

**Tuyển chọn chủng vi khuẩn có hoạt lực cao về khả năng cố định nitơ  
và tổng hợp indole-3-acetic acid (IAA) từ đất trồng chè  
tại xã Túc Tranh, tỉnh Thái Nguyên**

**Trần Văn Chí\*, Lê Văn Hiền, Nguyễn Mạnh Tuấn, Nguyễn Thị Giang, Hoàng Thị Lan Anh**  
Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên

**Selection of highly active bacterial strains for fixing nitrogen  
and synthesizing indole-3-acetic acid (IAA) from green tea cultivation soil  
at Tuc Tranh commune, Thai Nguyen province**

**Tran Van Chi\*, La Van Hien, Nguyen Manh Tuan, Nguyen Thi Giang, Hoang Thi Lan Anh**  
Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry

\*Corresponding author: tranvanchi@tuaf.edu.vn

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.12.6.2023.003-011>

**TÓM TẮT**

Mục đích của nghiên cứu là tuyển chọn được chủng vi khuẩn có hoạt lực cao về khả năng cố định nitơ và tổng hợp Indole-3-acetic acid (IAA), nhằm hướng tới sử dụng và phát triển sản phẩm phân hữu cơ vi sinh ứng dụng trong sản xuất chè. Xử lý 30 mẫu đất trồng chè thu thập tại xã Túc Tranh, huyện Phú Lương, tỉnh Thái Nguyên đã phân lập được 5 chủng vi khuẩn đều thể hiện hoạt tính nói trên. Tuyển chọn được chủng MN72 có hoạt tính cố định nitơ và tổng hợp IAA tương ứng với 20,132  $\mu\text{g/ml NH}_4^+$  khi nuôi cấy trên môi trường Ashby và 56,619  $\mu\text{g/ml IAA}$  trên môi trường Ashby bổ sung 0,1% L-Tryptophan. So sánh trình tự gen 16S rRNA của chủng MN72 với các loài đã công bố trên ExTaxon cho thấy, chủng MN72 có mức độ tương đồng 99,85% với *Agrobacterium deltaense* YIC 4121T (MRDI01000025). Sơ đồ phả hệ chủng MN72 được sắp xếp thành một nhóm của chi *Agrobacterium*, chủng MN72 gần nhất với loài *Agrobacterium deltaense*. Do vậy, chủng MN72 được đặt tên khoa học là *Agrobacterium deltaense* MN72. Khảo sát đặc điểm nuôi cấy cho thấy chủng *Agrobacterium deltaense* MN72 có khả năng sinh 9 loại enzyme (Phosphatase alcaline, Esterase (C4), Esterase Lipase (C8), Lipase (C14), Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Phosphatase acide, Naphtol-AS-BI- phosphohydrolase và D-glucosidase), có khả năng đồng hóa các nguồn carbon, bao gồm D-glucose, Glycogen, D-mannitol, L-serine, Potassium gluconate, Lactic acid, Malic acid, Sodium acetate, L-alanin, L-rhamnose, 3-hydroxybutyric acid, âm tính với phản ứng Voges-Proskauer, có khả năng sinh Indole và chuyển hóa nitrate thành nitrite. Có thể nghiên cứu đưa chủng MN72 vào sản xuất phân bón hữu cơ vi sinh phục vụ các vùng trồng chè.

**Thông tin chung:**

Ngày nhận bài: 12/10/2023

Ngày phản biện: 14/11/2023

Ngày quyết định đăng: 04/12/2023

**Từ khóa:**

*Agrobacterium*, cố định nitơ, phân lập, tổng hợp IAA, tuyển chọn.

**ABSTRACT**

The purpose of the study is to select a bacterial strain with high nitrogen fixation and IAA biosynthesis, in order to guide for use in developing microbial organic fertilizer products, and application in tea production. From 30 green tea cultivation soil samples collected at Tuc Tranh commune - Phu Luong district - Thai Nguyen province, 5 bacterial strains were isolated, all showing the above activity. The strain MN72 was selected with nitrogen fixation activity and IAA synthesis corresponding to 20.132  $\mu\text{g/ml NH}_4^+$  when grown on Ashby medium and 56.619  $\mu\text{g/ml IAA}$  on Ashby medium supplemented with 0.1% L- Tryptophan. Comparing the 16S rRNA gene sequence of strain MN72 with species published on ExTaxon shows that strain MN72 has 99.85% similarity with *Agrobacterium deltaense* YIC 4121T (MRDI01000025). The phylogenetic tree of MN72 is arranged as a group with the genus *Agrobacterium* and strain MN72 is closest to the species *Agrobacterium deltaense*. Therefore, strain MN72 was scientifically named *Agrobacterium deltaense* MN72. Results of culture characterization showed that *Agrobacterium deltaense* MN72 was capable of producing 9 enzymes (Alcaline phosphatase, Esterase (C4), Lipase Esterase (C8), Lipase (C14), Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Acid phosphatase, Naphtol-AS-BI- phosphohydrolase and D-glucosidase), capable of assimilation of carbon sources, including D-glucose, Glycogen, D-mannitol, L-serine, Potassium gluconate, Lactic acid, Malic acid, Sodium acetate, L- alanine, L-rhamnose, 3-hydroxybutyric acid, negative for Voges-Proskauer reaction, capable of producing Indole and converting nitrate to nitrite. Research can continue to introduce strain MN72 into the production of microbial organic fertilizer to serve tea-growing areas.

**Keywords:**

*Agrobacterium*, IAA biosynthesis, Isolation, nitrogen fixation, selection.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong phát triển kinh tế nông nghiệp, chè là cây trồng chủ lực của tỉnh Thái Nguyên. Với xã Tức Tranh, huyện Phú Lương, tỉnh Thái Nguyên, chè còn là cây trồng giúp xóa đói giảm nghèo cho nông dân trong địa phương. Diện tích trồng chè tại đây khoảng trên 1000 hecta. Những năm gần đây, canh tác chè phần lớn phụ thuộc vào phân bón vô cơ, đặc biệt là đạm [1]. Việc sử dụng loại phân bón này quá mức có thể gây ra những tác động môi trường khó lường như làm ô nhiễm nước ngầm, mất độ phì nhiêu của đất, giảm đa dạng sinh học [2] và tiềm ẩn nhiều rủi ro cho con người [3]. Để khắc phục những hạn chế đó, việc sử dụng phân hữu cơ vi sinh chứa các vi sinh vật có hoạt tính kích thích sinh trưởng thực vật, cố định nitơ tự do... là một trong những giải pháp quan trọng và có ý nghĩa thực tiễn [4], vì chúng sẽ góp phần làm hạn chế việc sử dụng các loại phân bón hóa học [5].

Quá trình cố định nitơ tự do của vi sinh vật được phát hiện năm 1901 bởi Beijerinck, đây được xem là một trong những phát hiện tiêu biểu của thế kỷ 20 trong nông nghiệp [6]. Từ đó đến nay đã có nhiều nghiên cứu ứng dụng vi sinh vật có hoạt tính cố định nitơ và sinh kích thích sinh trưởng ở thực vật vào sản xuất phân hữu cơ vi sinh phục vụ phát triển nông nghiệp. Tuy nhiên, các nghiên cứu ứng dụng của nhóm vi sinh vật này cho cây chè còn khá hạn chế. Mặc dù trên thế giới đã có một số công bố về khả năng cải thiện năng suất chè khi sử dụng phân hữu cơ vi sinh trong sản xuất chè. Như nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Kellogg W.K, cho kết quả thử nghiệm bón phân hữu cơ được bổ sung thêm một số loài vi sinh vật có ích tại hai vùng trồng chè trọng điểm của Srilanka và nhận thấy năng suất chè tăng 9 - 14% so với đối chứng có bón phân hữu cơ và tăng 17% so với đối chứng không sử dụng hai loại phân bón này [7]. Công bố của Christian Bruns và Christian Schüler (2000) [8] cũng cho thấy nếu sử dụng phân hữu cơ có bổ sung thêm vi sinh vật hữu ích

bón cho chè thì chất hòa tan trong chè tăng từ 47,31% (chỉ bón phân hữu cơ) lên 51,01% (bón phân hữu cơ vi sinh). Bên cạnh đó, đã có nhiều nghiên cứu chứng minh rằng, vi khuẩn ngoài khả năng cố định nitơ còn có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng IAA, cũng như tăng cường khả năng hấp thụ lân và các hợp chất hữu cơ khác cho cây trồng [9-13].

Để sản xuất phân bón có chứa chủng vi sinh cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA, phải có chủng vi sinh vật có hoạt tính cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA cao, sức cạnh tranh lớn, thích hợp với loại cây trồng ở nhiều vùng sinh thái khác nhau. Vì vậy, công tác phân lập, tuyển chọn chủng vi sinh vật có hoạt tính cố định nitơ, sinh tổng hợp IAA và đánh giá đặc tính sinh học là rất cần thiết.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Dụng cụ và hóa chất

#### 2.1.1. Dụng cụ

Các dụng cụ, thiết bị của phòng thí nghiệm của Trung tâm Môi trường Tài nguyên Miền núi và Khoa Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên.

#### 2.1.2. Hóa chất, môi trường

L-Tryptophan (Sigma - Mỹ), Agar (Biobasic - Canada),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma - Mỹ),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Sigma - Mỹ), NaCl (Biobasic - Canada),  $\text{CaCO}_3$  (Biobasic - Canada),  $\text{FeCl}_2$  (Sigma - Mỹ),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Sigma - Mỹ), HCl (Sigma - Mỹ), NaOH (Merck - Đức),  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (Sigma - Mỹ), dung dịch thử Nessler (Sigma - Mỹ), Mannitol (Sigma - Mỹ), Glucose (Sigma - Mỹ), p-dimethylaminobenzaldehyde (Sigma - Mỹ), Methyl đỏ (Biobasic - Canada), (Kit API (BioMérieux).

Môi trường Ashby's Manitol Agar (Himedia - Ấn Độ) thành phần gồm: Manitol 20 gam;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,2 gam;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2 gam; NaCl 0,2 gam,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,1 gam;  $\text{CaCO}_3$  5 gam; agar 15 gam; nước cất 1000 ml; pH 7-7,2.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

**2.2.1. Phương pháp thu mẫu**

Thực hiện thu mẫu đất ở các nương chè kinh doanh (5 năm tuổi, trồng giống chè trung du) tại xã Túc Tranh, huyện Phú Lương, tỉnh Thái Nguyên theo TCVN 7538-6:2010 [14]. Mẫu được lấy ở độ sâu 6 – 15 cm, sau khi đã loại bỏ khoảng 3-5 cm phần đất và tàn dư thực vật. Tổng số 30 mẫu, được thu thập tại một số xóm, bao gồm: Khe Cốc (10 mẫu), Quyết Thắng (10 mẫu), Quyết Tiến (10 mẫu).

**2.2.2. Phương pháp phân lập vi khuẩn**

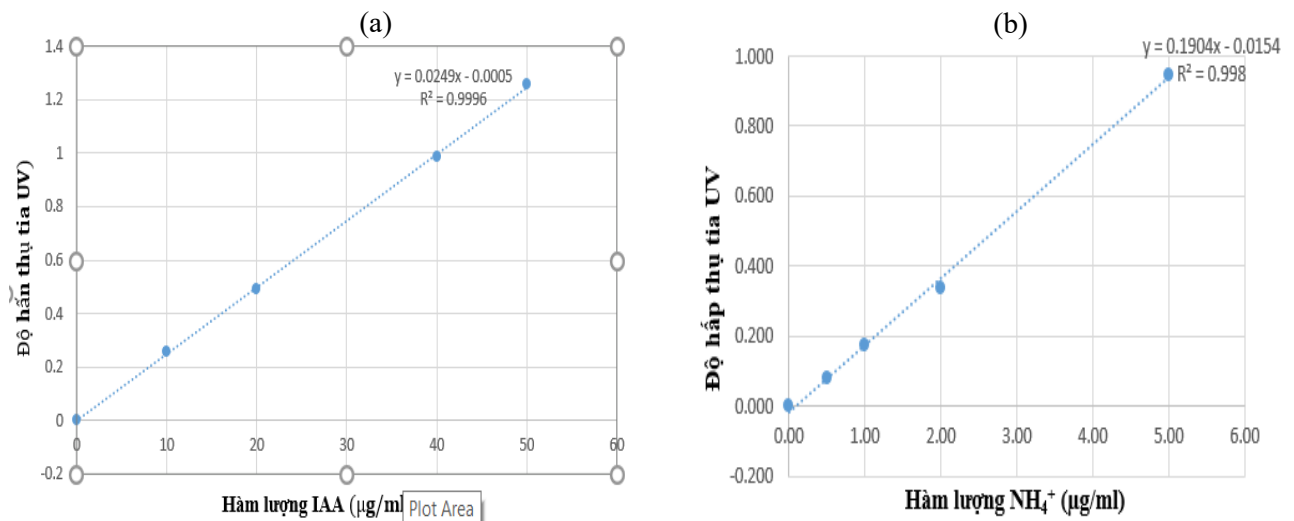
Các mẫu đất được nghiền mịn, pha loãng đến các cấp độ  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  trong các ống nghiệm chứa nước muối sinh lý (0,85%) đã vô trùng. Các chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ được phân lập theo phương pháp của Koch, nuôi cấy trên môi trường đặc vô đạm

Ashby [15].

**2.2.3 Phân tích chỉ tiêu chất lượng**

Định tính khả năng sinh tổng hợp IAA của vi khuẩn bằng cách bổ sung thuốc thử Salkowski vào dịch nuôi cấy các chủng vi khuẩn, dịch nuôi sẽ chuyển sang màu đỏ nếu có IAA theo TCVN10784:2015 [16].

Xác định khả năng sinh IAA: Vi khuẩn được nuôi trong môi trường lỏng Ashby có bổ sung 0,1% Tryptophan, nuôi lắc 180 vòng/phút ở 30°C trong 6 ngày. Hàm lượng IAA thô sinh ra trong dịch nuôi được xác định bằng phương pháp phản ứng màu với thuốc thử Salkowski tạo ra sản phẩm có màu, so màu trên máy quang phổ ở bước sóng 530 nm. Dựa vào đồ thị chuẩn IAA (Hình 1a) sẽ xác định được hàm lượng IAA [17].



**Hình 1. Đồ thị chuẩn**  
**(a) chuẩn IAA; (b) chuẩn NH<sub>4</sub><sup>+</sup>**

Phương pháp xác định khả năng cố định nitơ: Nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy Ashby lỏng, nuôi lắc 180 vòng/phút ở 30°C trong 6 ngày. Ly tâm thu dịch trong và xác định nồng độ NH<sub>4</sub><sup>+</sup> được cố định bởi chủng vi khuẩn trong dịch nuôi bằng phương pháp so màu với thuốc thử Nessler [18], sử dụng đường chuẩn ammonium (Hình 1b) để tính kết quả.

Xác định đặc điểm sinh hóa của chủng tuyển chọn bằng kit API (ZYM, 32GN, 20NE) của Biomérieux được hướng dẫn bởi nhà sản xuất.

Định danh phân tử và xây dựng sơ đồ phả hệ: Chủng tuyển chọn được hoạt hóa trong môi trường dịch thể Ashby ở 30°C với tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 72 giờ. Thu nhận sinh khối tế bào của chủng tuyển chọn và tách chiết DNA tổng số theo phương pháp của Sambrook và Russell (2001) [19]. Sử dụng cặp mồi 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' và 1492R 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' [20] để nhân trình tự gen 16S rRNA của chủng tuyển chọn. Trình tự gen 16S rRNA của chủng tuyển

chọn được đọc trình tự thông qua hệ thống Applied Biosystems 3730 xl DNA analyzer sử dụng Big Dye terminator cycle sequencing kit v.3.1 (Macrogen, Hàn Quốc). Trình tự gen 16S rRNA được so sánh với dữ liệu công bố trên EzTaxon [21]. Sơ đồ phả hệ của chủng tuyển chọn được xây dựng dựa vào trình tự gen 16S rRNA của chúng và các loài gần nhất thông qua phần mềm MEGA 7 [22].

#### 2.2.4. Xử lý số liệu

Tất cả các số liệu thu thập là đại diện của 3 thí nghiệm lặp lại. Kết quả thí nghiệm được phân tích phương sai một nhân tố trên phần mềm SPSS 20.0 và Microsoft Excel. Sự khác biệt của giá trị trung bình giữa các công thức được đánh giá nhờ kiểm định Duncan ở độ tin cậy 95%.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

**Bảng 1. Kết quả phân lập vi khuẩn có khả năng cố định nitơ và tổng hợp IAA từ mẫu đất trồng chè tại xã Tức Tranh, huyện Phú Lương, tỉnh Thái Nguyên**

Ký hiệu chủng	Địa điểm lấy mẫu	Đặc điểm hình thái khuẩn lạc	Đặc điểm hình thái tế bào	Tính chất Gram	Khả năng di động	Khả năng cố định nitơ	Khả năng tổng hợp IAA
MN72	Quyết Thắng	Trong, lồi tròn, bề mặt bóng, không rìa, nhót	Que ngắn	-	+	+	+
MN73	Quyết Thắng	Trắng sữa, lồi tròn, không rìa, trơn	Que ngắn	-	+	+	+
MN74	Quyết Tiến	Trong, lồi tròn, bề mặt bóng, không rìa	Que ngắn	-	+	+	+
MN75	Khe Cốc	Trắng ngà, tròn dẹt, bề mặt ráp, không rìa	Que ngắn	-	+	+	+
MN76	Khe cốc	Trong, lồi tròn, có nhân, không rìa	Cầu	-	+	+	+

Ghi chú: (-) Gram âm/không có khả năng; (+) Gram dương/có khả năng.

Kết quả Bảng 1 cho thấy, khuẩn lạc của các chủng phân lập được có dạng hình tròn, màu trắng sữa, trong và trắng ngà, bề mặt trơn bóng hoặc thô ráp, không rìa. Tế bào có dạng que ngắn và hình cầu, chúng đều có khả năng di động và thể hiện tính chất Gram âm. Như vậy 5 chủng vi sinh vật mới phân lập được có nhiều đặc điểm về hình thái khuẩn lạc và hình thái tế

#### 3.1. Kết quả phân lập chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA từ đất trồng chè tại xã Tức Tranh, huyện Phú Lương, tỉnh Thái Nguyên

Từ 30 mẫu đất thu tại một số nương chè của các xóm Khe Cốc, Quyết Thắng, Quyết Tiến thuộc xã Tức Tranh, huyện Phú Lương, tỉnh Thái Nguyên, tiến hành xử lý mẫu và các bước phân lập trên môi trường Ashby chọn lọc, kết quả phân lập được 5 chủng vi khuẩn. Các chủng vi khuẩn phân lập được có khả năng sống trên môi trường vô đạm (Ashby) cho phép kết luận sơ bộ rằng chúng có khả năng cố định nitơ. Kết quả phân tích định tính cho thấy cả 5 chủng đều có khả năng tổng hợp IAA. Một số đặc điểm: hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào, tính chất Gram và khả năng di động của các chủng mới phân lập được thể hiện qua Bảng 1.

bào khá khác nhau, nhưng chúng đều có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA. 5 chủng này sẽ được tiếp tục nghiên cứu để lựa chọn ra chủng có hoạt lực cố định nitơ và tổng hợp IAA mạnh nhất.

#### 3.2. Tuyển chọn chủng vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA cao

Trong nghiên cứu này, việc tuyển chọn

chủng vi sinh vật căn cứ vào 2 tiêu chí: (1) hàm lượng  $\text{NH}_4^+$  tạo ra trong môi trường vô đạm - Ashby và (2) hàm lượng IAA được tạo ra trong môi trường Ashby có bổ sung 0,1% L-

Tryptophan. Kết quả đánh giá 2 tiêu chí trên của 5 chủng vi sinh vật phân lập được khi nuôi cấy chúng trong môi trường tương ứng sau 6 ngày thể hiện qua Bảng 2.

**Bảng 2. Hoạt tính cố định nitơ và tổng hợp IAA của các chủng đã phân lập được**

Ký hiệu chủng	Khả năng tổng hợp IAA ( $\mu\text{g/ml}$ )	Khả năng cố định nitơ ( $\mu\text{g/ml}$ )
MN72	56,619 <sup>a</sup>	20,132 <sup>a</sup>
MN73	22,138 <sup>b</sup>	8,117 <sup>b</sup>
MN74	14,881 <sup>d</sup>	5,126 <sup>d</sup>
MN75	8,215 <sup>e</sup>	2,016 <sup>e</sup>
MN76	16,468 <sup>c</sup>	6,975 <sup>c</sup>

Ghi chú: Các chữ trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức  $\alpha \leq 0,05$ .

Kết quả Bảng 2 đã khẳng định nhận định ở trên (5 chủng đều có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA) là đúng. Tuy nhiên hoạt lực cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA của 5 chủng là khác nhau. Chủng MN75 có hoạt lực yếu nhất, với khả năng cố định nitơ 2,016  $\mu\text{g/ml}$ , khả năng tổng hợp IAA 8,215  $\mu\text{g/ml}$ . Trong khi đó, hoạt lực mạnh nhất là chủng MN72 với khả năng cố định nitơ 20,132  $\mu\text{g/ml}$ , khả năng tổng hợp IAA 56,619  $\mu\text{g/ml}$ .

Hoạt lực tổng hợp IAA và cố định nitơ của chủng MN72 cao hơn so với kết quả công bố của Nguyễn Anh Huy và Nguyễn Hữu Hiệp (2018) [13] khi nghiên cứu khả năng cố định nitơ và tổng hợp IAA của chủng vi khuẩn PL9 được phân lập từ vùng đất sản xuất lúa-tôm ở Bạc Liêu với khả năng cố định nitơ đạt 1,78  $\mu\text{g/ml}$  và tổng hợp IAA đạt 35,8  $\mu\text{g/ml}$  sau 6 ngày nuôi. Kết quả này cũng cao hơn so với công bố của Nguyễn Thị Thu Hằng và Nguyễn Thị Thủy (2015) [18] với chủng AZT1 và AZT7 được phân lập từ đất trồng lúa ở Hà Nội, chúng có khả năng cố định nitơ phân tử thành nitơ dạng ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) tương ứng là 3,36  $\mu\text{g/ml}$  và 3,32  $\mu\text{g/ml}$  và tổng hợp IAA tương ứng là 10,11  $\mu\text{g/ml}$  và 12,87  $\mu\text{g/ml}$ . Khả năng cố định nitơ của chủng MN72 tương đương khả năng cố định nitơ của chủng MN26 (20,822  $\mu\text{g/ml}$ ) được công bố bởi Trần Văn Chí và cộng sự (2022) [23] khi tuyển chọn chủng vi khuẩn

có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA trong đất trồng cà chua ở một số xã, phường tại tỉnh Thái Nguyên.

Như vậy, chủng MN72 là chủng có hoạt lực cố định nitơ và tổng hợp IAA cao nhất trong 5 chủng đã được phân lập và cao hơn so hoặc tương đương với một số công bố trước đó. Do vậy, chủng MN72 được tuyển chọn phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

### 3.3. Xác định đặc điểm sinh học của chủng vi sinh vật được tuyển chọn

#### 3.3.1. Định danh chủng vi sinh vật được tuyển chọn

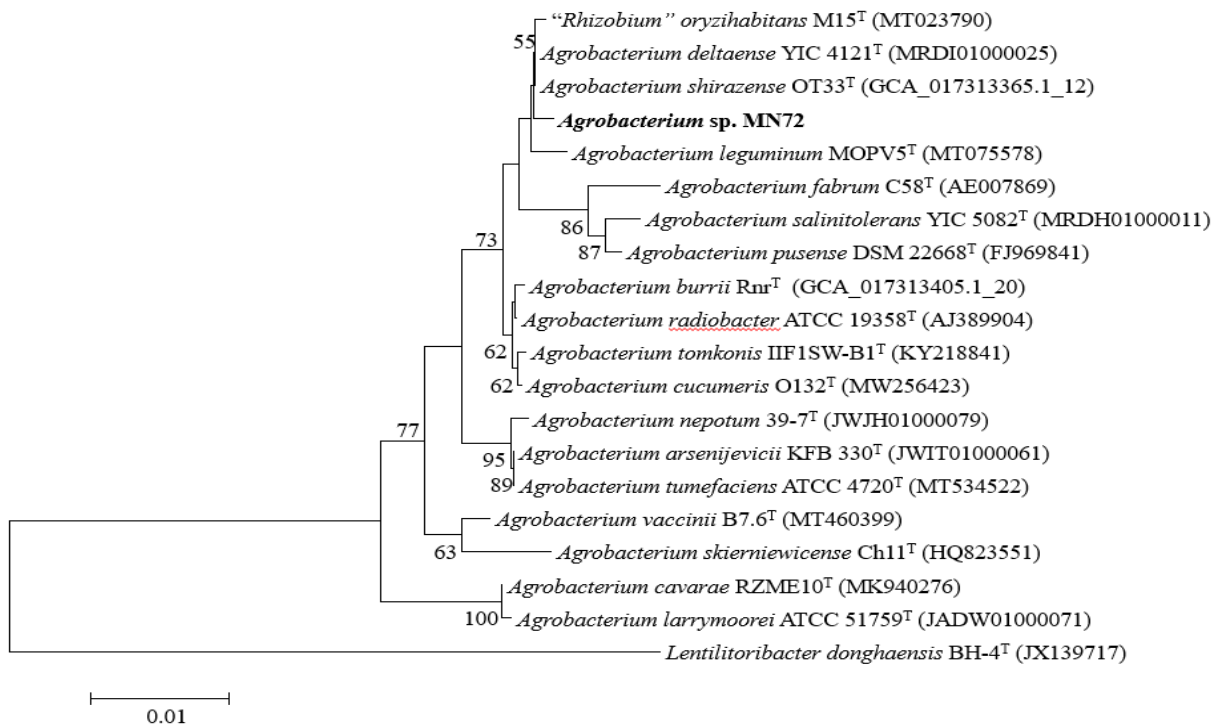
Kết quả so sánh trình tự gen 16S rRNA của chủng MN72 với các loài đã công bố trên ExTaxon được trình bày tại Bảng 3 cho thấy, chủng MN72 có mức độ tương đồng 99,85% với *Agrobacterium deltaense* YIC 4121T (MRDI01000025) và *Agrobacterium shirazense* OT33T (GCA\_017313365.1\_12), 99,77% với "*Rhizobium*" *oryzihabitans* M15T (MT023790), 99,62% với *Agrobacterium cucumeris* O132T (MW256423), 98,55 – 99,54% với các thành viên khác của chi *Agrobacterium*. Dựa vào kết quả nhận diện mức độ tương đồng (%) giữa trình tự gen 16S rRNA của chủng MN72 và các loài gần nhất cho thấy chủng MN72 là thành viên của chi *Agrobacterium* [24].

**Bảng 3. So sánh sự tương đồng về trình tự gen 16S rRNA của chủng MN72 với các loài gần nhất công bố trên dữ liệu EzTaxon**

Loài gần nhất	Mức độ tương đồng (%)	Số nucleotide sai khác
<i>Agrobacterium deltaense</i> YIC 4121 <sup>T</sup> (MRDI01000025)	99,85	2/1312
<i>Agrobacterium shirazense</i> OT33 <sup>T</sup> (GCA_017313365.1_12)	99,85	2/1312
“ <i>Rhizobium</i> ” <i>oryzihabitans</i> M15 <sup>T</sup> (MT023790)	99,77	3/1310
<i>Agrobacterium cucumeris</i> O132 <sup>T</sup> (MW256423)	99,62	5/1312
<i>Agrobacterium radiobacter</i> ATCC 19358 <sup>T</sup> (AJ389904)	99,54	6/1312
<i>Agrobacterium tomkonis</i> IIF1SW-B1 <sup>T</sup> (KY218841)	99,54	6/1312
<i>Agrobacterium leguminum</i> MOPV5 <sup>T</sup> (MT075578)	99,54	6/1311
<i>Agrobacterium burrii</i> Rnr <sup>T</sup> (GCA_017313405.1_20)	99,47	7/1312
<i>Agrobacterium pusense</i> DSM 22668 <sup>T</sup> (FJ969841)	99,24	10/1312
<i>Agrobacterium salinitolerans</i> YIC 5082 <sup>T</sup> (MRDH01000011)	99,16	11/1312
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATCC 4720 <sup>T</sup> (MT534522)	98,86	15/1312
<i>Agrobacterium arsenijevicii</i> KFB 330 <sup>T</sup> (JWIT01000061)	98,86	15/1312
<i>Agrobacterium nepotum</i> 39/7 <sup>T</sup> (JWJH01000079)	98,70	17/1312
<i>Agrobacterium fabrum</i> C58 <sup>T</sup> (AE007869)	98,55	19/1312

Sơ đồ phả hệ (Hình 2) cũng cho thấy chủng MN72 sắp xếp thành một nhóm của chi *Agrobacterium*, trong đó có cả *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 4720<sup>T</sup> (MT534522) - là loài chuẩn của chi *Agrobacterium* (<https://lpsn.dsmz.de/species/agrobacterium->

*tumefaciens*). Từ kết quả phân tích hình thái khuẩn lạc, một số đặc điểm sinh học và so sánh trình tự gen 16S rRNA xác định chủng MN72 thuộc chi *Agrobacterium*, với tên gọi khoa học là *Agrobacterium deltaense* MN72.



**Hình 2. Sơ đồ phả hệ của chủng MN72 với các loài đã công bố dựa vào trình tự gen 16S rRNA. *Lentilitoribacter donghaensis* BH-4<sup>T</sup> (JX139717) được sử dụng là ngoài chi *Agrobacterium***

**3.3.2. Đánh giá một số đặc điểm hóa sinh của chủng *Agrobacterium deltaense* MN72**

Thông tin về đặc điểm hóa sinh của chủng vi sinh vật là cần thiết, phục vụ cho những nghiên cứu ứng dụng về thiết kế và tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy, đồng thời bổ sung thêm vào cơ sở dữ

liệu về nguồn gen vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA. Sử dụng kit API để xác định một số đặc điểm hóa sinh của chủng *Agrobacterium deltaense* MN72, kết quả được thể hiện qua Bảng 4.

**Bảng 4. Một số đặc điểm nuôi cấy của chủng *Agrobacterium deltaense* MN72**

STT	Đặc điểm hóa sinh khảo sát	Thể hiện của chủng MN72	STT	Đặc điểm hóa sinh khảo sát	Thể hiện của chủng MN72
1	Phosphatase alcaline	+	20	Đồng hóa D-glucose	+
2	Esterase (C4)	+	21	Đồng hóa Phenylacetic acid	-
3	Esterase Lipase (C8)	+	22	Đồng hóa Glycogen	+
4	Lipase (C14)	+	23	Đồng hóa D-mannitol	+
5	Leucine arylamidase	+	24	Đồng hóa L-serine	+
6	Valine arylamidase	+	25	Đồng hóa D-maltose	-
7	Cystine arylamidase	-	26	Đồng hóa Potassium gluconate	+
8	Trypsine	-	27	Đồng hóa Capric acid	-
9	D-chymotrypsine	-	28	Đồng hóa Lactic acid	+
10	Phosphatase acide	+	29	Đồng hóa Malic acid	+
11	Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	30	Đồng hóa Sodium acetate	+
12	D-galactosidase	-	31	Đồng hóa Trisodium citrate	-
13	$\beta$ -galactosidase	-	32	Đồng hóa L-alanin	+
14	$\beta$ -glucuronidase	-	33	Đồng hóa L-rhamnose	+
15	D-glucosidase	-	34	Đồng hóa D-ribose	-
16	$\beta$ -glucosidase	+	35	Đồng hóa 3-hydroxybutyric acid	+
17	N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase	-	36	Phản ứng Voges-Proskauer	-
18	D-mannosidase	-	37	Chuyển hóa nitrate thành nitrite	+
19	D-fucosidase	-	38	Sinh Indole	+

Ghi chú: (-) âm tính/không có khả năng; (+) dương tính/có khả năng.

Kết quả Bảng 4 cho thấy chủng *Agrobacterium deltaense* MN72 có khả năng sinh 9 loại enzyme (Phosphatase alcaline, Esterase (C4), Esterase Lipase (C8), Lipase (C14), Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Phosphatase acide, Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\beta$ -glucosidase), có khả năng đồng hóa các nguồn carbon, bao gồm D-glucose, Glycogen D-mannitol, L-serine, Potassium gluconate, Lactic acid, Malic acid, Sodium acetate, L-alanin, L-rhamnose, 3-

hydroxybutyric acid; có khả năng sinh Indole và chuyển hóa nitrate thành nitrite.

Tại Việt Nam, chưa có công bố về loài *Agrobacterium deltaense*. Tuy nhiên, trên thế giới đã có công bố của Jun Yan và cộng sự (2017) [25] về loài này. Jun Yan và cộng sự đã phân lập được chủng *Agrobacterium deltaense* sp. nov. từ nốt sần của cây diên điển (*Sesbania cannabina*) trồng tại Dongying, vùng châu thổ Sông Hoàng Hà tại tỉnh Sơn Đông của Trung Quốc. Về đặc điểm hình thái tế bào, hình thái

khuẩn lạc và tính chất Gram khá tương đồng với chủng *Agrobacterium deltaense* MN72. Về đặc điểm sinh hóa, chủng *Agrobacterium deltaense* MN72 và *Agrobacterium deltaense* sp. nov. cũng có một số tương đồng như khả năng đồng hóa Glycogen, 3-hydroxybutyric acid, L-alanin, D-glucose, không đồng hóa Phenylacetic acid và âm tính với phản ứng Voges-Proskauer. Điều đặc biệt là chủng *Agrobacterium deltaense* MN72 có khả năng chuyển hóa nitrate thành nitrite và có khả năng sinh indole, đặc tính này không có ở chủng *Agrobacterium deltaense* sp. nov.

#### 4. KẾT LUẬN

Đã phân lập được 5 chủng vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA từ 30 mẫu đất trồng chè thu tại một số nương chè ở xã Túc Tranh, huyện Phú Lương, tỉnh Thái Nguyên. Tuyển chọn được 1 chủng có hoạt lực cố định nitơ và tổng hợp IAA mạnh nhất, với khả năng cố định nitơ 20,132 µg/ml và khả năng tổng hợp IAA 56,619 µg/ml. Sử dụng trình tự 16S rRNA để định danh, cụ thể đã đưa ra danh pháp khoa học của chủng tuyển chọn là *Agrobacterium deltaense* MN72. Chủng *Agrobacterium deltaense* MN72 có khả năng sinh 9 loại enzyme (Phosphatase alkaline, Esterase (C4), Esterase Lipase (C8), Lipase (C14), Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Phosphatase acide, Naphtol-AS-BI- phosphohydrolase và D-glucosidase); có khả năng đồng hóa các nguồn carbon, bao gồm D-glucose, Glycogen, D-mannitol, L-serine, Potassium gluconate, Lactic acid, Malic acid, Sodium acetate, L-alanin, L-rhamnose, 3-hydroxybutyric acid; âm tính với phản ứng Voges-Proskauer; có khả năng sinh Indole và chuyển hóa nitrate thành nitrite.

#### Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được thực hiện với sự tài trợ kinh phí từ đề tài khoa học công nghệ cấp Quốc gia của Bộ Khoa học và Công nghệ, mã số NVQG-2021/ĐT.04. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn Chương trình.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyễn Văn Quảng (2017). Nghiên cứu phát triển cây chè đạt tiêu chuẩn VietGAP tại Tây Nguyên. Báo cáo tổng kết đề tài cấp Bộ, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên.
- [2]. Alok Kumar Yadav, Saurabh Saraswat, Preeti Sirohi, Manjoo Rani, Sameer Srivastava, Manish Pratap Singh & Nand K. Singh (2017). Antimicrobial Action of Methanolic Seed Extracts of *Syzygium cumini* Linn. on *Bacillus subtilis*. *AMB Express*. 7: 196. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0500-4>.
- [3]. Ladha J.K., Himanshu P., Timothy J.K, J. Six & Chris V.K. (2005). Efficiency of fertilizer Nitrogen in cereal production: Retrospects and prospects. *Advances in Agronomy*. 87: 85-156.
- [4]. Lê Thị Thanh Thủy, Lê Như Kiều, Nguyễn Thị Thu Hằng, Trần Thị Huệ, Lê Thị Giang & Nguyễn Thị Hiền (2012). Tuyển chọn các chủng vi sinh vật hữu ích để sản xuất phân hữu cơ vi sinh cho cây chè ở Yên Bái. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*. 5(23): 120-127.
- [5]. Orr H.C., James A., Leifert C., Cooper J.M. & Cummings S.P. (2011). Diversity and activity of free-living nitrogen-fixing bacteria and total bacteria in organic and conventionally managed soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 77: 911-919.
- [6]. Wagner S.C. (2011). Biological Nitrogen Fixation. *Nature Education Knowledge*. 3(10):15
- [7]. Kellogg, W. K. Foundation (1997). The compost connection for Washington Agriculture. Washington State University Cooperative Extension. 5.
- [8]. Christian Bruns & Christian Schüler (2000). Suppressive effects of yard waste compost amended growing media on soilborne plant pathogens in organic horticulture. University of Kassel, International Rural Development and Environmental Protection.
- [9]. Samina M. & George L. (2006). Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microbial Ecology*. 51: 326-335.
- [10]. Rodrigues A.A, Forzani M.V., De Souza Soares R., Sibov S.T., Daniel J. & Vieira G. (2016). Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. *Pesq. Agropec. Trop*. 46: 149-158.
- [11]. Giassi V., Kiritani C. & Kupper K.C. (2016). Bacteria as growth-promoting agents for citrus rootstocks. *Microbiological Research*. 190: 46-54.
- [12]. Anjali Chauhan, Guleria S., Balgir P.P., Walia A., Mahajan R., Mehta P. & Shirkot C.K. (2017). Tricalcium phosphate solubilization and nitrogen fixation by newly isolated *Aneurinibacillus aneurinilyticus* CKMV1 from



rhizosphere of *Valeriana jatamansi* and its growth promotional effect. *Braz J Microbiol.* 48: 294-304.

[13]. Nguyễn Anh Huy & Nguyễn Hữu Hiệp (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, Đại học Cần Thơ.* 54(1B): 7 – 12.

[14]. Bộ Khoa học và Công nghệ (2010). TCVN 7538-6:2010. Phần 6: Hướng dẫn về thu thập, xử lý và bảo quản mẫu đất ở điều kiện hiếu khí để đánh giá các quá trình hoạt động, sinh khối và tính đa dạng của vi sinh vật trong phòng thí nghiệm.

[15]. Phạm Thị Ngọc Lan & Nguyễn Thị Việt (2016). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cố định Nitrogen từ đất rừng ngập mặn ở Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Trường Đại học Khoa học – Đại học Huế.* 4(1): 63-72.

[16]. Bộ Khoa học và Công nghệ (2015). TCVN 10784:2015: Vi sinh vật – Xác định khả năng sinh tổng hợp axit 3-Indol-acetic (IAA).

[17]. Glickmann E. & Dessaux Y. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Apply Environ Microbiol.* 61: 793-795.

[18]. Nguyễn Thị Thu Hằng & Nguyễn Thị Thủy (2015). Tuyển chọn vi khuẩn *Azotobacter* có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp.* 4: 3 – 9.

[19]. Sambrook J., & Russell D.W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1-170.

[20]. Lane D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, E. Stackebrandt, M. Goodfellow (eds). John Wiley and Sons, New York. 115-175.

[21]. Chun J., Lee JH., Jung Y., Kim M., Kim S., Kim B.K. & Lim Y.W. *EzTaxon* (2007). A web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57(Pt 10):2259-2261.

[22]. Kumar S., Stecher G. & Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution.* 33(7):1870-1974.

[23]. Trần Văn Chí, Nguyễn Mạnh Tuấn, Ngô Xuân Bình, Nguyễn Duy Dũng, Lê Văn Hiền, Nguyễn Đức Tuấn, Nguyễn Xuân Vũ & Phạm Thị Tuyết Mai (2022). Tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ và tổng hợp Indole-3-acetic acid (IAA) từ đất trồng cà chua ở một số xã, phường tại tỉnh Thái Nguyên. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.* 20(12): 1599-1607.

[24]. H. P. Browne, S. C. Forster & B. O. (2016). Anonye “Culturing of “unculturable” human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation”. *Nature.* 533:543-546.

[25]. Jun Yan, Yan Li, Xiao Zeng Han, Wen Feng Chen, Wen Xiu Zou, Zhihong Xie & Meng Li (2017). *Agrobacterium deltaense* sp. nov., an endophytic bacteria isolated from nodule of *Sesbania cannabina*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. *Arch Microbiol.* DOI: 10.1007/s00203-017-1367-0