

**Phân lập, 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 ngô tại tỉnh Thái Nguyên và Hà Giang**

**Hoàng Thị Lan Anh¹, Nguyễn Thanh Hải¹, Nguyễn Thị Giang¹,
Phạm Thị Tuyết Mai¹, Nguyễn Mạnh Tuấn², Trần Văn Chí^{1*}**

¹Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

²Viện Khoa học Sự sống, Đại học Thái Nguyên

**Isolate and select bacterial strains with high activity in nitrogen fixation
and indole-3-acetic acid (IAA) synthesis from corn growing soil
in Thai Nguyen and Ha Giang provinces**

**Hoang Thi Lan Anh¹, Nguyen Thanh Hai¹, Nguyen Thi Giang¹,
Pham Thi Tuyen Mai¹, Nguyen Manh Tuan¹, Tran Van Chi^{1*}**

¹Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry, Thai Nguyen University

²Institute of Life Sciences, Thai Nguyen University

*Corresponding author: tranvanchi@tuaf.edu.vn

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.14.3.2025.003-011>

TÓM TẮT

Nghiên cứu này tập trung phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất chế phẩm sinh học để phục vụ sản xuất nông nghiệp xanh và bền vững. Từ 12 mẫu đất trồng ngô thu thập tại Thái Nguyên và Hà Giang đã phân lập được 3 chủng vi khuẩn đều có khả năng cố định nitơ và tổng hợp IAA. Từ đó tuyển chọn được chủng MN88 với hoạt tính cố định nitơ trên môi trường Ashby đạt 20,499 µg/ml NH₄⁺ và sinh tổng hợp IAA trên môi trường Ashby bổ sung 0,1% L-Tryptophan đạt 68,19 µg/ml IAA. So sánh trình tự gen 16S rRNA của chủng MN88 với các loài đã công bố trên ExTaxon cho thấy, chủng MN88 có mức độ tương đồng 99,2% với *Bacillus tropicus* N24T (MACG01000025). Sơ đồ tiến hóa dựa vào trình tự gen 16S rRNA giữa chủng MN88 và các loài gần nhất bộ tộc chủng MN88 thuộc chi *Bacillus* và gần nhất với loài *Bacillus tropicus* N24T. Do vậy, chủng MN88 được đặt tên khoa học là *Bacillus tropicus* MN88. Khảo sát đặc điểm hóa sinh cho thấy chủng *Bacillus tropicus* MN88 có khả năng sinh 12 loại enzyme (Phosphatase alkaline, Esterase (C4), Esterase Lipase (C8), Lipase (C14), Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Cystine arylamidase, D-chymotrypsine, Phosphatase acide, Naphtol-AS-BI- phosphohydrolase, D-glucosidase và catalase). Bên cạnh đó, chủng MN88 có khả năng đồng hóa một số nguồn carbon như: D-glucose, L-arabinose, D- mannose, D-mannitol, N-acetyl-glucosamine, D-maltose, L-arginine, Gelatin, Trisodium citrate, D-ribose; không có khả năng đồng hóa D-saccharose, D-sorbitol và Urea, âm tính với phản ứng Voges-Proskauer, sinh Indole và chuyển hóa nitrate thành nitrite.

ABSTRACT

This study focused on isolating and selecting some bacterial strains with potential applications in the production of biological products to serve green and sustainable agricultural production. From 12 corn soil samples collected in Thai Nguyen and Ha Giang, 3 bacterial strains were isolated, all of which can fix nitrogen and synthesize IAA. Strain MN88 was selected with nitrogen fixation activity on Ashby medium reaching 20.499 µg/ml NH₄⁺ and IAA biosynthesis on Ashby medium supplemented with 0.1% L-Tryptophan reaching 68.19 µg/ml IAA.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 12/03/2025

Ngày phản biện: 14/04/2025

Ngày quyết định đăng: 09/05/2025

Từ khóa:

Bacillus, cố định nitơ,
tổng hợp IAA, tuyển chọn,
vi khuẩn.

Keywords:

Bacillus, bacteria, IAA
biosynthesis, nitrogen fixation,
selection.

Comparing the 16S rRNA gene sequence of strain MN88 with species published on ExTaxon showed that strain MN88 has a similarity level of 99.2% with Bacillus tropicus N24T (MACG01000025). An evolutionary diagram based on 16S rRNA gene sequence between strain MN88 and its closest species. Strain MN88 belongs to the genus Bacillus and is closest to species Bacillus tropicus N24T. Therefore, the MN88 strain is scientifically named Bacillus tropicus MN88. Results of culture characterization showed that strain Bacillus tropicus MN88 could produce 12 types of enzymes (Alcaline Phosphatase, Esterase (C4), Esterase Lipase (C8), Lipase (C14), Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Cystine arylamidase, D-chymotrypsine, Acid Phosphatase, Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase, D-glucosidase and catalase). In addition, the MN88 strain was capable of assimilating of various carbon sources including D-glucose, L-arabinose, D-mannose, D-mannitol, N-acetyl-glucosamine, D-maltose, L-arginine, Gelatin, Trisodium citrate, D-ribose; unable to assimilate D-saccharose, D-sorbitol and urea, negative for Voges-Proskauer reaction, produces indole and converts nitrate to nitrite.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tại Việt Nam, ngô là loại cây lương thực quan trọng thứ hai sau lúa. Trồng ngô luôn đòi hỏi lượng phân bón rất lớn [1], trong đó đạm là nguyên tố rất quan trọng ảnh hưởng đến các quá trình sinh trưởng, phát triển và năng suất của cây. Nếu thiếu đạm, cây tăng trưởng chậm và hạt lép, nhưng lượng đạm bón thường chỉ được cây hấp thu khoảng 30-40% còn lại đi vào chu trình N_2 của trái đất, chúng làm đất bị chai cứng, ô nhiễm mạch nước ngầm... [2]. Bên cạnh đó, sản xuất phân đạm hóa học theo con đường Haber-Bosch đòi hỏi nhiều nhiệt lượng từ than đá, do đó sẽ tạo ra một lượng lớn khí CO_2 – một trong những nguyên nhân gây ra hiệu ứng nhà kính [3]. Như vậy, việc sử dụng phân đạm hóa học trong trồng trọt nói chung và trồng ngô nói riêng là nguyên nhân góp phần dẫn đến sự ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng đến đời sống và sức khỏe của con người. Trong khi đó, lượng N_2 trong không khí chiếm đến 78% mà cây lại không sử dụng được [4]. Trong khi đó, nhiều loại vi khuẩn trong đất có thể tổng hợp đạm nhờ quá trình cố định nitơ sinh học với enzyme nitrogenase cắt nối ba của phân tử N_2 tạo ra NH_3 [5]. Quá trình cố định nitơ tự do của vi sinh vật được phát hiện lần đầu tiên năm 1901 bởi Beijerinck, đây được xem là một trong những phát hiện tiêu biểu của thế kỷ 20

trong nông nghiệp [6].

Indole-3-acetic acid (IAA) là những phytohormone tăng trưởng thực vật họ auxin [7]. Trong quá trình sinh trưởng, ngoài IAA nội sinh, thực vật còn nhận được một lượng IAA ngoại sinh từ các nhóm vi sinh vật sống ở vùng rễ như *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Bacillus* và *Serratia* [8]. 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].

Hướng đến một nền nông nghiệp xanh và bền vững, xu thế tất yếu là sử dụng chế phẩm sinh học và phân bón hữu cơ vi sinh, trong đó có nhóm vi khuẩn vừa có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA. 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 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 nói trên và đánh giá đặc tính sinh học của chúng là rất cần thiết.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các chủng vi khuẩn được phân lập từ 12 mẫu

đất trồng ngô thu thập tại Bình Sơn – Thành phố Sông Công, xã Tràng Xá – huyện Võ Nhai – tỉnh Thái Nguyên và xã Lũng Cú – huyện Đồng Văn – tỉnh Hà Giang.

2.2. Hóa chất, môi trường

L-Tryptophan, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, FeCl_2 , H_2SO_4 , HCl , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, dung dịch thử Nessler, Mannitol, Glucose, p-dimethylaminobenzaldehyde của hãng Sigma - Mỹ. Agar, NaCl , CaCO_3 , Methyl đỏ của hãng Biobasic – Canada. NaOH của hãng Merck - Đức. Kit API của BioMérieux – Pháp.

2.3. Phương pháp bố trí thí nghiệm và phân tích các chỉ tiêu chất lượng

2.3.1. Phương pháp thu mẫu

Thu mẫu đất theo TCVN 7538-6:2010 [14]. Mẫu đất được thu tại các ruộng trồng ngô một vụ trong năm, lấy vào thời điểm cây ngô bắt đầu ra hoa. Mẫu được lấy ở độ sâu 6 – 15 cm, sau khi đã loại bỏ khoảng 5 cm phần đất và tàn dư thực vật. Tổng số 12 mẫu, được thu thập tại một số xã, bao gồm: Bình Sơn – Thành phố Sông Công (4 mẫu), xã Tràng Xá – huyện Võ Nhai, tỉnh Thái Nguyên (3 mẫu) và xã Lũng Cú – huyện Đồng Văn – tỉnh Hà Giang (5 mẫu).

2.3.2. 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].

2.3.3. Xác định hoạt tính và một số đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn phân lập được

Định tính khả năng sinh tổng hợp IAA của vi khuẩn theo TCVN10784:2015 [16]. Theo đó, khi cho thuốc thử Salkowski vào dịch nuôi cấy vi khuẩn, nếu có IAA dịch nuôi sẽ chuyển sang màu đỏ.

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 phương trình đường chuẩn IAA đã được xây dựng sẵn, có dạng $y = 0,0118x - 0,0107$ (có hệ số hồi quy $R^2 = 0,9981$) sẽ xác định được hàm lượng IAA [17].

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_4^+ được cố định bởi chủng vi khuẩn trong dịch nuôi bằng phương pháp so màu với thuốc thử Nessler [18], sử dụng phương trình đường chuẩn ammonium đã được xây dựng sẵn, có dạng $y = 0,0816x - 0,0001$ (có hệ số hồi quy $R^2 = 0,9962$) để xác định 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.

2.3.4. Định danh phân tử và xây dựng sơ đồ phá 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 & Russell (2001) [19]. Sử dụng cặp mồi 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' và 1492R 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' để khuếch đại trình tự gen 16S rRNA của chủng tuyển chọn với thành phần và chu trình phản ứng PCR như mô tả của Klindworth và cs (2013) [20]. 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). Tiếp đến, dữ liệu EzBioCloud [21] và MEGA v7.0 [22] được sử dụng đồng thời để xác định phân loại của chủng tuyển chọn.

2.3.5. 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 JASP 0.19.3.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập chủng vi khuẩn có khả năng cố định ni tơ và tổng hợp IAA

Từ 12 mẫu đất thu tại một số nương ngô của các xã Bình Sơn (thành phố Sông Công), xã Tràng Xá (huyện Võ Nhαι) tỉnh Thái Nguyên và xã Lũng Cú (huyện Đồng Văn – tỉnh Hà Giang) đã phân lập được 3 chủng vi khuẩn trên môi

trường Ashby chọn lọc. Các chủng vi khuẩn phân lập được có khả năng sống trên môi trường vô đạm (Ashby), điều này cho phép kết luận sơ bộ rằng chúng có khả năng cố định ni tơ [23]. Sau khi nuôi cả 3 chủng vi khuẩn trong môi trường Ashby lỏng có bổ sung 0,1% L-Tryptophan, dịch huyền phù được xử lý sau đó đã làm đổi màu thuốc thử Salkowskii, chứng tỏ chúng có khả năng tổng hợp IAA. Một số đặc điểm: hình thái tế bào, hình thái khuẩn lạc, tính chất Gram và khả năng di động của 3 chủng phân lập được thể hiện qua Bảng 1.

Bảng 1. Một số đặc điểm sinh lý của các chủng vi khuẩn đã phân lập

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 ni tơ	Khả năng tổng hợp IAA
MN82	Bình Sơn	Trắng ngà, tròn, lồi, không rìa	Que ngắn	-	+	+	+
MN86	Tràng Xá	Trắng trong, tròn, lồi, không rìa,	Cầu nhỏ	-	+	+	+
MN88	Lũng Cú	Trắng ngà, tròn to, lồi, không rìa, nhẵn bóng	Que ngắn	+	+	+	+

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

Kết quả Bảng 1 cho thấy, khuẩn lạc có dạng hình tròn, màu trong đến trắng ngà, bề mặt trơn bóng và không rìa. Tế bào có dạng que ngắn và cầu nhỏ, chúng đều có khả năng di động và 2 trong 3 chủng thể hiện tính chất Gram âm. Như vậy, 3 chủng vi sinh vật mới phân lập được có thể có đặc điểm về hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào khá khác nhau, nhưng chúng đều có khả năng cố định ni tơ và sinh tổng hợp IAA. Các nghiên cứu đã công bố trước đây đã cho thấy, hoàn toàn có thể phân lập được vi khuẩn có khả năng cố định ni tơ từ đất trồng ngô, như công bố của Nguyễn Thị Thúy Nhi và cộng sự (2024) [24] từ các mẫu đất trồng ngô tại một số địa phương ở tỉnh Thừa Thiên Huế, khi sử dụng môi trường Ashby đã phân lập được 41 chủng có khả năng cố định đạm. Hoặc công bố của Thái Thành Được và Nguyễn Hữu Hiệp (2022) [25], đã phân lập được 120 chủng vi khuẩn có khả năng cố định

ni tơ từ các mẫu đất vùng rẫy ngô khu vực Đồng bằng sông Cửu Long. Tuy nhiên, tại Việt Nam trong thời gian gần đây chưa có công bố cụ thể nào về phân lập vi khuẩn từ đất/đất vùng rẫy trồng ngô mà có khả năng đồng thời cố định ni tơ và tổng hợp IAA. 3 chủng đã được phân lập trong nghiên cứu này sẽ được tiếp tục đánh giá để lựa chọn ra chủng có hoạt lực cố định ni tơ và tổng hợp IAA mạnh nhất.

3.2. Tuyển chọn chủng có khả năng cố định ni tơ và sinh tổng hợp IAA cao từ nguồn đã phân lập

Tiêu chí được đưa ra để đánh giá và tuyển chọn chủng vi khuẩn tiềm năng, đó là hoạt tính cố định ni tơ và tổng hợp IAA. Theo đó kết quả đánh giá khả năng cố định ni tơ (hàm lượng NH_4^+ tạo ra trong môi trường vô đạm Ashby) và tổng hợp IAA (hàm lượng IAA được tạo ra trong môi trường Ashby có bổ sung 0,1% L-Tryptophan) được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Khả năng cố định nitơ và tổng hợp IAA của các chủng đã phân lập được

STT	Ký hiệu chủng	Khả năng tổng hợp IAA ($\mu\text{g/ml}$)	Khả năng cố định nitơ ($\mu\text{g/ml}$)
1	MN82	61,95 ^b	8,040 ^b
2	MN86	67,573 ^a	3,968 ^c
3	MN88	68,19 ^a	20,499 ^a

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 cho thấy, khả năng tổng hợp IAA của chủng MN88 và MN86 là cao nhất và sai khác không có ý nghĩa thống kê. Trong khi đó chủng MN82 cho khả năng tổng hợp IAA thấp nhất trong 3 chủng với độ tin cậy 95%. Trong khi đó, khả năng cố định đạm của 3 chủng đều khác nhau ở mức độ so sánh có ý nghĩa thông kê, theo đó chủng MN88 khả năng cố định nitơ cao nhất (đạt 20,499 $\mu\text{g/ml}$), tiếp đến là MN82 (đạt 8,040 $\mu\text{g/ml}$), thấp nhất là chủng MN86 (đạt 3,968 $\mu\text{g/ml}$).

Hoạt lực tổng hợp IAA và cố định nitơ của chủng MN88, MN86 và MN82 đều 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 NH_4^+ lần lượt đạt 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 MN88 tương đương với chủng MN26 (20,822 $\mu\text{g/ml}$ NH_4^+ và 77,234 $\mu\text{g/ml}$ IAA) và chủng MN72 (20,132 $\mu\text{g/ml}$ NH_4^+ và 56,619 $\mu\text{g/ml}$ IAA) được công bố bởi Trần Văn Chí và cộng sự (2022 và 2023) [23, 26] khi tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ và tổng hợp IAA trong đất trồng cà chua và đất trồng chè tại Thái Nguyên.

Như vậy, từ kết quả phân lập (Bảng 1) và đánh giá (Bảng 2) của nghiên cứu này, kết hợp

với dẫn chứng so sánh kết quả của những công bố trước đó, có thể thấy chủng MN88 rất tiềm năng và được tuyển chọn để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

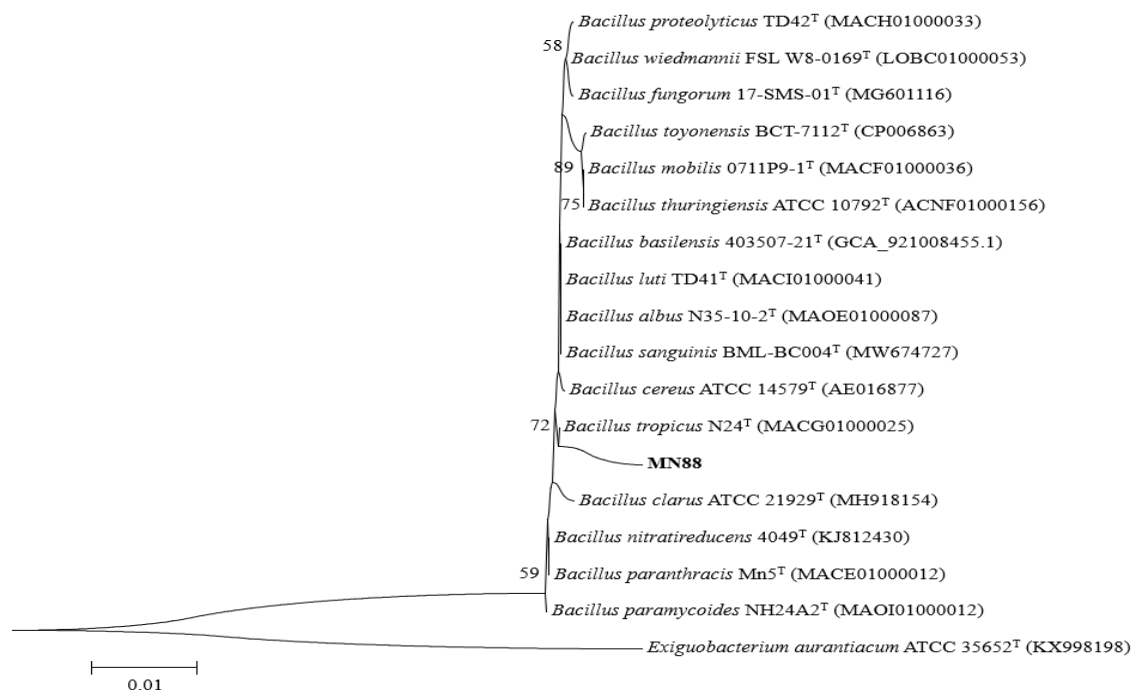
3.3. Đánh giá đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn tuyển chọn

3.3.1. Định danh bằng trình tự 16S rRNA

Kết quả so sánh trình tự gen 16S rRNA của chủng MN88 (kích thước 1466 bp) với các trình tự gen công bố trên Ngân hàng gen Quốc tế, cho thấy có sự tương đồng 99,2% với *Bacillus tropicus* N24T (MACG01000025); 99,13% với *Bacillus wiedmannii* FSL W8-0169T (LOBC01000053), *Bacillus paramycoides* NH24A2T (MAOI01000012), *Bacillus paranthracis* Mn5T (MACE01000012), *Bacillus albus* N35-10-2T (MAOE01000087), *Bacillus luti* TD41T (MACI01000041), *Bacillus nitratreducens* 4049T (KJ812430), *Bacillus sanguinis* BML-BC004T (MW674727), *Bacillus basilensis* 403507-21T (GCA_921008455.1), và từ 98,76 - 99,05% với các loài khác thuộc chi *Bacillus* (Bảng 3). Từ kết quả so sánh cho thấy chủng MN88 gần nhất (99,20%) với *Bacillus tropicus* N24T (MACG01000025), giá trị này > 98,7% - giới hạn loài đã được công bố thuộc cùng chi [27], kết hợp với những đặc điểm của chủng được trình bày tại Bảng 1, chủng MN88 được xác định thuộc loài *Bacillus tropicus*. Đồng thời, sơ đồ tiến hóa dựa vào trình tự gen 16S rRNA giữa chủng MN88 và các loài gần nhất bộ lạc chủng MN88 thuộc chi *Bacillus* và gần nhất với loài *Bacillus tropicus* N24T (Hình 1). Từ dữ liệu so sánh và phân tích trình tự gen 16S rRNA, chủng MN88 được phân loại với pháp danh khoa học là *Bacillus tropicus* MN88.

Bảng 3. So sánh trình tự gen 16S rRNA của chủng MN88 với các loài gần nhất

Tên loài gần nhất	Độ tương đồng (%)
<i>Bacillus tropicus</i> N24 ^T (MACG01000025)	99,20
<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169 ^T (LOBC01000053)	99,13
<i>Bacillus paramycoides</i> NH24A2 ^T (MAOI01000012)	99,13
<i>Bacillus paranthracis</i> Mn5 ^T (MACE01000012)	99,13
<i>Bacillus albus</i> N35-10-2 ^T (MAOE01000087)	99,13
<i>Bacillus luti</i> TD41 ^T (MACI01000041)	99,13
<i>Bacillus nitratreducens</i> 4049 ^T (KJ812430)	99,13
<i>Bacillus sanguinis</i> BML-BC004 ^T (MW674727)	99,13
<i>Bacillus basileensis</i> 403507-21 ^T (GCA_921008455.1)	99,13
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 ^T (AE016877)	99,05
<i>Bacillus proteolyticus</i> TD42 ^T (MACH01000033)	99,05
<i>Bacillus fungorum</i> 17-SMS-01 ^T (MG601116)	99,05
<i>Bacillus anthracis</i> Ames ^T (AE016879)	99,05
<i>Bacillus clarus</i> ATCC 21929 ^T (MH918154)	98,98
<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112 ^T (CP006863)	98,91
<i>Bacillus mobilis</i> 0711P9-1 ^T (MACF01000036)	98,91
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792 ^T (ACNF01000156)	98,91
<i>Bacillus pacificus</i> EB422 ^T (KJ812450)	98,84
<i>Bacillus paramobilis</i> BML-BC017 ^T (MW674728)	98,83
<i>Bacillus pseudomyoides</i> DSM 12442 ^T (ACMX01000133)	98,76
<i>Bacillus hominis</i> BML-BC059 ^T (MW674729)	98,76



Hình 1. Sơ đồ phả hệ của chủng MN88 với các loài nhất nhất dựa vào trình tự gen 16S rRNA

3.3.2. Đánh giá một số đặc điểm hóa sinh của chủng *Bacillus tropicus* MN88

Một số đặc điểm hóa sinh của chủng tuyển

chọn được thử nghiệm định tính bởi bộ kit API. Kết quả thử nghiệm được thể hiện tại Bảng 4.

Bảng 4. Một số đặc điểm nuôi cấy của chủng *Bacillus tropicus* MN88

STT	Đặc điểm hóa sinh khảo sát	Thể hiện của chủng MN88	STT	Đặc điểm hóa sinh khảo sát	Thể hiện của chủng MN88
1	Phosphatase alcaline	+	19	D-fucosidase	-
2	Esterase (C4)	+	20	Hoạt tính catalase	+
3	Esterase Lipase (C8)	+	21	Phản ứng Voges-Proskauer	-
4	Lipase (C14)	+	22	Sinh Indole	+
5	Leucine arylamidase	+	23	Chuyển hóa nitrate thành nitrite	+
6	Valine arylamidase	+	24	Đồng hóa D-glucose	+
7	Cystine arylamidase	+	25	Đồng hóa L-arabinose	+
8	Trypsine	-	26	Đồng hóa D- mannose	+
9	D-chymotrypsine	+	27	Đồng hóa D-mannitol	+
10	Phosphatase acide	+	28	Đồng hóa N-acetyl-glucosamine	+
11	Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	29	Đồng hóa D-maltose	+
12	D-galactosidase	-	30	Đồng hóa L-arginine	+
13	β -galactosidase	-	31	Đồng hóa Gelatin	+
14	β -glucuronidase	-	32	Đồng hóa Trisodium citrate	+
15	D-glucosidase	+	33	Đồng hóa D-ribose	+
16	β -glucosidase	-	34	Đồng hóa D-saccharose	-
17	N-acetyl- β -glucosaminidase	-	35	Đồng hóa D-sorbitol	-
18	D-mannosidase	-	36	Đồng hóa Urea	-

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

Kết quả Bảng 4 cho thấy chủng *Bacillus tropicus* MN88 thể hiện hoạt tính của 12 loại enzyme (Phosphatase alcaline, Esterase (C4), Esterase Lipase (C8), Lipase (C14), Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Cystine arylamidase, D-chymotrypsine, Phosphatase acide, Naphtol-AS-BI- phosphohydrolase, D-glucosidase và catalase), âm tính với phản ứng Voges-Proskauer, sinh Indole và chuyển hóa nitrate thành nitrite, bên cạnh đó, chủng MN88 có khả năng đồng hóa một số nguồn carbon như: D-glucose, L-arabinose, D- mannose, D-mannitol, N-acetyl-glucosamine, D-maltose, L-arginine, Gelatin, Trisodium citrate, D-ribose; không có khả năng đồng hóa D-saccharose, D-sorbitol và Urea

Tại Việt Nam, chưa có công bố về loài *Bacillus tropicus*. Tuy nhiên, trên thế giới đã có một số công bố, như nghiên cứu của Yang Liu và cộng sự (2017) [28], hay nghiên cứu của Sucharita Samanta và cộng sự (2020) [29], hoặc nghiên cứu của Naikun Shen và cộng sự (2022)

[30]. Những công bố này không đề cập đến khả năng cố định nitơ và tổng hợp IAA, nhưng đã cung cấp nhiều thông tin về đặc điểm sinh hóa của loài *Bacillus tropicus* và có nhiều điểm tương đồng với MN88 như thể hiện âm tính với phản ứng Voges-Proskauer (Naikun Shen và cộng sự, 2022), catalase dương tính, không sinh β -galactosidase, không sinh Urease (Sucharita Samanta và cộng sự, 2020), đồng hóa glucose, mannitol và arabinose (Yang Liu và cộng sự, 2017). Chỉ đến thời gian gần đây nhất, năm 2024 có công bố của Shanjana Rahman Tuli và cộng sự (2024) [31], theo đó chủng *Bacillus tropicus* CRB14 được phân lập từ trầm tích thuộc da ở thành phố Dhaka (Bangladesh) có khả năng cố định nitơ đạt 10,34 $\mu\text{g/mL}$, tổng hợp IAA đạt 28,165 $\mu\text{g/mL}$ – thấp hơn so với MN88.

4. KẾT LUẬN

Từ 12 mẫu đất thu tại một số địa phương ở tỉnh Thái Nguyên và tỉnh Hà Giang đã tuyển chọn được chủng MN88 thể hiện hoạt lực cao

nhất với khả năng cố định nitơ đạt 20,499 µg/ml và tổng hợp IAA đạt 68,19 µg/ml. Dựa trên phân tích trình tự gen 16S rRNA, chủng MN88 được xác định là *Bacillus tropicus* MN88 với mức độ tương đồng 99,2% so với *Bacillus tropicus* N24T. *B. tropicus* MN88 có khả năng sinh 12 enzyme: Phosphatase alcaline, Esterase (C4), Esterase Lipase (C8), Lipase (C14), Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Cystine arylamidase, D-chymotrypsine, Phosphatase acide, Naphtol-AS-BI- phosphohydrolase, D-glucosidase và catalase; đồng hóa nhiều nguồn carbon khác nhau như: D-glucose, L-arabinose, D- mannose, D-mannitol, N-acetyl-glucosamine, D-maltose, L-arginine, Gelatin, Trisodium citrate, D-ribose, âm tính với phản ứng Voges-Proskauer, sinh Indole và chuyển hóa nitrate thành nitrite. Những kết quả đạt được trong nghiên cứu khẳng định rằng *Bacillus tropicus* MN88 là một chủng vi khuẩn có tiềm năng cao về cố định nitơ và tổng hợp IAA, mở ra hướng ứng dụng trong cải thiện dinh dưỡng đất và thúc đẩy sinh trưởng của cây trồng góp phần xây dựng nền nông nghiệp xanh và bền vững.

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]. Ngô Hữu Tình (2003). Cây ngô. Nhà xuất bản Nông nghiệp An. 211.

[2]. Nguyễn Hữu Hiệp & Nguyễn Thị Mai Khanh (2010). Phân lập và nhận diện một số chủng vi khuẩn cố định nitơ trên cây bắp. Tạp chí Khoa học – Đại học Cần Thơ. 16: 151-156.

[3]. Stoltzfus J. R, So R., Malaravithi P. P., Ladha J.K. & Brujin F.J. (1997). Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. Plant and Soil. 194: 25-36.

[4]. Dalla Santa O. R., Fernández Hernández R., Michelena Alvarez G. L., Ronzelli P. Jr. & Carlos Ricardo Soccol (2004). Azospirillum sp . inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments.

Agriculture, Agribusiness and Biotechnology. 47: 843-850. DOI: [10.1590/S1516-89132004000600002](https://doi.org/10.1590/S1516-89132004000600002).

[5]. Bashan Y. & Levanony H. (1990). Current status of Azospirillum inoculation technology: Azospirillum as a challenge for agriculture. CAN. J. MICROBIO. 36: 591-603.

[6]. Wagner S.C. (2011). Biological Nitrogen Fixation. Nature Education Knowledge. 3: 15.

[7]. Spaepen S., Vanderleyden J. & Remans R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiol Rev. 31: 425-48. DOI: [10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x).

[8]. López-Bucio J., Campos-Cuevas J. C., Hernández-Calderón E., Velásquez-Becerra C., Farías-Rodríguez R., Macías-Rodríguez L. I. & Valencia-Cantero E. (2007). *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. Mol Plant Microbe Interact. 20(2): 207-217. DOI: [10.1094/mpmi-20-2-0207](https://doi.org/10.1094/mpmi-20-2-0207).

[9]. Mehnaz S. & Lazarovits G. (2006). Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. Microb Ecol. 51(3): 326-335. DOI: [10.1007/s00248-006-9039-7](https://doi.org/10.1007/s00248-006-9039-7).

[10]. Rodrigue A. A., Forzani M. V., Soares R. S., Sibov S. T. & Gonçalves Vieira J. D. (2016). Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. Pesq, Agropec, Trop. 46: 46-54.

[11]. Giassi V., Kiritani C. & Kupper K.C. (2016). Bacteria as growth-promoting agents for citrus rootstocks. Microbiological Research. 190: 46-54.

[12]. Chauhan A., 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. DOI: [10.1016/j.bjm.2016.12.001](https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.12.001).

[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: 7-12. DOI: [10.22144/ctu.jvn.2018.002](https://doi.org/10.22144/ctu.jvn.2018.002).

[14]. TCVN 7538-6:2010 (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: 63-72.

- [16]. TCVN10784:2015 (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 Thuý (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]. Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M. & Glöckner F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41: 1-11.
- [21]. Chun J., Lee J.H., Jung Y., Kim M., Kim S., Kim B.K. & Lim Y.W. (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57: 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: 1870-1974.
- [23]. Trần Văn Chí, Lê Văn Hiền, Nguyễn Mạnh Tuấn, Nguyễn Thị Giang & Hoàng Thị Lan Anh (2023). 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 Tức Tranh, tỉnh Thái Nguyên. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp.* 12: 3-11. DOI: [10.55250/jo.vnuf.12.6.2023.003-011](https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.12.6.2023.003-011).
- [24]. Nguyễn Thị Thuý Nhi, Nguyễn Thái Pháp, Dương Vi Ngọc & Nguyễn Minh Trí (2024). Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng cố định đạm từ đất trồng ngô. *Hội nghị khoa học toàn quốc về công nghệ sinh học.* 832-838.
- [25]. Thái Thành Được & Nguyễn Hữu Hiệp (2022). Phân lập và nhận diện vi khuẩn cố định đạm từ đất vùng rễ cây bắp ở đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ.* 58: 160-171.
- [26]. 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: 1599-1607.
- [27]. Browne H.P., Forster S.C., Anonye B.O. & et al. (2016). Culturing of unculturable human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature.* 533: 543-546.
- [28]. Liu Y., Du ., Lai Q., Zeng R., Ye D., Xu J. & Shao Z. (2017). Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Evol Microbiol.* 67: 2499-2508. DOI: [10.1099/ijsem.0.001821](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001821).
- [29]. Samanta S., Datta D. & Halder G. (2020). Biodegradation efficacy of soil inherent novel sp. *Bacillus tropicus* (MK318648) onto low density polyethylene matrix. *Journal of Polymer Research.* 27: 324. DOI: [10.1007/s10965-020-02296-x](https://doi.org/10.1007/s10965-020-02296-x).
- [30]. Shen N., Yang M., Xie C., Pan J., Pang K., Zhang H., Wang Y. & Jiang M. (2022). Isolation and identification of a feather degrading *Bacillus tropicus* strain Gxun-17 from marine environment and its enzyme characteristics. *BMC Biotechnol.* 22: 11. DOI: [10.1186/s12896-022-00742-w](https://doi.org/10.1186/s12896-022-00742-w).
- [31]. Tuli S. R., Ali M. F., Jamal T. B., Khan M. A. S., Fatima N., Ahmed I., Khatun M. & Sharmin S. A. (2024). Characterization and Molecular Insights of a Chromium-Reducing Bacterium *Bacillus tropicus*. *Microorganisms.* 12: 12. DOI: [10.3390/microorganisms12122633](https://doi.org/10.3390/microorganisms12122633).