



DOI:10.22144/ctujos.2025.118

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN CHỊU MẶN TỪ NÓT SÀN MỘT SỐ CÂY HỌ ĐẬU Ở KHU VỰC ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Nguyễn Khởi Nghĩa^{1*}, Đỗ Thành Luân¹, Nguyễn Thị Kiều Oanh¹, Kim Thị Hồng Hoa² và Đặng Thị Huyền Trang³

¹Trường Nông nghiệp, Đại học Cần Thơ, Việt Nam

²Cựu học viên cao học Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Đại học Cần Thơ, Việt Nam

³Cựu sinh viên Trường Nông nghiệp, Đại học Cần Thơ, Việt Nam

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): nknghia@ctu.edu.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 23/12/2024

Sửa bài (Revised): 26/01/2025

Duyệt đăng (Accepted): 27/04/2025

Title: Isolation and selection of salt tolerant bacteria from the nodules of some leguminous plants in the Mekong Delta

Author(s): Nguyen Khoi Nghia^{1*}, Do Thanh Luan¹, Nguyen Thi Kieu Oanh¹, Kim Thi Hong Hoa² and Dang Thi Huyen Trang³

Affiliation(s): ¹College of Agriculture, Can Tho University, Viet Nam; ²Former master student of Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University, Viet Nam; ³Former undergraduate student of Soil Science, College of Agriculture, Can Tho University, Viet Nam

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn chịu mặn từ nốt sần của Đậu hoang bông đỏ (*Macroptilium lathyroides*), Đậu hoang bông tím (*Clitoria marianna*), Điền thanh (*Sesbania sesban*), Cỏ lá đậu (*Arachis pintoi*) và Điền ma Ấn (*Aeschynomene indica*). Môi trường YEMA bổ sung 1% NaCl được dùng để phân lập vi khuẩn. Kết quả cho thấy, 10 dòng vi khuẩn đã được phân lập thông qua đặc tính nhận dạng gồm: Gram âm, hình que, di động, hiếu khí, không hình thành bào tử và không bắt màu trên môi trường YEMA có bổ sung 0,025% Congo Red. Ngoài ra, chúng có khả năng chịu mặn trong môi trường nuôi cấy lỏng có nồng độ NaCl dao động từ 2,5% đến 10%. Trong đó ba dòng LD6, TL3 và BV8 thể hiện khả năng chịu mặn tốt lên đến 10% NaCl. Dựa vào kết quả giải trình tự đoạn gen 16S rRNA, dòng TL3 được định danh với tên *Rhizobium* sp. TL3, trong khi LD6 và BV8 lần lượt là *Enterobacter* sp. LD6 và *Enterobacter* sp. BV8.

Từ khóa: Cây họ đậu, chịu mặn, *Enterobacter* sp., *Rhizobium* sp., vi khuẩn cố định đạm

ABSTRACT

The study aimed to isolate and select salt tolerant bacteria from the nodules of leguminous plants such as *Macroptilium lathyroides*, *Clitoria marianna*, *Sesbania sesban*, *Arachis pintoi* and *Aeschynomene indica*. YEMA medium supplemented with 1% NaCl was used to isolate bacteria. As a result, 10 strains were isolated through identification characteristics, including Gram-negative, rod-shaped, motile, aerobic, non-spore-forming, and non-staining on YEMA medium supplemented with 0.025% Congo Red. In addition, they are resistant to salt in liquid culture medium with NaCl concentrations ranging from 2.5% to 10%. Among them, three strains LD6, TL3, and BV8 showed good salt tolerance up to 10% NaCl. Based on the results of 16S rDNA gene sequencing, strain TL3 was identified as *Rhizobium* sp. TL3, while LD6 and BV8 were characterised as *Enterobacter* sp. LD6 and *Enterobacter* sp. BV8, respectively.

Keywords: *Enterobacter* sp., legume, nitrogen fixing bacteria, *Rhizobium* sp., salt tolerant bacteria

1. GIỚI THIỆU

Đạm (N) đóng vai trò quan trọng trong việc tổng hợp protein, enzyme và các thành phần thiết yếu khác của tế bào (Novoa & Loomis, 1981). Cây trồng có thể hấp thụ đạm thông qua phân bón hóa học và tiến trình cố định đạm sinh học. Trong đó, cố định đạm sinh học được xem là giải pháp hiệu quả và thân thiện với môi trường. Trong quá trình, các vi sinh vật được sử dụng, đặc biệt là vi khuẩn cộng sinh như *Rhizobium* sp. (Jimenez et al., 2019; Suzaki et al., 2019). *Rhizobium* sp. hoạt động như tác nhân cố định đạm bằng cách xâm nhiễm vào rễ cây họ đậu. Ngoài ra, một số kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy *Enterobacter* sp. là nhóm vi khuẩn liên kết nốt sần cây họ đậu, nhóm này có thể hoạt động như vi khuẩn thúc đẩy tăng trưởng thực vật (PGP), tăng cường sự phát triển của thực vật thông qua nhiều cơ chế trực tiếp và gián tiếp như cố định đạm, hòa tan phosphate, sản xuất siderophore và phytohormone (Velázquez et al., 2017; Ríos-Ruiz et al., 2019; Youseif et al., 2021). Nghiên cứu của Sánchez-Cruz et al. (2019) cũng cho thấy chủng vi khuẩn *Enterobacter* sp. NOD1 được phân lập từ các nốt sần *Mimosa pudica* L. ở Chiapas (Mexico) chúng giúp cố định đạm, tổng hợp axit indoleacetic, siderophore và hòa tan phosphate. Tương tự, nghiên cứu của Ghosh et al. (2015) 3 chủng vi khuẩn sản xuất IAA (A3CK, A7CK và A27CK) cũng được phân lập từ nốt sần rễ của cây họ đậu *A. precatorius* L. và được xác định là *Enterobacter* spp. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Li et al. (2016) cho thấy chủng vi khuẩn *Enterobacter* thích sự phát triển của thực vật trong điều kiện mặn.

Cây họ đậu là cây trồng quan trọng thứ hai trên thế giới vì cung cấp nguồn protein quan trọng cho chế độ ăn của con người và động vật, chúng được sử dụng rộng rãi làm phân xanh, thức ăn chăn nuôi và các loại khác (Plá & Cobos-Porras, 2015). Trong chăn nuôi, cây họ đậu cung cấp hàm lượng protein cao, vitamin và khoáng chất thiết yếu, hỗ trợ sự phát triển và sinh trưởng của động vật (Suryani et al., 2023). Gần đây, nhiều kết quả nghiên cứu đã cho thấy việc luân canh và xen canh cây họ đậu nhằm gia tăng độ che phủ đất và bảo vệ hệ sinh thái. Vì vậy, một lượng lớn sinh khối cây họ đậu được sử dụng để bổ sung vào chế độ ăn của gia súc (Dewhurst et al., 2009; Kleen et al., 2011). Hơn nữa, đây là một trong những chiến lược để giảm thiểu phát thải khí nhà kính từ chăn nuôi gia súc trên đồng cỏ (Soussana & Lemairae, 2014). Theo tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên hợp quốc (Food and Agriculture Organization of the United Nations

World Health Organization, (2018)) liệt kê có khoảng 169 loài họ đậu đang được sử dụng làm thức ăn chăn nuôi và khoảng 20 triệu ha diện tích đất đang được canh tác độc canh cây họ đậu làm thức ăn chăn nuôi (Graham & Vance, 2003). Bên cạnh đó, vi khuẩn *Rhizobium* giữ vai trò thiết yếu trong việc cung cấp nitơ cho hệ sinh thái. Lượng nitơ cố định trong đất xuất phát từ mối quan hệ cộng sinh chặt chẽ giữa vi khuẩn và cây ký chủ. Sự cộng sinh này không chỉ góp phần nâng cao năng suất cây trồng mà còn hỗ trợ cải thiện môi trường (Vincent, 1970; Somasegaran & Hoben, 2012). Một số điều kiện stress của môi trường có thể ảnh hưởng đến quá trình cố định đạm ở thực vật bao gồm: độ mặn, áp lực nước, độ pH của đất, nhiệt độ và kim loại nặng (Kucuk & Kivanc, 2008). Mặc dù vi khuẩn *Rhizobium* có khả năng chịu mặn tốt nhưng chúng lại cho thấy sự thay đổi rõ rệt về khả năng chịu mặn (Yelton et al., 1983). Một số vi khuẩn cộng sinh như *R. meliloti*, chịu được từ 300 đến 700 mM NaCl (Mohammad et al., 1991; Embalomatis et al., 1994). Các chủng *R. leguminosarum* có khả năng chịu được mặn ở nồng độ lên đến 350 mM NaCl (Breedveld et al., 1991). Các chủng *Rhizobium* từ cây họ đậu *Vigna unguiculata* có khả năng chịu đựng NaCl lên đến 5,5%, tương đương với khoảng 450 mM NaCl (Mpepereki et al., 1997).

Các chủng *Rhizobium* spp. chịu mặn trong nông nghiệp đã được thử nghiệm trong một số nghiên cứu, đặc biệt là ở các vùng đất bị nhiễm mặn. Việc ứng dụng các chủng vi khuẩn này có thể giúp cây trồng họ đậu sinh trưởng và phát triển tốt hơn trong môi trường khắc nghiệt, từ đó giúp duy trì năng suất và cải thiện sự phì nhiêu của đất. Trong một nghiên cứu về các chủng *Rhizobium* chịu mặn, ba chủng Mg1, Mg2 và Mg3 đã cho thấy khả năng trong việc giảm thiểu tác động của muối đối với cây đậu xanh. Khi được chủng vi khuẩn *Rhizobium*, các cây chịu mặn đã có sự tăng trưởng vượt trội so với nhóm không chủng. Đặc biệt, chủng Mg3 phát huy hiệu quả cao nhất ở mức độ mặn 6 dS m⁻¹ giúp tăng chiều cao cây, trọng lượng tươi của thân, rễ, trọng lượng tươi của quả, số quả trên mỗi cây và hàm lượng N trong hạt (Ali et al., 2023). Tương tự, nghiên cứu của Mondal et al. (2017) cho thấy *Rhizobium* sp. làm tăng khả năng cố định N và hình thành nốt sần, từ đó dẫn đến năng suất hạt đậu xanh cao hơn trong điều kiện mặn so với nghiệm thức đối chứng (Ahmad et al., 2012; Ali et al., 2017). Tuy nhiên, việc chủng *Rhizobium* sp. giúp giảm đáng kể hàm lượng proline do cây hấp thụ nhiều K⁺ và lân hơn so với Na⁺, do đó, tỷ lệ K⁺/Na⁺ trong các bộ phận của cây giảm xuống, giúp giảm tác động tiêu cực của độ

mặn và giảm tích lũy proline (Ahmad et al., 2012; Iqbal et al., 2016; Ali et al., 2017). Tuy nhiên, các nghiên cứu về việc phân lập, tuyển chọn và ứng dụng vi khuẩn chịu mặn từ nốt sần của cây họ đậu ở Việt Nam mà đặc biệt là ở khu vực đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) còn rất hạn chế. Do đó, việc phân lập các chủng vi khuẩn chịu mặn từ nốt sần của một số loài cây họ đậu tại ĐBSCL là rất cần thiết và có ý nghĩa rất lớn trong việc hỗ trợ giúp cây họ đậu trồng trên đất nhiễm mặn có thể sinh trưởng, phát triển tốt và giúp tăng năng suất.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thu mẫu

Mười bốn mẫu nốt sần của một số cây họ đậu ở khu vực ĐBSCL gồm cả đất bị nhiễm mặn và không nhiễm mặn được thu thập tại các tỉnh như: tỉnh Sóc Trăng, tỉnh Kiên Giang, tỉnh Hậu Giang và TP. Cần Thơ. Thông tin chi tiết được trình bày trong Bảng 1. Các mẫu rễ và nốt sần rễ của cây họ đậu được thu từ các loài bao gồm đậu hoang bông đỏ (*Phaseolus lathyroides*), đậu hoang bông tím (*Neustanthus phaseoloides*), điền ma ấn (*Aeschynomene indica*), cỏ lá đậu (*Arachis pintoi*) và cây điền thanh (*Sesbania senban*).

Bảng 1. Thông tin chi tiết vị trí thu mẫu và hình thái thân lá, nốt sần rễ của nhóm cây họ đậu được thu

Tỉnh	Vị trí thu mẫu	Tọa độ	Các loài đã thu được	Hình thái thân, lá	Hình thái rễ và nốt sần
	Huyện Cù Lao Dung	9.610881, 106.200161	Đậu hoang bông tím (<i>Clitoria Marianna</i>)		
	Huyện Long Phú	9.601961, 106.154962			
Sóc Trăng	Huyện Vĩnh Châu	9.307802, 105.984926	Đậu hoang bông đỏ (<i>Macroptilum lathyroides</i>)		
		9.306935, 105.985088 9.310144, 106.004623 9.311814, 106.010832 9.316698, 106.024968			
Kiên Giang	TP. Hà Tiên	10.389167, 104.507222	Điền Thanh (<i>Sesbania sesban</i>)		
Hậu Giang	Huyện Phụng Hiệp	9.821667, 105.691667	Điền ma Ấn (<i>Aeschynomene indica</i>)		
			Cỏ lá đậu (<i>Arachis pintoi</i>)		
Cần Thơ	Huyện Phong Điền	9.976667, 105.614167	Đậu hoang bông tím (<i>Clitoria Marianna</i>)		

Tỉnh	Vị trí thu mẫu	Tọa độ	Các loài đã thu được	Hình thái thân, lá	Hình thái rễ và nốt sần
			Diền Thanh (<i>Sesbania sesban</i>)		

2.2. Phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn từ nốt sần cây họ đậu

Việc phân lập vi khuẩn từ nốt sần cây họ đậu được thực hiện theo phương pháp của Ondieki et al. (2017). Sau khi thu thập về phòng thí nghiệm, nốt sần cây họ đậu được rửa sạch với nước để loại bỏ bùn đất, tiếp theo, được khử trùng bề mặt lần lượt bằng dung dịch NaClO 1% trong 1 phút, ethanol 70% trong 30 giây và được rửa lại 4 lần bằng nước cất tiệt trùng (Dao et al., 2021). Sau khi hoàn tất khử trùng, nốt sần được nghiền nhỏ trong cối bằng chày sứ. Tiếp đó, mẫu nghiền (10 g) được chuyển vào chai thủy tinh 250 mL chứa 90 mL nước khử khoáng tiệt trùng. Mẫu sau đó được lắc trên máy lắc ngang với vận tốc 150 vòng/phút trong 1 giờ. Sau khi lắc, dung dịch mẫu được pha loãng với hệ số 10. dịch trích vi khuẩn từ các nồng độ pha loãng (50 µL) được hút và trải đều lên bề mặt môi trường YEMA agar bổ sung 1% NaCl. Công thức môi trường YEMA agar với 1% NaCl cho 1 lít dung dịch bao gồm: 1 g yeast extract, 10 g mannitol, 0,5 g K₂HPO₄, 0,2 g MgSO₄, 10 g NaCl và 15 g agar. Các đĩa petri chứa mẫu được bảo quản trong tủ ủ ở nhiệt độ 30°C trong 2 ngày. Sự phát triển của khuẩn lạc vi khuẩn trên bề mặt đĩa môi trường được quan sát. Các khuẩn lạc có hình dạng tròn, lồi, bóng nhày và màu trắng đục được tuyển chọn, tách rỗng và tinh sạch trên môi trường nuôi YEMA có bổ sung 1% NaCl trong 5 lần liên tục để đạt các khuẩn lạc thuần. Các khuẩn lạc này được mô tả hình thái khuẩn lạc như: hình dạng, màu sắc và kích thước.

Dựa vào đặc điểm nhận dạng vi khuẩn *Rhizobium* sp. gồm: (1) Gram âm, que ngắn và (2) khó bắt màu với thuốc nhuộm Congo red vì vậy các dòng vi khuẩn đã phân lập được được tiến hành kiểm tra Gram vi khuẩn, quan sát hình dạng tế bào và kiểm tra khả năng bắt màu trên môi trường YEMA có bổ sung thuốc nhuộm Congo red (Hahn et al., 1966).

Việc quan sát và mô tả hình thái tế bào vi khuẩn được thực hiện theo Somasegaran and Hoben (2012). Tế bào vi khuẩn được nhuộm với dung dịch Fuchsin acid 0,5% sau đó được quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại 1000 lần. Gram của các

dòng vi khuẩn phân lập được xác định dựa vào khả năng tạo nhầy giữa sinh khối vi khuẩn và dung dịch KOH 3%. Dưới tác dụng của dung dịch kiềm loãng, vách tế bào của vi khuẩn Gram âm bị phá vỡ làm giải phóng DNA và tạo dịch nhầy khi phản ứng với dung dịch KOH (Halebian et al., 1981).

Ngoài ra, các chủng vi khuẩn *Rhizobium* sp. có thể được phân biệt với các loài vi sinh vật khác nhờ vào khả năng không hấp thụ thuốc nhuộm Congo Red. Thí nghiệm được thực hiện bằng cách ria các dòng vi khuẩn đã phân lập được lên môi trường YEMA có bổ sung 0,025% Congo Red và 1% NaCl, sau đó ủ trong tối 3 ngày. Sau thời gian này, màu sắc của các khuẩn lạc được kiểm tra. Các dòng vi khuẩn nào có khuẩn lạc không bắt màu hồng hoặc chỉ hơi đỏ hồng được nhận dạng như là vi khuẩn *Rhizobium* sp. trong khi các chủng vi khuẩn có khả năng hấp thụ mạnh thuốc nhuộm Congo đỏ thì không được xem như là vi khuẩn *Rhizobium* sp. (Ondieki et al., 2017).

2.3. Đánh giá khả năng chịu mặn của các dòng vi khuẩn tuyển chọn

2.3.1. Chuẩn bị nguồn vi khuẩn

Các dòng vi khuẩn có đặc điểm nhận dạng gồm: Gram âm, hình que, di động, hiếu khí, không hình thành bào tử và không bắt màu trên môi trường YEMA có bổ sung 0,025% Congo Red được tuyển chọn cho thí nghiệm đánh giá khả năng chịu mặn trong môi trường nuôi cấy lỏng. Sau đó, các dòng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi cấy trong bình tam giác 100 mL, chứa 30 mL môi trường dinh dưỡng YEMA lỏng bổ sung 1% NaCl. Các bình tam giác chứa vi khuẩn được ủ trên máy lắc với tốc độ 110 vòng/phút trong thời gian 3 ngày ở điều kiện phòng thí nghiệm. Sau đó, dung dịch vi khuẩn được điều chỉnh độ đục bằng nước cất vô trùng, sử dụng máy đo quang phổ (Spectrometer Thermo Scientific, Multiskan Spectrum), đạt giá trị OD_{600nm} = 0,7.

2.3.2. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện với các nồng độ muối NaCl là 0%, 2,5%, 5%, 7% và 10% cho mỗi dòng vi khuẩn được tuyển chọn. Dung dịch vi khuẩn được hút 0,1 mL có OD_{600nm} = 0,7 cho vào bình tam giác 100 mL, chứa sẵn 50 mL môi trường YEMA lỏng

đã tiết trùng ở các nồng độ muối khác nhau. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 6 nghiệm thức và 3 lần lặp lại tương ứng với 3 bình tam giác cho mỗi dòng vi khuẩn. Các nghiệm thức (NT) được liệt kê như sau:

NT1: Đối chứng: Môi trường YEMA (YEMA) không chủng vi khuẩn

NT2: Dòng VK tuyển chọn + YEMA bổ sung 0% NaCl

NT3: Dòng VK tuyển chọn + YEMA bổ sung 2,5% NaCl

NT4: Dòng VK tuyển chọn + YEMA bổ sung 5% NaCl

NT5: Dòng VK tuyển chọn + YEMA bổ sung 7,5% NaCl

NT6: Dòng VK tuyển chọn + YEMA bổ sung 10% NaCl

Các bình tam giác chứa mẫu được đặt trên máy lắc với tốc độ 100 vòng/phút, ở điều kiện phòng thí nghiệm. Mẫu dịch huyền phù vi khuẩn 2 mL được thu vào các ngày 1, 3, 5 và 7 để đo mật độ quang của của môi trường nuôi cấy, thể hiện cho sự phát triển về mật số của vi khuẩn trên máy đo quang phổ ở bước sóng 600 nm.

2.4. Định danh dòng vi khuẩn tuyển chọn có khả năng chịu mặn tốt nhất

Dòng vi khuẩn có khả năng chịu mặn tốt nhất được tuyển chọn từ mục 2.3 được sử dụng để ly trích DNA. Sau đó, DNA được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3') và 1492R (5'-TACGGTTACCTGTTCAGACT-3'), giúp khuếch đại vùng gen 16S rRNA với sản phẩm gen có kích thước 1500 bp (Zhang et al., 2020).

Quá trình PCR được thực hiện bằng máy PCR GeneAmp® PCR System 9700 với chu kỳ nhiệt như

sau: ban đầu, DNA được biến tính ở 95°C trong 5 phút. Tiếp theo, phản ứng trải qua 35 chu kỳ gồm các bước: biến tính ở 95°C trong 30 giây, gắn cặp mồi ở 55°C trong 30 giây và kéo dài ở 72°C trong 1 phút 30 giây. Sau khi hoàn thành, đoạn gen khuếch đại được duy trì ở 72°C trong 10 phút và mẫu được bảo quản ở 4°C. Sản phẩm PCR sau đó được gửi giải trình tự tại Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa bằng hệ thống giải trình tự động. Kết quả trình tự DNA được so sánh với các gen tương ứng trên cơ sở dữ liệu NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Đồng thời, các đặc điểm về hình thái khuẩn lạc và tế bào cũng được kết hợp để xác định mức độ loài của dòng vi khuẩn.

2.5. Phân tích số liệu

Số liệu được tổng hợp và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel. Việc thống kê, phân tích và so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức được kiểm định ANOVA theo phương pháp Tukey's bằng phần mềm Minitab version 16.2.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập vi khuẩn từ nốt sần rễ một số cây họ đậu

Từ 14 mẫu nốt sần rễ cây họ đậu thu được ở 4 tỉnh Sóc Trăng, Kiên Giang, Hậu Giang và Cần Thơ đã phân lập được 19 dòng vi khuẩn trên môi trường YEMA có bổ sung 1% NaCl (Bảng 2). Cụ thể, từ các mẫu ở Sóc Trăng, 3 dòng vi khuẩn được phân lập chiếm 15,8% tổng số dòng phân lập. Từ các mẫu nốt sần cây đậu thu ở Tp. Cần Thơ, 4 dòng vi khuẩn đã được phân lập, chiếm 21,1% trong khi ở Hậu Giang các mẫu nốt sần thu thập từ các cây họ đậu phân lập được 7 dòng vi khuẩn, chiếm 36,8%. Cuối cùng, các mẫu nốt sần từ các cây họ đậu được thu thập ở tỉnh Kiên Giang đã phân lập được 5 dòng vi khuẩn, tương ứng với 26,3%.

Bảng 2. Tổng hợp các dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường YEMA có bổ sung 1% NaCl

Tỉnh	Loại cây	Số lượng	Kí hiệu dòng vi khuẩn	Tỷ lệ (%)
Sóc Trăng	Đậu hoang bông đỏ	2	LP7, LP8	15,8
	Đậu hoang bông tím	1	BTVC3	
Cần Thơ	Đậu hoang bông tím	3	TL2, TL3, TL4	21,1
	Điền thanh	1	ĐT6	
Hậu Giang	Cỏ lá đậu	3	LĐ2, LĐ5, LĐ6	36,8
	Điền ma Ấn	4	BV4, BV5, BV7, BV8	
Kiên Giang	Điền thanh	5	ĐT3, ĐT9, KG11, KG13, KG14	26,3

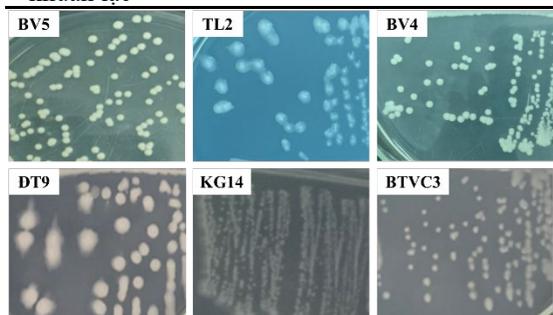
Kết quả khảo sát hình thái khuẩn lạc 19 dòng vi khuẩn phân lập được trình bày ở Bảng 3 và Hình 2

cho thấy cả 19 dòng vi khuẩn này đều có khuẩn lạc dạng tròn, chiếm tỷ lệ 100%. Màu sắc của khuẩn lạc rất đa dạng, bao gồm các màu hơi đục, trắng trong

và đục. Độ nổi của khuẩn lạc được ghi nhận ở hai dạng: phẳng và lồi với kích thước khuẩn lạc dao động trong khoảng từ 2 đến 6 mm. Ngoài ra, kết quả khảo sát hình thái tế bào cho thấy tất cả 19 dòng vi khuẩn này đều có hình que và là vi khuẩn Gram âm.

Bảng 3. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc 19 dòng vi khuẩn phân lập từ nốt sần cây họ đậu

Nhóm	Đặc điểm	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Hình dạng	Tròn	19	100
Màu sắc	Hơi đục	5	26,3
	Trắng trong không nhân	1	5,26
	Trắng trong có nhân	2	10,5
	Đục có nhân	1	5,26
	Đục không nhân	10	52,6
Dạng rìa	Nguyên	19	100
Độ nổi	Lồi	19	100
Kết cấu	Âm	15	78,9
	Nhảy	4	21,0
Bề mặt khuẩn lạc	Bóng trơn	19	100



Hình 2. Hình thái khuẩn lạc đại diện của một số dòng vi khuẩn phân lập từ nốt sần cây họ đậu

3.2. Tuyển chọn các dòng vi khuẩn phân lập từ nốt sần cây họ đậu

Kết quả cho thấy, trong số 19 dòng vi khuẩn phân lập, có 10 dòng không bắt màu hoặc bắt màu rất yếu với thuốc thử Congo red gồm các dòng có ký hiệu: TL2, TL3, TL4, BV4, BV5, BV7, BV8, LĐ2, LĐ5 và LĐ6. Trong đó, ba dòng vi khuẩn ký hiệu TL2, TL3 và TL4 được phân lập từ cây đậu hoang bông tím tại Cần Thơ chiếm tỷ lệ 30%, 4 dòng vi khuẩn có ký hiệu BV4, BV5, BV7, BV8 được phân lập từ cây điền ma ấn (40%) và 3 dòng còn lại LĐ2, LĐ5 và LĐ6 được phân lập từ cây cỏ lá đậu (30%) cả 2 loại này đều được thu thập tại Hậu Giang. Dựa trên kết quả kiểm tra về sinh hóa này, 10 dòng vi khuẩn này được xem như là 10 dòng vi khuẩn

Rhizobium spp. được phân lập từ nốt sần của nhiều cây họ đậu thu thập từ nhiều khu vực khác nhau.

Điều này có thể cho thấy, cây điền ma ấn, cây đậu hoang bông tím và cây cỏ lá đậu thu tại Hậu Giang và Cần Thơ thuộc cây họ đậu có khả năng cộng sinh mạnh với nhiều loài vi khuẩn nhờ hệ rễ phát triển rộng và khỏe, tạo điều kiện thuận lợi cho vi khuẩn xâm nhập. Cả 3 loại này đều thuộc nhóm cây họ đậu mọc dại nên có khả năng thích nghi cao với môi trường khắc nghiệt và có hệ rễ phát triển tốt. Đồng thời đất tại khu vực tự nhiên nơi các cây đậu hoang phát triển thường ít chịu tác động của phân bón hóa học hoặc thuốc bảo vệ thực vật. Điều này giúp hệ vi sinh vật trong đất phong phú hơn, bao gồm cả *Rhizobium* sp. (Zahran, 2001). Bên cạnh đó, vùng đất phù sa ở Cần Thơ và Hậu Giang được bồi đắp thường xuyên bởi hệ thống sông ngòi, đặc biệt là sông Mekong, có hàm lượng chất hữu cơ cao và độ pH trung tính, rất thích hợp cho sự phát triển của vi sinh vật đất, bao gồm vi khuẩn *Rhizobium*. Kết quả các nghiên cứu trước đây đã cho thấy sự khác biệt đáng kể về số lượng tế bào vi khuẩn cộng sinh ở các vùng khác nhau, cho thấy ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến sự phân bố và số lượng của quần thể vi khuẩn cộng sinh (Herridge et al., 2008). Hơn nữa, sự thay đổi về mật số nhóm vi khuẩn cộng sinh ở các vùng sinh thái nông nghiệp khác nhau có liên quan đến đặc điểm đất và điều kiện khí hậu (Jaiswal et al., 2016). Mỗi quan hệ giữa độ pH và đặc tính của đất ảnh hưởng cũng ảnh hưởng đáng kể đến phân lập các dòng *Rhizobium* sp. từ các loại cây họ đậu khác nhau (Ohyama, 2017).

3.3. Khả năng chịu mặn của các dòng vi khuẩn tuyển chọn nội sinh ở nốt sần cây họ đậu

3.3.1. Khả năng chịu mặn của các dòng vi khuẩn tuyển chọn ở thời điểm 1 ngày sau khi bố trí thí nghiệm

Kết quả khảo sát khả năng chịu mặn của 10 dòng vi khuẩn tuyển chọn cho thấy có sự khác biệt về sinh trưởng của các dòng trong môi trường có nồng độ muối NaCl tăng dần từ 0% đến 10% NaCl, ở thời điểm 1 ngày sau khi bố trí thí nghiệm (Bảng 4). Nhìn chung, nồng độ NaCl càng tăng trong môi trường nuôi cây lỏng thì mật độ quang của vi khuẩn càng giảm. Cụ thể, ở nồng độ 0% NaCl, tất cả các dòng vi khuẩn tuyển chọn đều phát triển mạnh, trong đó dòng vi khuẩn TL2, BV4 và BV5 có giá trị OD đạt cao nhất lần lượt là 1,73, 1,84 và 1,80 cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với các dòng còn lại, điều này cho thấy khả năng sinh trưởng tối ưu của các dòng vi khuẩn tuyển chọn khi được

nuôi cấy ở điều kiện không bổ sung muối NaCl. Khi nồng độ NaCl tăng lên 2,5% sinh trưởng của các dòng vi khuẩn khảo sát có xu hướng giảm, với giá trị OD dao động từ 0,50 đến 1,32. Tuy nhiên, các dòng vi khuẩn TL2, TL4, BV4, BV5 và LĐ5 vẫn duy trì giá trị OD ở mức ổn định với giá trị OD dao động từ 0,96 đến 1,33 cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với các dòng còn lại.

Ở nồng độ 5% NaCl, các dòng vi khuẩn như TL4, BV7 và BV8 thể hiện khả năng chịu mặn cao với giá trị OD lần lượt đạt 1,56; 1,55 và 1,54 cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng còn lại, có giá trị OD dao động từ 0,14 đến 0,4. Điều này cho thấy ba dòng vi khuẩn này có khả năng chịu được nồng độ NaCl cao trong môi trường nuôi cấy lỏng. Khi nồng độ muối đạt 7,5% NaCl, sự ức chế sinh trưởng thể hiện rõ hơn ở các dòng vi khuẩn thử nghiệm với giá trị OD chỉ đạt dưới 0,5. Tuy nhiên, dòng TL2 vẫn duy trì thích nghi với môi trường ở 7,5% NaCl với giá trị OD đạt 0,45 cao hơn và khác biệt có ý nghĩa so với các dòng còn lại ($p < 0,05$), trong khi các dòng LĐ5 và LĐ6 gần như bị ức chế hoàn toàn với giá trị OD chỉ đạt 0,01. Tương tự, ở

nồng độ 10% NaCl, hầu hết các dòng vi khuẩn đều bị ức chế mạnh, với giá trị OD_{600nm} thấp hơn 0,01 – 0,12. Trong đó, dòng BV8 thể hiện khả năng chịu mặn tốt nhất với giá trị OD đạt 0,12 cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Kết quả này cho thấy khả năng chịu mặn của các dòng vi khuẩn có sự khác biệt, trong đó một số dòng như BV8, TL2 có khả năng thích nghi tốt hơn ở nồng độ muối cao lên đến 7,5 hoặc 10% NaCl, trong khi các dòng khác bị ức chế sinh trưởng khi nồng độ muối tăng lên. Kết quả trên cho thấy khả năng chịu mặn của các dòng vi khuẩn khác nhau phụ thuộc vào đặc tính sinh học và nguồn gốc phân lập của từng dòng. Các dòng BV8, TL2 có khả năng chịu mặn tốt hơn, đặc biệt ở nồng độ 5% NaCl, nhờ khả năng thích nghi tốt trong điều kiện khắc nghiệt. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Laranjo and Oliveira (2011) và Moussaïd et al. (2015), cho rằng vi khuẩn *Rhizobium* sp. có khả năng chịu mặn phụ thuộc vào điều kiện môi trường sống như hàm lượng dinh dưỡng trong đất và áp lực chọn lọc tự nhiên. Các dòng vi khuẩn phân lập từ thực vật ở điều kiện tự nhiên có khả năng hình thành cơ chế thích nghi tốt hơn.

Bảng 4. Giá trị OD_{600nm} của các dòng vi khuẩn tuyển chọn trong môi trường YEMA lỏng ở các nồng độ muối NaCl khác nhau tại thời điểm 1 ngày sau khi bố trí thí nghiệm

Dòng vi khuẩn	Giá trị OD ₆₀₀				
	0% NaCl	2,5% NaCl	5% NaCl	7,5% NaCl	10% NaCl
TL2	1,73 ^a	0,96 ^{abc}	0,33 ^c	0,45 ^a	0,005 ^e
LĐ2	0,29 ^d	0,87 ^{bcd}	0,88 ^b	0,25 ^b	0,014 ^{cde}
TL4	1,23 ^{bc}	1,33 ^a	1,56 ^a	0,26 ^b	0,013 ^{cde}
LĐ5	1,09 ^{bc}	1,23 ^{ab}	0,41 ^c	0,01 ^{cd}	0,010 ^{de}
LĐ6	0,93 ^c	0,63 ^{cd}	0,38 ^c	0,003 ^d	0,007 ^e
TL3	1,03 ^c	0,78 ^{cd}	0,14 ^c	0,05 ^{cd}	0,047 ^{bc}
BV4	1,84 ^a	1,22 ^{ab}	0,24 ^c	0,06 ^c	0,044 ^{bcd}
BV5	1,80 ^a	1,28 ^a	0,31 ^c	0,05 ^{cd}	0,069 ^b
BV7	1,36 ^b	0,51 ^d	1,55 ^a	0,22 ^b	0,063 ^b
BV8	1,14 ^{bc}	0,72 ^{cd}	1,54 ^a	0,26 ^b	0,116 ^a
F	*	*	*	*	*
CV (%)	8,77	13,7	13,6	10,3	30,8

Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị trung bình có ký tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% qua phép thử Tukey's, * là khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức ở mức ý nghĩa 5%.

3.3.2. Khả năng chịu mặn của các dòng vi khuẩn tuyển chọn ở thời điểm 3 ngày sau khi bố trí thí nghiệm

Khả năng chịu mặn của 10 dòng vi khuẩn được tuyển chọn sau 3 ngày nuôi cấy trong môi trường YEMA lỏng với các nồng độ NaCl khác nhau được trình bày trong Bảng 5. Kết quả cho thấy các dòng vi khuẩn có khả năng chịu được với các mức nồng độ muối NaCl khác nhau. Tương tự như ngày 1, ở ngày 3, mật độ quang OD của vi khuẩn trong môi

trường nuôi cấy lỏng giảm khi nồng độ NaCl tăng lên. Cụ thể, ở nồng độ 0% NaCl, tất cả các dòng vi khuẩn tuyển chọn đều phát triển mật độ quang OD tốt nhất, với điều kiện sinh trưởng thuận lợi khi không bị ức chế bởi muối NaCl. Trong đó, dòng vi khuẩn BV4, BV5 và BV7 đạt giá trị OD cao nhất (2,40), cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với các dòng còn lại, thể hiện khả năng sinh trưởng vượt trội trong điều kiện không mặn. Khi nồng độ muối tăng lên 2,5% NaCl, hầu hết các

dòng vi khuẩn thử nghiệm thể hiện giảm mật độ quang OD so với điều kiện không bổ sung muối NaCl. Tuy nhiên, hai dòng vi khuẩn BV4 và BV5 vẫn duy trì khả năng thích nghi và phát triển tốt với giá trị OD đạt 2,03 cao hơn và khác biệt ý nghĩa ($p < 0,05$) khi so với các dòng còn lại, nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) khi so với dòng vi khuẩn TL2 (1,77). Ở nồng độ 5% NaCl, sự suy giảm về mật độ quang OD của vi khuẩn thể hiện rõ rệt hơn. Tuy nhiên, dòng vi khuẩn TL3 lại cho thấy khả năng sinh trưởng tăng cao với giá trị OD đạt 1,6 cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) khi so với các dòng còn lại, nhưng dòng TL3 có OD tương đương khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi so với dòng BV4 và BV5 (1,50 và 1,52) ($p > 0,05$). Thông qua kết quả thí nghiệm cho thấy khả năng chịu mặn tốt của dòng TL3 ở nồng độ muối 5%.

Khi nồng độ muối đạt 7,5% NaCl, khả năng sinh trưởng của các dòng vi khuẩn bị ức chế rõ rệt. Trong

đó, dòng vi khuẩn TL3 vẫn duy trì được mức phát triển khá cao, kháng định khả năng chịu mặn rất tốt với giá trị OD đạt 1,54 tương đương và khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với dòng vi khuẩn BV8 ($p > 0,05$) tuy nhiên cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so với các dòng vi khuẩn còn lại ($p < 0,05$). Kết quả thí nghiệm được ghi nhận tương tự ở nồng độ 10% NaCl, hầu hết các dòng vi khuẩn bị ức chế mạnh. Tuy nhiên, dòng vi khuẩn LD6 vẫn duy trì sự phát triển với giá trị OD đạt 0,84 cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng còn lại ($p < 0,05$). Kết quả thí nghiệm cho thấy sự khác biệt rõ rệt về khả năng chịu mặn giữa các dòng vi khuẩn được thử nghiệm. Dòng BV4 và BV5 thể hiện khả năng sinh trưởng tốt ở nồng độ muối 2,5% NaCl, trong khi dòng TL3 và BV8 vượt trội ở mức 5% và 7,5% NaCl, kháng định sự thích nghi đáng kể trong điều kiện mặn cao. Đặc biệt, dòng LD6 cho thấy khả năng sinh trưởng ổn định ở nồng độ 10% NaCl với khả năng chịu mặn rất cao.

Bảng 5. Giá trị OD_{600nm} của các dòng vi khuẩn tuyển chọn trong môi trường YEMA lỏng ở các nồng độ muối NaCl khác nhau tại thời điểm 3 ngày sau khi bố trí thí nghiệm

Dòng vi khuẩn	Giá trị OD ₆₀₀				
	0% NaCl	2,5% NaCl	5% NaCl	7,5% NaCl	10% NaCl
TL2	2,16 ^b	1,77 ^{ab}	0,63 ^c	0,35 ^c	0,65 ^b
LD2	1,52 ^c	1,65 ^b	1,40 ^c	0,36 ^c	0,23 ^d
TL4	1,53 ^c	1,32 ^c	1,17 ^d	0,75 ^c	0,56 ^b
LD5	1,52 ^c	1,26 ^c	1,48 ^{bc}	0,51 ^d	0,84 ^a
LD6	1,55 ^c	0,62 ^d	0,61 ^e	0,72 ^c	0,59 ^b
TL3	1,28 ^d	1,22 ^c	1,61 ^a	1,3 ^b	0,33 ^{cd}
BV4	2,34 ^a	2,03 ^a	1,50 ^{abc}	0,34 ^e	0,09 ^e
BV5	2,40 ^a	2,03 ^a	1,52 ^{ab}	0,51 ^d	0,43 ^c
BV7	2,28 ^{ab}	1,08 ^c	1,39 ^c	1,54 ^a	0,40 ^c
BV8	1,47 ^c	1,05 ^c	1,44 ^{bc}	1,51 ^a	0,31 ^{cd}
F	*	*	*	*	*
CV (%)	2,48	8,00	3,22	5,30	10,3

Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị trung bình có các ký tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% qua phép thử Tukey's, * là khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức ở mức ý nghĩa 5%.

3.3.3. Khả năng chịu mặn của các dòng vi khuẩn tuyển chọn ở thời điểm 5 ngày sau khi bố trí thí nghiệm

Kết quả đánh giá khả năng chịu mặn và sinh trưởng của 10 dòng vi khuẩn thử nghiệm ở thời điểm 5 ngày sau khi bố trí thí nghiệm được trình bày ở Bảng 6. Kết quả thí nghiệm cho thấy khả năng chịu mặn của các dòng vi khuẩn thử nghiệm giảm rõ rệt theo nồng độ NaCl tăng lên. Ở điều kiện không bổ sung muối NaCl, hầu hết các dòng vi khuẩn đều sinh trưởng tốt. Trong đó, hai dòng vi khuẩn BV4 và BV5 tiếp tục có giá trị OD đạt 2,45 và 2,44 cao hơn và khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với các dòng còn

lại. Ở nồng độ muối 2,5% NaCl, khả năng sinh trưởng của các dòng vi khuẩn có xu hướng giảm xuống so với nồng độ 0% NaCl. Dòng vi khuẩn BV4 (1,59) và BV5 (1,54) tiếp tục duy trì mức sinh trưởng cao, tương đương khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) khi so sánh với nhau. Trong khi đó, dòng TL2 đạt giá trị OD cao nhất (1,91) cao hơn khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so với các dòng vi khuẩn còn lại ($p < 0,05$). Ở nồng độ 5% NaCl, sự suy giảm mật độ vi khuẩn thể hiện rõ hơn. Tuy nhiên, dòng TL3 vẫn đạt giá trị OD cao nhất (1,33) cho thấy khả năng chịu mặn vượt trội so với các dòng còn lại, cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê khi so sánh với nhau ($p < 0,05$). Tương tự, dòng vi khuẩn

LĐ6 cũng thể hiện khả năng chịu mặn cao ở nồng độ muối 5% NaCl với giá trị OD đạt 1,18 cao hơn khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so với các dòng vi khuẩn còn lại ($p < 0,05$), tuy nhiên thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) khi so với dòng TL3. Trong khi đó, dòng vi khuẩn BV5 và LĐ2 có giá trị OD thấp nhất, chỉ đạt 0,58 và 0,78 cho thấy sự sinh trưởng bị ảnh hưởng bởi nồng độ muối cao.

Khi nồng độ muối tăng lên 7,5% và 10% NaCl, sự sinh trưởng của các dòng vi khuẩn bị ức chế mạnh. Tuy nhiên, ở nồng độ 7,5% NaCl hai dòng vi khuẩn LĐ6 và BV8 vẫn tiếp tục sinh trưởng và phát triển tăng cao với giá trị OD đạt 1,46 và 1,45 cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) khi so với các dòng vi khuẩn còn lại, tương đương và khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) khi so với dòng TL3 (1,15). Điều này cho thấy cả 3 dòng đều thể hiện khả năng chịu mặn tốt. Ở nồng độ muối cao nhất (10% NaCl), dòng vi khuẩn TL3 vẫn còn tiếp tục cho khả năng sinh trưởng cao nhất, vượt trội hơn so với các dòng vi khuẩn còn lại ($p < 0,05$), tuy nhiên khác biệt không ý nghĩa so với dòng TL2,

LĐ5 và BV8. Các dòng vi khuẩn còn lại bị ức chế nghiêm trọng.

Kết quả thí nghiệm cho thấy khả năng chịu mặn của các dòng vi khuẩn thay đổi rõ rệt theo nồng độ NaCl. Ở nồng độ muối thấp (2,5% NaCl), các dòng BV4 và BV5 thể hiện khả năng sinh trưởng tốt, nhưng khi nồng độ muối tăng lên, mật số bị giảm đáng kể. Điều này phù hợp với nghiên cứu của Bernard et al. (1986) cho thấy khi áp lực thẩm thấu vượt quá ngưỡng chịu đựng, vi khuẩn không thể duy trì cân bằng nội bào, dẫn đến giảm tốc độ tăng trưởng. Dòng TL3, LĐ6 và BV8 nổi bật với khả năng chịu mặn vượt trội ở các nồng độ muối trung bình đến cao (5% - 10% NaCl). Kết quả này có thể được giải thích bởi khả năng sản xuất các chất bảo vệ nội bào như glycine betaine, giúp vi khuẩn chống lại áp lực thẩm thấu và duy trì hoạt động của tế bào. Nghiên cứu của Bernard et al. (1986) cho thấy việc bổ sung glycine betaine có thể cải thiện khả năng sinh trưởng của một số chủng *Rhizobium* sp. dưới điều kiện mặn.

Bảng 6. Giá trị OD_{600nm} của các dòng vi khuẩn tuyển chọn trong môi trường YEMA lỏng ở các nồng độ muối NaCl khác nhau tại thời điểm 5 ngày sau khi bố trí thí nghiệm

Dòng vi khuẩn	Giá trị OD ₆₀₀				
	0% NaCl	2,5% NaCl	5% NaCl	7,5% NaCl	10% NaCl
TL2	2,29 ^b	1,91 ^a	1,11 ^c	0,17 ^c	0,50 ^{ab}
LĐ2	1,67 ^{de}	1,49 ^b	0,78 ^c	0,43 ^c	0,39 ^b
TL4	1,66 ^{de}	1,10 ^c	1,00 ^d	0,54 ^c	0,44 ^b
LĐ5	1,66 ^{de}	1,14 ^c	1,33 ^a	0,51 ^c	0,62 ^{ab}
LĐ6	1,76 ^{cd}	1,47 ^b	0,58 ^f	0,62 ^{bc}	0,40 ^b
TL3	1,58 ^c	1,17 ^c	1,12 ^c	1,05 ^{ab}	0,72 ^{ab}
BV4	2,45 ^a	1,59 ^b	1,10 ^c	0,36 ^c	1,15 ^a
BV5	2,44 ^a	1,54 ^b	1,18 ^b	0,40 ^c	0,34 ^b
BV7	1,81 ^c	1,03 ^c	1,13 ^c	1,46 ^a	0,33 ^b
BV8	1,31 ^f	0,97 ^c	1,02 ^d	1,45 ^a	0,34 ^b
F	*	*	*	*	*
CV(%)	2,21	5,37	1,48	24,5	47,1

Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị trung bình có các ký tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% qua phép thử Tukey's, * là khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức ở mức ý nghĩa 5%.

3.3.4. Khả năng chịu mặn của các dòng vi khuẩn tuyển chọn ở thời điểm 7 ngày sau khi bố trí thí nghiệm

Khả năng chịu mặn của 10 dòng vi khuẩn tuyển chọn sau 7 ngày nuôi cấy trong môi trường YEMA lỏng với các nồng độ muối NaCl khác nhau được trình bày trong Bảng 7. Kết quả cho thấy các dòng vi khuẩn có khả năng thích nghi với các mức nồng độ muối NaCl khác nhau. Tương tự ngày 1, 3 và 5 mật độ quang OD của các dòng vi khuẩn thử nghiệm vào ngày 7 giảm xuống ở các môi trường nuôi cấy

có nồng độ NaCl tăng. Ở nồng độ muối NaCl 0%, ba dòng vi khuẩn BV4, BV5 và LĐ2 phát triển mạnh ở môi trường không bổ sung muối NaCl. Tuy nhiên, khi nồng độ muối NaCl tăng lên, sự phát triển của hầu hết các dòng vi khuẩn giảm dần, với sự ức chế rõ rệt ở nồng độ muối 7,5% đến 10% NaCl. Trong khi đó, ba dòng vi khuẩn TL3, BV8 và LĐ6 tiếp tục phát triển tốt ở nồng độ muối NaCl 7,5% và 10% cho thấy chúng có khả năng thích nghi tốt hơn trong môi trường có hàm lượng muối NaCl cao. Cụ thể, hai dòng vi khuẩn BV5 và BV4 có sự phát triển mạnh nhất trong môi trường 0% NaCl với giá trị OD

đạt 2,4 cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê khi so với các dòng vi khuẩn còn lại. Ở nồng độ muối 2,5% NaCl, dòng vi khuẩn LD2 thể hiện sự phát triển vượt trội với giá trị OD đạt 1,93. Trong khi đó, ở nồng độ muối 7,5% NaCl ba dòng vi khuẩn TL3, BV8, và LD6 vẫn thích nghi tốt và phát triển tốt mật số. Cụ thể, các dòng LD6 và BV8 phát triển mạnh nhất với giá trị OD lần lượt là 1,37 và 1,34 khác biệt ý nghĩa thống kê khi so với các dòng vi khuẩn khác ($p < 0,05$), thể hiện khả năng thích nghi tốt với điều kiện muối NaCl cao. Dòng TL3 cũng tiếp tục cho sinh trưởng ổn định với giá trị OD đạt 1,24 tại nồng độ 7,5% NaCl. Kết quả ghi nhận tương tự ở nồng độ 10% NaCl, cả 3 dòng vi khuẩn TL3, BV8 và LD6 đều thể hiện khả năng chịu mặn cao với giá trị OD đạt từ 0,79 đến 1,07 tương đương và khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) khi so sánh với nhau. Tuy nhiên, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) khi so với các dòng vi khuẩn còn lại. Kết quả này cho thấy, ba dòng vi khuẩn TL3, BV8, và LD6 có khả năng chịu mặn vượt trội và khả năng thích ứng với các nồng độ muối NaCl khác nhau theo thời gian.

Kết quả của các nghiên cứu trước đây cũng chỉ ra rằng các vi sinh vật đất có lợi bao gồm vi khuẩn cố định đạm cộng sinh và nấm rễ cộng sinh có thể có tác động lớn đến khả năng chịu đựng của thực vật đối với stress do muối (Ngom et al., 2016). Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng việc chủng các dòng

Rhizobium sp. có thể làm tăng trọng lượng khô của các cây họ đậu trong điều kiện căng thẳng do muối. Các thí nghiệm đã được thực hiện trên nhiều loại cây bao gồm: *Acacia nilotica*, *Leucaena leucocephala*, và *Prosopis juliflora* (Bala et al., 1990), *Acacia ampliceps* (Zou et al., 1995), *Phaseolus vulgaris* (Dardanelli et al., 2008) và đậu nành (Elsheikh & Wood, 1995). Những kết quả này cho thấy *Rhizobium sp.* không chỉ giúp cải thiện khả năng chịu mặn của cây mà còn thúc đẩy tăng trưởng, ngay cả trong các môi trường khắc nghiệt như đất mặn. Tương tự, kết quả nghiên cứu của Pagare et al. (2018) cho thấy, 33 dòng vi khuẩn *Rhizobium sp.* đã được phân lập có khả năng chịu mặn. Trong số 33 dòng vi khuẩn được phân lập có 20 dòng được xác định là có khả năng chịu mặn cao với mức chịu đựng nồng độ muối trên 5,4% NaCl. Tương tự kết quả nghiên cứu của Sharma et al. (2013) cũng cho thấy 8 chủng *Rhizobium sp.* phân lập có hiệu quả trong việc tạo nốt sần trên cây con 21 ngày tuổi được trồng trong đất chậu và tưới nước mặn lên tới 12 dS m⁻¹ sau khi cấy. Bên cạnh đó, trong nghiên cứu của Satyam (2023) các chủng vi khuẩn *Rhizobacteria sp.* có khả năng chịu mặn và nhiệt từ đất vùng rễ cây cà chua được tập trung phân lập và lựa chọn. Kết quả cho thấy, 9 dòng có khả năng chịu mặn cực cao (6% NaCl). Hai dòng có khả năng chịu mặn ở nồng độ NaCl từ 2,10 đến 3,6% và 9 dòng có khả năng chịu mặn vừa phải ở nồng độ từ 0,09 đến 1,50% NaCl.

Bảng 7. Giá trị OD_{600nm} của các dòng vi khuẩn tuyển chọn trong môi trường YEMA lỏng ở các nồng độ muối NaCl khác nhau tại thời điểm 7 ngày sau khi bố trí thí nghiệm

Dòng vi khuẩn	Giá trị OD ₆₀₀				
	0% NaCl	2,5% NaCl	5% NaCl	7,5% NaCl	10% NaCl
TL2	0,287 ^f	0,66 ^g	1,39 ^a	0,96 ^c	0,32 ^c
LD2	2,35 ^a	1,93 ^a	1,08 ^{bcd}	0,58 ^{de}	0,45 ^{bc}
TL4	1,63 ^d	1,27 ^{cd}	1,37 ^a	1,24 ^b	0,79 ^{ab}
LD5	1,74 ^c	0,92 ^{ef}	0,98 ^{cde}	0,50 ^e	0,45 ^{bc}
LD6	1,66 ^d	1,06 ^{ef}	1,16 ^b	0,96 ^c	0,93 ^a
TL3	1,67 ^d	1,09 ^{de}	1,00 ^{cde}	1,03 ^c	0,35 ^c
BV4	2,37 ^a	1,48 ^b	0,95 ^c	0,60 ^d	1,07 ^a
BV5	2,40 ^a	1,43 ^{bc}	1,09 ^{bc}	0,36 ^f	0,32 ^c
BV7	2,14 ^b	0,94 ^{ef}	0,96 ^c	1,37 ^a	0,36 ^c
BV8	1,25 ^e	0,88 ^f	0,96 ^{de}	1,34 ^a	0,24 ^c
F	*	*	*	*	*
CV(%)	1,33	5,52	3,92	2,89	25,0

Ghi chú: Trong cùng một cột các giá trị trung bình có các ký tự theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% qua phép thử Tukey's, * là khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức ở mức ý nghĩa 5%.

Thông qua kết quả đánh giá khả năng chịu mặn của 10 dòng vi khuẩn tuyển chọn về khả năng thích ứng với các nồng độ muối NaCl khác nhau theo thời

gian cho thấy ba dòng vi khuẩn TL3, BV8 và LD6 đều có khả năng thích nghi được nồng độ mặn cao lên đến 10% NaCl giúp gia tăng và phát triển mật số

vi khuẩn ổn định theo thời gian nuôi cấy. Điều này có thể được giải thích do các cơ chế sinh lý, sinh hóa và di truyền của *Rhizobium* sp. như sản xuất exopolysaccharides (EPS), giúp bảo vệ tế bào vi khuẩn khỏi stress do muối bằng cách tạo ra một lớp màng bảo vệ bên ngoài, ngăn chặn sự tích tụ ion natri (Na⁺) và ion clorua (Cl⁻). EPS cũng đóng vai trò trong việc duy trì sự cộng sinh hiệu quả giữa vi khuẩn và cây chủ, tạo điều kiện hình thành nốt sần cố định đạm trong môi trường mặn (Mokrani et al., 2020; Ayuso-Calles et al., 2021). Bên cạnh đó, trong điều kiện mặn, vi khuẩn *Rhizobium* sp. tích lũy các chất bảo vệ thẩm thấu như glycine betaine, proline và trehalose. Các hợp chất này giúp cân bằng áp suất thẩm thấu giữa tế bào vi khuẩn và môi trường mặn, giúp vi khuẩn duy trì cấu trúc tế bào và chức năng sinh học ổn định (Ayuso-Calles et al., 2021). *Rhizobium* sp. có khả năng điều chỉnh ion trong tế bào, đặc biệt là việc duy trì tỉ lệ cao giữa kali (K⁺) và natri (Na⁺). Điều này giúp giảm thiểu cây trồng ngộ độc do ion Na⁺ gây ra trong điều kiện mặn và duy trì các enzyme chức năng quan trọng trong tế bào (Mokrani et al., 2020). Ngoài ra, các gen điều chỉnh thẩm thấu và chịu mặn ở vi khuẩn *Rhizobium* sp. được kích hoạt trong điều kiện mặn. Điều này bao gồm các gen liên quan đến tổng hợp các hợp chất bảo vệ thẩm thấu, điều chỉnh ion và các protein chịu stress, giúp vi khuẩn tồn tại và tiếp tục cố định đạm trong môi trường mặn (Ayuso-Calles et al., 2021).

Nhiều kết quả đánh giá cho thấy vi khuẩn cộng sinh chịu mặn cho hiệu quả hơn trong việc thúc đẩy sự phát triển của thực vật dưới điều kiện mặn (Hafeez et al., 1988). Cần ưu tiên lựa chọn các chủng vi khuẩn cộng sinh bản địa có khả năng hoạt động tốt ngay cả trong môi trường mặn (Bertrand et al., 2011). Kết quả nghiên cứu của Bala et al. (1990) cho thấy cây *Acacia nilotica* khi được chủng với các dòng *Rhizobia* spp. chịu mặn giúp duy trì tỷ lệ cố

định nitơ lên đến 70% ở mức mặn 12 dS/m, so với tỷ lệ cố định cao nhất ở mức 2 dS/m. Ngoài ra, việc chủng vi khuẩn cố định đạm đã làm tăng hấp thu N của cây đậu mắt đen lên đến 151% trong điều kiện độ mặn 7,2 dS/m (Rabie et al., 2005).

3.4. Định danh 3 dòng vi khuẩn tuyển chọn

Kết quả giải trình tự đoạn gen 16S rRNA của ba dòng vi khuẩn TL3, BV8 và LD6 đã xác định sự tương đồng với các loài vi khuẩn khác nhau (Bảng 8). Dòng vi khuẩn TL3 có độ tương đồng 100% với loài *Rhizobium* sp., cho thấy đây là loài thuộc chi *Rhizobium*, một nhóm vi khuẩn thường sống cộng sinh với các cây họ đậu, giúp cố định đạm trong đất. Trong khi đó, hai dòng vi khuẩn LD6 và BV8 tương đồng lần lượt 100% và 99,9% với loài *Enterobacter* sp., thuộc chi *Enterobacter*. Đây là một nhóm vi khuẩn có khả năng sinh trưởng trong nhiều môi trường khác nhau, bao gồm cả những điều kiện mặn và thường được nghiên cứu vì khả năng chịu mặn và thích ứng với môi trường khắc nghiệt.

Dựa vào kết quả giải trình tự và các đặc điểm hình thái, ba dòng vi khuẩn này đã được định danh là *Rhizobium* sp. TL3, *Enterobacter* sp. BV8 và *Enterobacter* sp. LD6. Kết quả nghiên cứu này cho thấy sự tương đồng với kết quả nghiên cứu của Verma et al. (2020) đã phân lập được dòng *Rhizobium radiobacter* thu thập từ nốt sần rễ của cây *Leucaena leucocephala* mọc hoang trên đất mặn. Ngoài ra, dòng vi khuẩn này còn có khả năng kích thích tăng trưởng thực vật và chịu mặn ở nồng độ NaCl lên tới 4%. Ngoài ra, nghiên cứu của Moussa et al. (2012) cho thấy vi khuẩn *Rhizobium radiobacter* làm tăng hoạt động của enzyme nitrogenase và hydrogenase sau 45 và 90 ngày chủng, ngoài ra tỉ lệ K/Na tăng cao khi được xử lý với *Rhizobium radiobacter*, ngoài ra tổng diệp lục, đường hòa tan và hoạt tính peroxidase cũng được tăng lên.

Bảng 8. Kết quả định danh 3 dòng vi khuẩn TL-3, LD-6 và BV-8 chịu mặn theo độ đồng hình của đoạn gen 16S rRNA

Ký hiệu	Nguồn gốc	Độ đồng hình (%)	Các dòng vi khuẩn trên cơ sở dữ liệu		Định danh
			Vi khuẩn	Số đăng kí	
TL3	Nốt sần cây đậu hoang bông tím (Cần Thơ)	100%	<i>Rhizobium</i> sp.	CP071311.1	<i>Rhizobium</i> sp. TL-3
LD6	Nốt sần cỏ lá đậu (Hậu Giang)	100%	<i>Enterobacter</i> sp.	OR367279.1	<i>Enterobacter</i> sp. LD-6
BV8	Nốt sần điền ma Ấn (Hậu Giang)	99,88%	<i>Enterobacter</i> sp.	OR367279.1	<i>Enterobacter</i> sp. BV-8

Bên cạnh đó, chủng vi khuẩn *Enterobacter* sp. là một nhóm vi khuẩn được nghiên cứu rộng rãi với các đặc tính thúc đẩy sinh trưởng thực vật, bao gồm khả năng cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp axit indole-3-acetic (IAA). Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc kết hợp *Enterobacter* sp. với các vi khuẩn khác như *Rhizobium* sp., có thể cải thiện đáng kể sinh trưởng và năng suất cây trồng. Nghiên cứu của Jha et al. (2011) đã chỉ ra rằng *Enterobacter* spp. có khả năng cố định đạm, hòa tan lân, sản xuất siderophore và các enzyme thủy phân, góp phần thúc đẩy sinh trưởng thực vật. Theo kết quả nghiên cứu của Huy and Hiep (2018), vi khuẩn chịu mặn cố định đạm và tổng hợp IAA *Enterobacter* sp. trên cây lúa ở Bạc Liêu, Sóc Trăng, Kiên Giang được phân lập, tuyển chọn. Nghiên cứu của Kumar et al. (2017) cho thấy việc chủng kết hợp *Enterobacter* sp. với các vi khuẩn *rhizobacteria* sp. đã cải thiện sinh trưởng, năng suất và hấp thu dinh dưỡng (N, P, Cu, Zn, Mn và Fe) ở cây lúa mì.

4. KẾT LUẬN

Từ 14 mẫu nốt sần rễ cây họ đậu thu được từ các tỉnh Sóc Trăng, Kiên Giang, Hậu Giang và Cần Thơ, đã phân lập được 19 dòng vi khuẩn trên môi trường YEMA bổ sung 1% NaCl. Trong đó, 10 dòng vi

khẩn có đặc điểm hình thái khuẩn lạc đặc trưng gồm dạng tròn, màu sắc đa dạng và đều là vi khuẩn Gram âm với tế bào dạng hình que được tuyển chọn từ 19 dòng phân lập trên môi trường YEMA có bổ sung 0,025% Congo Red.

Ba dòng vi khuẩn *Rhizobium* sp. TL-3, *Enterobacter* sp. BV-8, và *Enterobacter* sp. LĐ-6 là ba dòng vi khuẩn thể hiện khả năng chịu mặn và phát triển tốt nhất trong các điều kiện có nồng độ muối cao lên đến 10% NaCl ở tất cả các thời điểm thu mẫu.

Do đó, khả năng cố định đạm cũng như hiệu quả của 3 dòng vi khuẩn *Rhizobium* sp. TL-3, *Enterobacter* sp. BV-8 và *Enterobacter* sp. LĐ-6 lên sinh trưởng, phát triển và năng suất của một số cây họ đậu trên nền đất nhiễm mặn cần được nghiên cứu.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện sự tài trợ kinh phí của dự án hợp tác với trường Đại học Charles Sturt (CSU), Úc thông qua đề tài: “Tương tác của vi sinh vật trong đất với các phương án thay thế cây trồng (soil MICRO) ở Đồng bằng Sông Cửu Long Việt Nam”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO (REFERENCES)

- Ahmad, M., Zahir, Z. A., Asghar, H. N., & Arshad, M. (2012). The combined application of rhizobial strains and plant growth promoting rhizobacteria improves growth and productivity of mung bean (*Vigna radiata* L.) under salt-stressed conditions. *Annals of microbiology*, 62, 1321-1330.
<https://doi.org/10.1007/s13213-011-0380-9>
- Ali, Q., Shabaan, M., Ashraf, S., Kamran, M., Zulfiqar, U., Ahmad, M., Zahir, A., Sarwar, M.J., Iqbal, R., Ali, B., Ali M. A., Elshikh, M.S., & Arslan, M. (2023). Comparative efficacy of different salt tolerant rhizobial inoculants in improving growth and productivity of *Vigna radiata* L. under salt stress. *Scientific Reports*, 13(1), 17442.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-44433-8>
- Ali, Q., Zahir, Z. A., Asghar, H. N., & Jamil, A. (2017). Inoculation with *Rhizobial consortium* for improving the growth, yield and quality of maize under salt-stressed conditions. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 54(1).
<https://doi.org/10.21162/PAKJAS/17.5388>
- Ayuso-Calles, M., Flores-Félix, J. D., & Rivas, R. (2021). Overview of the role of rhizobacteria in plant salt stress tolerance. *Agronomy*, 11(9), 1759.
<https://doi.org/10.3390/agronomy11091759>
- Bala, N., Sharma, P. K., & Lakshminarayana, K. (1990). Nodulation and nitrogen fixation by salinity-tolerant rhizobia in symbiosis with tree legumes. *Agriculture, ecosystems & environment*, 33(1), 33-46.
[https://doi.org/10.1016/0167-8809\(90\)90142-Z](https://doi.org/10.1016/0167-8809(90)90142-Z)
- Bernard, T., Pocard, J. A., Perroud, B., & Le Rudulier, D. (1986). Variations in the response of salt-stressed *Rhizobium* strains to betaines. *Archives of Microbiology*, 143, 359-364.
<https://doi.org/10.1007/BF00412803>
- Bertrand, A., Prévost, D., Juge, C., & Chalifour, F. P. (2011). Impact of elevated CO₂ on carbohydrate and ureide concentrations in soybean inoculated with different strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *Botany*, 89(7), 481-490.
<https://doi.org/10.1139/b11-034>
- Breedveld, M. W., Zevenhuizen, L. P., & Zehnder, A. J. (1991). Osmotically-regulated trehalose accumulation and cyclic β-(1, 2)-glucan excretion by *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii TA-1. *Archives of microbiology*, 156, 501-506.
<https://doi.org/10.1007/BF00245399>

- Dao, B. T., Phong, N. T., & Diep, C. N. (2021). Isolation and identification of endogenous bacteria from peanuts cultivated in Binh Dinh province. *CTU Journal of Science*, 57(6), 125-131.
- Dardanelli, M. S., de Cordoba, F. J. F., Espuny, M. R., Carvajal, M. A. R., Díaz, M. E. S., Serrano, A. M. G., & Megias, M. (2008). Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on Phaseolus vulgaris flavonoids and Nod factor production under salt stress. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(11), 2713-2721. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.06.016>
- Dewhurst, R. J., Delaby, L., Moloney, A., Boland, T., & Lewis, E. (2009). Nutritive value of forage legumes used for grazing and silage. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 167-187.
- Elsheikh, E. A. E., & Wood, M. (1995). Nodulation and N₂ fixation by soybean inoculated with salt-tolerant rhizobia or salt-sensitive bradyrhizobia in saline soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(4-5), 657-661.
- Evelin, H., Kapoor, R., & Giri, B. (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Annals of botany*, 104(7), 1263-1280. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)98645-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)98645-5)
- Embalomatis, A., Papaxosta, D. K., & Katinakis, P. (1994). Evaluation of *Rhizobium miloti* strains isolated from indigenous populations in Northern Greece. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 172(2), 73-80. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.1994.tb00532.x>
- Ghosh, P. K., Sen, S. K., & Maiti, T. K. (2015). Production and metabolism of IAA by Enterobacter spp. (Gammaproteobacteria) isolated from root nodules of a legume *Abrus precatorius* L. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(3), 296-303. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.04.002>
- Graham, P. H., & Vance, C. P. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology*, 131(3), 872-877. <https://doi.org/10.1104/pp.017004>
- Hafeez, F. Y., Aslam, Z., & Malik, K. A. (1988). Effect of salinity and inoculation on growth, nitrogen fixation and nutrient uptake of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Plant and soil*, 106, 3-8. <https://doi.org/10.1007/BF02371188>
- Hahn, N. J. (1966). The congo red reaction in bacteria and its usefulness in the identification of rhizobia. *Canadian journal of Microbiology*, 12(4), 725-733. <https://doi.org/10.1139/m66-099>
- Haleblian, S., Harris, B., Finegold, S. M., & Rolfe, R. D. (1981). Rapid method that aids in distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria. *Journal of clinical microbiology*, 13(3), 444-448. <https://doi.org/10.1128/jcm.13.3.444-448.1981>
- Herridge, D. F., Peoples, M. B., & Boddey, R. M. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and soil*, 311, 1-18. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9668-3>
- Huy, N. A., & Hiep, N. H. (2018). Isolation and identification of salt-tolerant bacterial strains capable of nitrogen fixation and IAA synthesis from rice-shrimp farming soils in Bac Lieu, Soc Trang, and Kien Giang. *Can Tho University Journal of Science*, 54(1), 7-12. <https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2018.002>
- Iqbal, M. A., Khalid, M., Zahir, Z. A., & Ahmad, R. (2016). Auxin producing plant growth promoting rhizobacteria improve growth, physiology and yield of maize under saline field conditions. *Int J Agric Biol*, 18(1), 37-45. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0059>
- Jaiswal, S. K., Beyan, S. M., & Dakora, F. D. (2016). Distribution, diversity and population composition of soybean-nodulating bradyrhizobia from different agro-climatic regions in Ethiopia. *Biology and Fertility of Soils*, 52, 725-738. <https://doi.org/10.1007/s00374-016-1108-6>
- Jha, C. K., Aeron, A., Patel, B. V., Maheshwari, D. K., & Saraf, M. (2011). Enterobacter: role in plant growth promotion. *Bacteria in agrobiology: Plant growth responses*, 159-182. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20332-9_8
- Jimenez, S., Santana, O., Lara-Rojas, F., Arthikala, M. K., Armada, E., Hashimoto, K., Kuchitsu, K., Salgado, S., Aguirre, J., Quinto, K., & Cárdenas, C. (2019). Differential tetraspanin genes expression and subcellular localization during mutualistic interactions in Phaseolus vulgaris. *PLoS One*, 14(8), e0219765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219765>
- Kleen, J., Taube, F., & Gierus, M. (2011). Agronomic performance and nutritive value of forage legumes in binary mixtures with perennial ryegrass under different defoliation systems. *The Journal of Agricultural Science*, 149(1), 73-84. <https://doi.org/10.1017/S0021859610000456>
- Kucuk, Ç., & Kivanc, M. (2008). Preliminary characterization of *Rhizobium* strains isolated from chickpea nodules. *African Journal of Biotechnology*, 7(6).
- Kumar, A., Maurya, B. R., Raghuwanshi, R., Meena, V. S., & Tofazzal Islam, M. (2017). Co-inoculation with Enterobacter and Rhizobacteria on yield and nutrient uptake by wheat (*Triticum aestivum* L.) in the alluvial soil under indo-

- gangetic plain of India. *Journal of plant growth Regulation*, 36, 608-617.
<https://doi.org/10.1007/s00344-016-9663-5>
- Laranjo, M., & Oliveira, S. (2011). Tolerance of Mesorhizobium type strains to different environmental stresses. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99, 651-662.
<https://doi.org/10.1007/s10482-010-9539-9>
- Li, X., Geng, X., Xie, R., Fu, L., Jiang, J., Gao, L., & Sun, J. (2016). The endophytic bacteria isolated from elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schumacher) promote plant growth and enhance salt tolerance of Hybrid *Pennisetum*. *Biotechnology for Biofuels*, 9, 1-12.
<https://doi.org/10.1186/s13068-016-0592-0>
- Mohammad, R. M., Akhavan-Kharazian, M., Campbell, W. F., & Rumbaugh, M. D. (1991). Identification of salt-and drought-tolerant *Rhizobium meliloti* L. strains. *Plant and soil*, 134, 271-276.
<https://doi.org/10.1007/BF00012045>
- Mokrani, S., Nabti, E. H., & Cruz, C. (2020). Current advances in plant growth promoting bacteria alleviating salt stress for sustainable agriculture. *Applied Sciences*, 10(20), 7025.
<https://doi.org/10.3390/app10207025>
- Mondal, H. K., Mehta, S., Kaur, H., & Gera, R. (2017). Characterization of stress tolerant mungbean rhizobia as PGPR and plant growth promotion under abiotic stress. *Indian Ecol. Soc*, 44, 38.
- Moussa, L. A., Mohy, E. A., & El Banna Ib, M. (2012). Zea mays cultivar behavior as affected by *Rhizobium radiobacter* inoculation in salt-stressed environments. *Journal of American Science*, 8(7), 743-750.
- Moussaid, S., Dominguez-Ferreras, A., Munoz, S., Aurag, J., Berraho, E. B., & Sanjuan, J. (2015). Increased trehalose biosynthesis improves Mesorhizobium ciceri growth and symbiosis establishment in saline conditions. *Symbiosis*, 67, 103-111.
<https://doi.org/10.1007/s13199-015-0338-y>
- Mpepereki, S., Makonese, F., & Wollum, A. G. (1997). Physiological characterization of indigenous rhizobia nodulating *Vigna unguiculata* in Zimbabwean soils. *Symbiosis*.
- Ngom, M., Oshone, R., Diagne, N., Cissoko, M., Svistoonoff, S., Tisa, L. S., Laurent, L., Sy, M. O., & Champion, A. (2016). mTolerance to environmental stress by the nitrogen-fixing actinobacterium *Frankia* and its role in actinorhizal plants adaptation. *Symbiosis*, 70, 17-29. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0396-9>
- Novoa, R., & Loomis, R. S. (1981). Nitrogen and plant production. *Plant and soil*, 58, 177-204.
<https://doi.org/10.1007/BF02180053>
- Ohyama, T. (2017). The role of legume-rhizobium symbiosis in sustainable agriculture. *Legume nitrogen fixation in soils with low phosphorus availability: Adaptation and regulatory implication*, 1-20.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-55729-8_1
- Ondieki, D. K., Nyaboga, E. N., Wagacha, J. M., & Mwaura, F. B. (2017). Morphological and genetic diversity of Rhizobia nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L.) from agricultural soils of lower eastern Kenya. *International Journal of Microbiology*, 2017(1), 8684921.
<https://doi.org/10.1155/2017/8684921>
- Pagare, K. A., Navale, A., Deokar, C., & Awale, A. (2018). Isolation, selection and characterization of salt tolerant *Rhizobium*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(6), 1976-1982.
- Plá, C. L., & Cobos-Porras, L. (2015). Salinity: physiological impacts on legume nitrogen fixation. *Legume Nitrogen Fixation in a Changing Environment: Achievements and Challenges*, 35-65.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-06212-9_3
- Rabie, G. H., Aboul-Nasr, M. B., & Al-Humiany, A. (2005). Increased salinity tolerance of cowpea plants by dual inoculation of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* and a nitrogen-fixer *Azospirillum brasilense*. *Mycobiology*, 33(1), 51-60.
<https://doi.org/10.4489/MYCO.2005.33.1.051>
- Ruiz, W. F., Valdez-Nuñez, R. A., Bedmar, E. J., & Castellano-Hinojosa, A. (2019). Utilization of endophytic bacteria isolated from legume root nodules for plant growth promotion. *Field crops: Sustainable management by PGPR*, 145-176.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-30926-8_6
- Sánchez-Cruz, R., Vázquez, I. T., Batista-García, R. A., Méndez-Santiago, E. W., del Rayo Sanchez-Carbente, M., Leija, A., Ruan, V. L., Hernández, G., Wong-Villarreal, A., & Folch-Mallol, J. L. (2019). Isolation and characterization of endophytes from nodules of *Mimosa pudica* with biotechnological potential. *Microbiological research*, 218, 76-86.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.09.008>
- Satyam, A. M., Kolase, S. V., Narute, T. K., Kale, A. A., Chandanshive, A. V., Durgude, A. G., & Barge, M. S. (2023). Salt and temperature tolerant rhizobacteria: A comprehensive study on biochemical profiling and biocontrol potential.
- Sharma, S. R., Rao, N. K., Gokhale, T. S., & Ismail, S. (2013). Isolation and characterization of salt-tolerant rhizobia native to the desert soils of United Arab Emirates. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25(2), 102.
<https://doi.org/10.9755/ejfa.v25i2.7590>

- Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (2012). *Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology*. Springer Science & Business Media.
- Soussana, J. F., & Lemaire, G. (2014). Coupling carbon and nitrogen cycles for environmentally sustainable intensification of grasslands and crop-livestock systems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 190, 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.10.012>
- Suryani, N. N., Suarna, I. W., & Duarsa, M. A. P. (2023). Botanical Composition and Forage Quality as Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Feed In Jembrana Regency, Bali Province–Indonesia. *International Journal of Life Science and Agriculture Research*, 2(11), 463-467. <https://doi.org/10.55677/ijlsar/V02I11Y2023-06>
- Suzaki, T., Takeda, N., Nishida, H., Hoshino, M., Ito, M., Misawa, F., Handa, Y., Miura, K., & Kawaguchi, M. (2019). *LACK OF SYMBIONT ACCOMMODATION* controls intracellular symbiont accommodation in root nodule and arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. *PLoS Genetics*, 15(1), e1007865. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007865>
- Velázquez, E., Carro, L., Flores-Félix, J. D., Martínez-Hidalgo, P., Menéndez, E., Ramírez-Bahena, M. H., Mulas, R., González-Andrés, F., Martínez-Molina, E., & Peix, A. (2017). The legume nodule microbiome: a source of plant growth-promoting bacteria. *Probiotics and plant health*, 41-70. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3473-2_3
- Verma, M., Singh, A., Dwivedi, D. H., & Arora, N. K. (2020). Zinc and phosphate solubilizing *Rhizobium radiobacter* (LB2) for enhancing quality and yield of loose leaf lettuce in saline soil. *Environmental Sustainability*, 3(2), 209-218. <https://doi.org/10.1007/s42398-020-00110-4>
- Vincent, J. M. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.
- World Health Organization. (2018). *The state of food security and nutrition in the world 2018: building climate resilience for food security and nutrition*. Food & Agriculture Org.
- Yelton, M. M., Yang, S. S., Edie, S. A., & Lim, S. T. (1983). Characterization of an effective salt-tolerant, fast-growing strain of *Rhizobium japonicum*. *Microbiology*, 129(5), 1537-1547. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-5-1537>
- Youseif, S. H., Abd El-Megeed, F. H., Abdelaal, A. S., Ageez, A., & Martínez-Romero, E. (2021). Plant–microbe–microbe interactions influence the faba bean nodule colonization by diverse endophytic bacteria. *FEMS microbiology ecology*, 97(11), fiab138. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab138>
- Zahran, H. H. (2001). Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of biotechnology*, 91(2-3), 143-153. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00342-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00342-X)
- Zhang, W., Y. Chen, Q. Shi, B. Hou, and Q. Yang (2020) Identification of bacteria associated with periapical abscesses of primary teeth by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries. *Microb. Pathog.* 141:103954. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103954>
- Zou, N., Dart, P. J., & Marcar, N. E. (1995). Interaction of salinity and rhizobial strain on growth and N₂-fixation by *Acacia ampliceps*. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(4-5), 409-413. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)98611-Q](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)98611-Q)