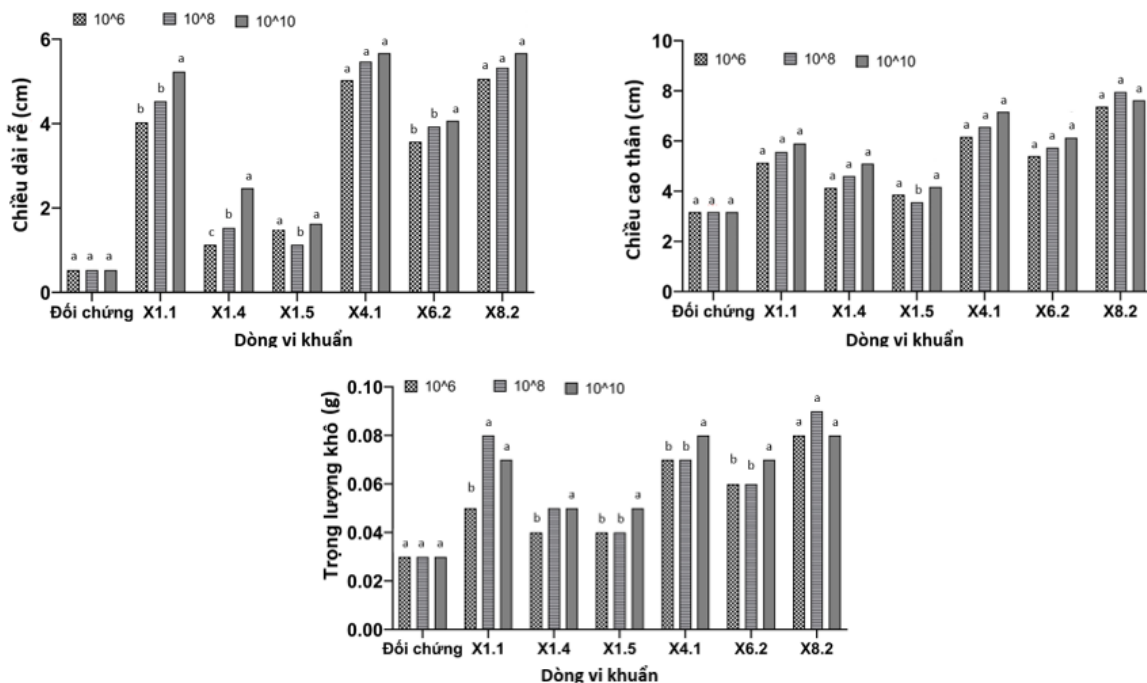
Hình 4. Dòng vi khuẩn cố định đạm X8.2 tuyển chọn khi bổ sung vào hạt lúa trong ống nghiệm

3.5. Định danh khoa học các dòng vi khuẩn có hoạt tính cố định đạm

Khi so sánh trình tự nucleotide của gen 16S-rRNA của hai dòng vi khuẩn đã phân lập với trình tự nucleotide của gen tương ứng ở các dòng vi khuẩn có trên cơ sở dữ liệu, hai dòng vi khuẩn X4.1 và X8.2 lần lượt chi *Pantoea* và *Bacillus*. Mức độ đồng hình của các dòng vi khuẩn đã phân lập với các dòng vi khuẩn đã định danh trên cơ sở dữ liệu NCBI được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Mức độ đồng hình về trình tự gen 16S-rRNA của vi khuẩn phân lập với trình tự gen tương ứng trên cơ sở dữ liệu NCBI

STT	Dòng vi khuẩn	Sự tương đồng			Số đăng ký	Tên khoa học của vi khuẩn phân lập	Số đăng ký
		Số lượng nucleotide	Tỷ lệ tương đồng (%)	Dòng vi khuẩn trên cơ sở dữ liệu			
1	X4.1	1366	100	<i>Pantoea</i> sp. 88A.5	KU362680.1	<i>Pantoea</i> sp. X4.1	PP957433
2	X8.2	1451	100	<i>Bacillus subtilis</i> strain EB56	MT509759.1	<i>Bacillus subtilis</i> X8.2	PP957434



Hình 5. Ảnh hưởng của sáu dòng vi khuẩn lên sinh trưởng lúa giai đoạn 15 ngày sau khi cấy

(trong cùng một dòng vi khuẩn, các giá trị có mẫu tự theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy > 95%)

Nghiên cứu của Tin et al. (2023) thực hiện nhằm khảo sát tác động của các dòng vi khuẩn hòa tan lân *Pantoea* sp. TTB4.1 lên sự sinh trưởng, phát triển của cây bắp trong điều kiện ngoài đồng. Kết quả cho thấy năng suất ở các nghiệm thức tưới vi khuẩn hòa tan lân *Pantoea* sp. TTB4.1 đạt 25,64 tấn/ha (vụ 1) và 27,22 tấn/ha (vụ 2). Các chỉ tiêu về chiều cao cây, chiều dài trái, chiều dài lá, số trái trên cây và hàm lượng chlorophyll trong lá ở các nghiệm thức tưới vi khuẩn cao hơn đối chứng âm. Các chỉ tiêu về hàm lượng đạm, lân hòa tan, mật số vi sinh vật trong đất có sự thay đổi giữa trước khi gieo hạt và sau thu hoạch. Dòng vi khuẩn hòa tan lân *Pantoea* sp. TTB4.1 có tác động lên sự sinh trưởng và phát triển của cây bắp tốt nhất (Tin et al., 2023). Dòng vi khuẩn X8.2 có trình tự gen 16S-rRNA tương đồng 100 % với loài *Bacillus subtilis*, một loài khá phổ biến, phân bố trong đất hoặc nội sinh trong mô thực vật và được ứng dụng rộng rãi trong nông nghiệp và y dược. Trong nông nghiệp, *B. subtilis* được sử dụng dưới dạng các chế phẩm vi sinh chức năng như hòa tan lân, sinh IAA, siderophores và sinh các chất kháng sinh phòng trừ bệnh ở thực vật. Wagi and Ahmed (2019) phân lập được dòng vi khuẩn *B. subtilis* (Mt3b) có khả năng sinh IAA, ACC deaminase, siderophores và hòa tan lân (Wagi and Ahmed, 2019). Koua et al. (2020) đã phân lập được

40 dòng vi khuẩn *B. subtilis* từ các mẫu đất vùng rễ cây dừa có khả năng sinh IAA và hòa tan lân. Mehmood et al. (2021) phân lập được dòng vi khuẩn *B. subtilis* PM32 từ đất trồng khoai tây với các đặc điểm thúc đẩy tăng trưởng thực vật bao gồm khả năng hòa tan kẽm và kali, cố định đạm, sinh IAA, ACC deaminase, siderophores và EPS. Ngoài ra, dòng vi khuẩn PM32 còn có khả năng sinh nhiều enzyme ngoại bào (cellulase, catalase, amylase, protease, pectinase và chitinase).

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tuyển chọn được 23 dòng vi khuẩn chịu mặn phân lập từ tám mẫu đất vùng rễ cây xoài. Sàng lọc được hai dòng vi khuẩn có hoạt tính cố định đạm tốt là X4.1 và X.1 với hàm lượng amoni đạt 3,42 mg/L và 3,29 mg/L sau sáu ngày nuôi cấy. Có hai dòng vi khuẩn có hoạt tính hòa tan lân cao, lần lượt là X.7.1 với chỉ số hòa tan lân (SI) đạt 8,8 và X6.1 với chỉ số hòa tan lân (SI) đạt 5,3 sau sáu ngày nuôi cấy. Đặc biệt, dòng vi khuẩn X1.1 vừa có hoạt tính cố định đạm và hòa tan lân với hàm lượng amoni là 3,29 mg/L và chỉ số hòa tan lân (SI) là 2,67 sau sáu ngày nuôi cấy. Với sáu vi khuẩn đã được xác định có hoạt tính cố định đạm, sau khi bổ sung vào hạt lúa trồng trong ống nghiệm 15 ngày thì tất cả các dòng vi khuẩn đều ảnh hưởng tốt đến các chỉ tiêu

theo dõi về chiều dài rễ, chiều cao thân và trọng lượng khô của cây lúa so với nghiệm thức đối chứng. Trong đó, hai dòng vi khuẩn X4.1 và X8.2 cho kết quả về chiều dài rễ và chiều cao thân tốt nhất, có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất nông

nghiệp. Kết quả giải trình tự 16S-rRNA của hai dòng vi khuẩn có hoạt tính cố định đạm cho thấy X4.1 là vi khuẩn Gram âm và X8.2 là vi khuẩn Gram dương và được định danh lần lượt là *Pantoea* sp. X4.1 và *Bacillus subtilis* X8.2.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdallah, E. M., Maher, G. N., Islam, Ibrahim, A., Khaled, M. D., & Abdelaal, S. (2019). Isolation and selection of highly effective phosphate solubilizing bacterial strains to promote wheat growth in Egyptian calcareous soils. *Bulletin of the National Research Centre*, 43, 203.
- Adriana, A., & Luciane, M. P. P. (2017). Plant growth-promoting bacteria (PGPB): Isolation and screening of PGP activities. *Plant Biology*, 2, 190 – 209. <https://doi.org/10.1002/pb.20054>
- Araújo, A. E. D. S., Baldani, V. L. D., Galisa, P. D.S., Pereira, J.A., Baldani, J. J. (2013), Response of traditional upland rice varieties to inoculation with selected diazotrophic bacteria isolated from rice cropped at the northeast region of Brazil. *Applied Soil Ecology*, 64, 49 – 55.
- Choudhury, A., & Kennedy, I. R. (2004), Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. *Biology and Fertility of Soils*, 39, 219 – 227.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-Gonzalez, C., Caballero-Mellado, J., Aguirre, J. F., Kapulnik, Y., Brener, S., Burdman S., Kadouri, D., Sarig, S., & Okon, Y. (2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28, 871 – 879. <https://doi.org/10.1071/PP01074>
- Điệp, C. N. (2022). Ảnh hưởng của chủng vi khuẩn nốt rễ và vi khuẩn *Pseudomonas* spp. trên lúa cao sản trồng trên đất phù sa Cần Thơ. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 3, 1 – 7. <https://ctujsvn.ctu.edu.vn/index.php/ctujsvn/article/view/356>
- Điệp, C. N., & Hiệp, N. H. (2008). Giáo trình Thực tập vi sinh đại cương. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ, trang 32.
- Fo, T. S., Jui, H. Y., Chien, S. L., Wen, C. C., & Yi, T. C. (2019). Screening of rice endophytic biofertilizers with fungicide tolerance and plant growth-promoting characteristics. *Sustainability*, 11, 1133. <https://doi.org/10.3390/su11041133>
- Frommel, M. I., Nowak, J., & Lazarovits, G. (1993). Treatment of potato tubers with a growth promoting *Pseudomonas* sp.: Plant growth responses and bacterium distribution in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 150, 51 – 60.
- Hào, Đ. M., & Thư, P. T. (2012). Một số kết quả nghiên cứu về vi sinh vật tại vùng ven biển Hải Phòng. *Vietnam Journal of Marine Science and Technology*, 10(1), 51 – 65. <https://doi.org/10.15625/1859-3097/10/1/906>
- Helge, L. (1986). Halophilic and halotolerant microorganisms-an overview and historical perspective. *FEMS Microbiology Reviews*, 39, 3 – 7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01835.x>
- Hiệp, N. H., & Điệp, C.N. (2009). Giáo trình Vi sinh vật học. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ.
- Hoben, H. J., & Somasegaran, P. (1982). Comparison of pour, spread and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 1246 – 1247. <https://doi.org/10.1128/aem.44.5.1246-1247.1982>
- Huy, N. A., & Hiệp, N. N. (2018). Phân lập và nhận diện các dòng vi khuẩn chịu mặn có khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA từ đất sản xuất lúa - tôm ở Bạc Liêu, Sóc Trăng và Kiên Giang. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 54(1B), 7 – 12. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2018.002>
- Kennedy, A. C. (1999). Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 74, 65 – 76. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(99\)00030-4](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(99)00030-4)
- Koua, H. S., N'golo, D. C., Alloue-Boraud, W. A., Konan, F., & Dje, K. M. (2020). *Bacillus subtilis* strains isolated from Cocoa Trees (*Theobroma cacao* L.) rhizosphere for their use as potential plant growth promoting rhizobacteria in Côte d'Ivoire. *Current Microbiology*, 77(9), 2258 – 2264. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02027-x>
- Mehmood, S., Muneer, A. M., Tahir, M., Javed, M. T. Mahmood, T. Afridi, M. S., Pakar, N. P., Abbasi, H. A., Munis, M. F. H., & Chaudhary, H. J. (2021). Deciphering distinct biological control and growth promoting potential of multi-stress tolerant *Bacillus subtilis* PM32 for potato stem canker. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(9), 2101 – 2114. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-01067-2>
- Như, V. T. P., & Điệp, C. N. (2014). Ảnh hưởng của vi sinh vật *Azospirillum amazonense* và *Burkholderia kururiensis* lên sự sinh trưởng và năng suất của lúa cao sản (Giống lúa Ma Lâm

- 213) trồng trên đất thịt pha cát ở thành phố Tuy Hòa, tỉnh Phú Yên. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 33b, 85 – 96.
- Okon, Y., & Labandera-Gonzalez, A. C. (1994). Agonomic application of *Azospirillum* an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol Biochem*, 26, 1591 – 1601. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90311-5](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(94)90311-5)
- Prescott, L., Harley, J., & Klein, D. A. (1999). *Microbiology*. Boston: Mc-Graw-Hill. England.
- Rath, C. C., & Jena, S. K. (2013). Optimization of culture on conditions of phosphate solubilizing activity of bacterial sp. isolated from simlipal biosphere reserve in solid – state cultivation by response surface methodology. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(5), 47 – 59.
- Saharan, B. S., & Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. *Life Sciences and Medicine Research*, 21, 130.
- Shiying, Z., Cong, F., Yongxia, W., Yunsheng, X., Wei, X., & Xiaolong, Cui. (2018). Salt-tolerant and plant-growth-promoting bacteria isolated from high-yield paddy soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 64, 968 – 978. <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0571>
- Shweta, T., Pratibha, S., Rameshwar, T., Kamlesh, K. M., Mahesh, Y., Dhananjaya, P. S., & Dilip, K. A. (2011). Salt-tolerant rhizobacteria-mediated induced tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) and chemical diversity in rhizosphere enhance plant growth. *Biology and Fertility of Soils*, 47, 907.
- Silke, R., Philipp, F., & Katja, W. (2013). Properties of the halophyte microbiome and their implications for plant salt tolerance. *Functional Plant Biology*, 40, 940 – 951. <https://doi.org/10.1071/FP12355>
- Sinha, S. N., & Paul, D. (2013). Phosphate solubilizing activity of some bacterial strains isolated from jute mill effluent exposed water of river Ganga. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, 3(3), 39 – 45.
- Tien, T. M., Gaskins, M. H., & Hubbell, D. H. (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and environmental microbiology*, 37(5), 1016 – 1024. <https://doi.org/10.1128/aem.37.5.1016-1024.1979>
- Tin, N. C., Thai, N. V., Thu, T. T. A., Toan, T. V. K., & Giang, T. T. (2023). Efficiency of nitrogen-fixing bacteria *Bradyrhizobium* sp. and phosphate-solubilizing bacteria *Pseudomonas* sp., *Pantoea* sp. on the growth of maize (*Zea mays* L.). *TNU Journal of Science and Technology*, 228(05), 455 – 462. <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.7220>
- Tripti, Vipin, K., & Anshumali. (2012). Phosphate solubilizing activity of some bacterial strains isolated from chemical pesticide exposed agriculture soil. *International Journal of Engineering Research and Development*, 3(9), 1 – 6.
- Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M., Cortes, A. E., & Bashan, Y. (2000). Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semi arid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*, 30, 460 – 468. <http://dx.doi.org/10.1007/s003740050024>
- Wagi, S., & Ahmed, A. (2019). *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. *Peer J*, 7, 7258. <https://doi.org/10.7717/peerj.7258>
- Yuan, Q., Irina, S. D., Xueyu, P., & Zhilin, Y. (2016). Microbially mediated plant salt tolerance and microbiome-based solutions for saline agriculture. *Biotechnology Advances*, 34, 1245 – 1259. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.005>