

Phân lập chủng vi khuẩn *Bacillus wudalianchiensis* BD 1.4 từ đất trồng đậu phộng tại tỉnh Bình Định, có khả năng sinh IAA (Indole Acetic Acid) trong điều kiện nhiệt độ cao

Isolation of *Bacillus wudalianchiensis* strain BD 1.4 from peanut soil in Binh Dinh Province, producing IAA (Indole Acetic Acid) under the high temperature

Trần Thị Phấn^{1*}, Trần Thùy Trang¹, Đinh Anh Hòa¹, Nguyễn Thị Ánh Nguyệt¹,
Nguyễn Thị Thùy Dương¹, Hà Thị Loan¹, Lê Thị Mai Châm¹

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: tranphan20091995@gmail.com

THÔNG TIN

TÓM TẮT

DOI:10.46223/HCMCOUJS.
tech.vi.20.1.3516.2025

Ngày nhận: 23/06/2024

Ngày nhận lại: 25/07/2024

Duyệt đăng: 09/08/2024

Đậu phộng là loại cây thực phẩm, cây lấy dầu có giá trị kinh tế và giá trị dinh dưỡng cao, đem lại nguồn thu nhập ổn định cho người dân tỉnh Bình Định. Tuy nhiên, tình trạng nắng nóng kéo dài, nhiệt độ tăng cao gây ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng của cây. Do đó, việc nghiên cứu và phát triển một sản phẩm sinh học giúp thúc đẩy sự tăng trưởng của cây đậu phộng trong điều kiện nhiệt độ tăng cao là một vấn đề đang được chú trọng quan tâm. Trong nghiên cứu này, từ 08 mẫu đất trồng đậu phộng thu thập tại tỉnh Bình Định, 24 chủng vi khuẩn đã được phân lập và tuyển chọn. Trong đó, chủng vi khuẩn BD 1.4 được đánh giá có khả năng chịu nhiệt và sinh tổng hợp IAA cao nhất với hàm lượng đạt 71.21 ug/ml. Dựa trên kết quả phân tích trình tự 16S - rRNA, chủng vi khuẩn BD 1.4 được xác định thuộc loài *Bacillus wudalianchiensis*. Chủng *B. wudalianchiensis* BD 1.4 có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất chế phẩm sinh học giúp cây đậu phộng sinh trưởng và phát triển trong điều kiện nhiệt độ tăng cao do biến đổi khí hậu.

ABSTRACT

Từ khóa:

Bacillus wudalianchiensis;
chịu nhiệt; đậu phộng; Indole
acetic acid

Keywords:

Bacillus wudalianchiensis;
heat-resistant; peanuts;
Indole acetic acid

Peanuts are a food and oil crop with high economic and nutritional value, providing a stable source of income for the Binh Dinh people. However, the hot weather and rising temperature affect the productivity and quality of peanuts. Therefore, research and development of a biological product that can promote the growth of peanuts is a critical issue. In the present study, from 08 peanut soil samples collected in Binh Dinh Province, 24 bacterial strains were isolated. In particular, bacterial strain BD 1.4 showed the highest heat resistance and IAA biosynthesis with a 71.21 ug/ml content. Based on 16S - rRNA sequence analysis results, bacterial strain BD 1.4 was identified as *Bacillus wudalianchiensis*. The bacterial strain *B. wudalianchiensis* BD 1.4 has the potential for the production of biological products to promote plant growth and development under rising temperatures due to climate change.

1. Giới thiệu

Đậu phộng (*Arachis hypogaea* L.) là loài cây thực phẩm thuộc họ đậu, có giá trị kinh tế và dinh dưỡng cao (Variath & Janila, 2017; Zhang & ctg., 2021). Hệ vi sinh vật phân lập từ đất vùng rễ của cây đậu phộng có chứa các chủng vi khuẩn giúp thúc đẩy quá trình tăng trưởng và chuyển hóa của cây trồng, kích thích sự phát triển của rễ (Vasant & ctg., 2023), tăng khả năng kháng nhiều nguồn bệnh do các vi sinh vật và thời tiết gây ảnh hưởng đến cây. Do đó, đậu phộng là một trong những loài cây thích hợp giúp chuyển đổi cơ cấu cây trồng và phát triển nền nông nghiệp bền vững (Do, Pham, & ctg., 2021).

Hiện nay, biến đổi khí hậu làm nhiệt độ môi trường xung quanh tăng lên liên tục gây tác động đến quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật, dẫn đến giảm chất lượng, năng suất của cây trồng (Balota, 2012; Dastogeer & ctg., 2022; Khan & ctg., 2021; Paulsen, 1994). Tại Việt Nam, nền sản xuất nông nghiệp phụ thuộc nhiều vào điều kiện thời tiết. Trong đó, khu vực miền Trung chịu ảnh hưởng nặng nề nhất trước tình hình biến đổi khí hậu. Nhiệt độ tăng cao, thời tiết nắng nóng dẫn đến thiếu hụt nguồn nước tưới, tăng rủi ro dịch bệnh, gây ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng, làm tăng chi phí sản xuất và giảm năng suất cây trồng (Do, Phung, & ctg., 2021). Bình Định là một trong những tỉnh có nền nhiệt độ tăng cao hàng năm, đang đối mặt với những thách thức tiêu cực do biến đổi khí hậu gây ra. Trong khi đó, dữ liệu từ các khảo sát, nghiên cứu trước đây cho thấy, so với năm 2015, tình hình canh tác và sản xuất đậu phộng tại tỉnh Bình Định ngày càng tăng với diện tích gieo trồng tăng 15.2%, năng suất tăng 8.8% và sản lượng tăng 25.3% (Do, Pham & ctg., 2021). Tuy nhiên, nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển của hầu hết các giống cây đậu phộng là khoảng 30°C. Vì vậy, việc tạo ra các giống đậu phộng có khả năng sinh trưởng, phát triển và cho năng suất trong điều kiện nhiệt độ cao là biện pháp đúng đắn để duy trì và ổn định tình hình sản xuất đậu phộng ở tỉnh Bình Định. Tuy nhiên, việc này cần nhiều thời gian và tốn nhiều chi phí. Do đó, nhiều nghiên cứu đã được thực hiện để giảm thiểu rủi ro này hiệu quả hơn bằng cách cải thiện sự phát triển của cây trồng trong điều kiện stress nhiệt bằng vi sinh vật vùng rễ (Li, Yang, & ctg., 2023; Senthil & ctg., 2024).

Biện pháp sử dụng vi sinh vật có khả năng kích thích tăng trưởng cây trồng ứng dụng để giảm thiểu tác hại của tình trạng stress nhiệt đang được quan tâm nghiên cứu trong những năm gần đây (Khan & ctg., 2021; Zhang & ctg., 2023). Một số cơ chế chính của vi sinh vật có khả năng giúp cây trồng chịu stress nhiệt tốt hơn như sản xuất axit indole axetic (IAA), gibberellin (GA), chất hoạt động bề mặt sinh học siderophores hay thúc đẩy các chu trình dinh dưỡng, chuyển hóa vật liệu hữu cơ (Li & ctg., 2022). Indole Acetic Acid (IAA) là phytohormone chính của nhóm auxin đóng vai trò chính trong sự sinh trưởng và phát triển của cây cũng như các quá trình sinh lý khác của cây đậu phộng (Peng & ctg., 2013). Ngoài ra, IAA còn giúp cải thiện số lượng và chiều dài rễ, lông hút, từ đó tăng cường khả năng hấp thụ nước và dinh dưỡng cho cây (Hossain & ctg., 2023). Vi sinh vật phân lập từ vùng đất trồng đậu phộng đa dạng và phong phú về chủng loại với các hoạt tính nổi trội như khả năng chịu nhiệt, sản sinh IAA giúp cho quá trình hấp thu chất dinh dưỡng của cây dễ dàng hơn, nâng cao sức đề kháng, quá trình tăng trưởng và cải thiện năng suất của cây (Bui & ctg., 2021; Dey & ctg., 2004). Việc tuyển chọn các chủng vi sinh vật có triển vọng hướng tới sản xuất các chế phẩm sinh học phục vụ trong nông nghiệp là vấn đề cấp thiết. Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là (i) thu mẫu, phân lập các chủng vi sinh vật chịu nhiệt trong đất trồng đậu phộng, (ii) khảo sát khả năng sinh IAA của các chủng vi sinh vật phân lập được, và (iii) định danh chủng vi sinh vật chịu nhiệt và có khả năng sinh tổng hợp IAA. Việc chọn lọc được chủng vi sinh vật có khả năng sản sinh IAA trong điều kiện nhiệt độ cao sẽ giúp ổn định sản xuất đậu phộng trước tình hình biến đổi khí hậu trong tương lai.

Nguồn: The data are from “Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant Signaling”, by S. Spaepen, J. Vanderleyden, and R. Reman, 2017, *Federation of European Microbiological Societies*, 31, pp. 425-448

Để hướng đến xây dựng nền nông nghiệp bền vững và an toàn, việc ứng dụng nguồn vi sinh vật bản địa ứng dụng trong nghiên cứu và phát triển các sản phẩm sinh học giúp thúc đẩy quá trình tăng trưởng của cây trồng là vấn đề cần được chú trọng quan tâm.

3. Phương pháp nghiên cứu

3.1. Phân lập vi sinh vật chịu nhiệt từ đất trồng đậu phộng ở tỉnh Bình Định

3.1.1. Phương pháp thu thập mẫu

Mục tiêu: Thu thập các mẫu đất trồng đậu phộng sử dụng để phân lập các chủng vi sinh vật có khả năng chịu nhiệt và sản sinh IAA.

Phương pháp thực hiện: Mẫu được sử dụng để phân lập các chủng vi sinh vật là các mẫu đất vùng rễ cây đậu phộng thu thập ở tỉnh Bình Định. Ở mỗi vườn, mẫu được thu thập ở 05 điểm (04 điểm xung quanh vườn và 01 điểm chính giữa vườn), sau đó trộn thành một mẫu và bảo quản vô trùng trong túi đựng mẫu. Ở mỗi vị trí thu mẫu, đất được lấy ở độ sâu 05 - 10cm xung quanh rễ cây (Senthil & ctg., 2024). Các mẫu đất được bảo quản ở 4°C cho đến khi sử dụng (Vasant & ctg., 2023). Ký hiệu mẫu: BĐx (Trong đó: BĐ là chữ cái đầu của tỉnh Bình Định, x là số thứ tự vườn).

3.1.2. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng chịu nhiệt

Mẫu đất được cân 10g chuyển vào erlen có chứa 90ml nước cất vô trùng (Mohite, 2013), đồng nhất mẫu bằng cách lắc mẫu với tốc độ 150 vòng/phút trong 30 phút, sau đó pha loãng mẫu ở các nồng độ khác nhau. Các nồng độ pha loãng 10^{-5} , 10^{-6} của dung dịch mẫu được trải với thể tích 100 μ l trên bề mặt thạch đĩa môi trường TSA. Sau đó, đĩa được ủ ở nhiệt độ 50°C trong 36 - 48 giờ (Li, Yang, & ctg., 2023). Các khuẩn lạc riêng lẻ có hình thái đặc trưng sẽ được cấy chuyển, làm thuần (Katz, 2008) và bảo quản trong glycerol 15% để thực hiện các thí nghiệm kế tiếp (Shepherd & ctg., 2010). Đặc điểm khuẩn lạc của các vi khuẩn được quan sát trên môi trường thạch. Phương pháp nhuộm Gram được sử dụng để xác định đặc điểm tế bào của các chủng này.

3.2. Đánh giá khả năng sinh tổng hợp IAA của các chủng vi sinh vật chịu nhiệt

Mục tiêu: Tuyển chọn được chủng vi sinh vật có khả năng sản sinh IAA từ các chủng vi sinh vật chịu nhiệt đã sàng lọc.

Phương pháp thực hiện: các chủng vi khuẩn được nhân nuôi trong môi trường TSB + 0.1% tryptophan, lắc 120 vòng/phút, ở nhiệt độ 50°C. Sau 48 giờ, dịch nuôi cấy được ly tâm 5,500 vòng/phút trong 05 phút. Dịch trong sau ly tâm được hút 1ml hòa với 2ml thuốc thử Salkowski, đối chứng là 1ml môi trường không nuôi vi sinh vật và 2ml thuốc thử. Các ống nghiệm được lắc đều, ủ tối trong 20 phút. Chỉ số OD của các mẫu sau khi được so màu ở bước sóng 530nm trên máy quang phổ kế (Spectrophotometer, BioSpec - mini, Nhật Bản) sẽ được thay thế vào phương trình đường chuẩn để xác định hàm lượng IAA sinh tổng hợp trong quá trình nuôi cấy (Nguyen & Do, 2017; Nguyen & ctg., 2024).

Xây dựng đường chuẩn IAA: các bình định mức được chuẩn bị với các nồng độ IAA tương ứng 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, và 90 μ g/ml, đánh số từ 1 đến 10 với bình 1 là bình đối chứng âm. Các mẫu sẽ được trộn đều với thuốc thử Salkowski theo tỷ lệ 1ml mẫu: 2ml thuốc thử, để 20 phút trong tối. Sau đó, các mẫu được kiểm tra độ hấp thụ ở bước sóng 530nm. Chỉ số OD được sử dụng để xây dựng đồ thị đường chuẩn IAA (Nguyen & Do, 2017).

Phương trình đường chuẩn có dạng: $Y = aX + b$, trong đó: Y là Độ hấp thụ quang (OD 530nm), X là nồng độ của mẫu (μ g/ml). Hàm lượng IAA sinh tổng hợp được của các chủng vi khuẩn được xác định theo công thức: $X = (Y-b)/a$.

Chỉ tiêu đánh giá: hàm lượng IAA ($\mu\text{g/ml}$).

Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016 và được phân tích thống kê bằng phần mềm SAS 8.1 qua phép thử Duncan ở mức ý nghĩa 5% để đánh giá sự khác biệt về hàm lượng IAA sinh tổng hợp giữa các mẫu với nhau.

3.3. Định danh sinh học phân tử chủng vi sinh vật có khả năng chịu nhiệt và sinh tổng hợp IAA

Mục tiêu: định danh đến loài chủng vi khuẩn có khả năng chịu nhiệt và sản sinh IAA.

Phương pháp thực hiện: Phương pháp sốc nhiệt được sử dụng để tách chiết DNA của chủng được tuyển chọn (Fraczek & ctg., 2019). Chủng vi khuẩn được hoạt hóa trên môi trường TSA. Sau 48 giờ, sinh khối vi khuẩn được chuyển vào eppendorf có chứa 100 μL TE, ủ ở nhiệt độ 95 $^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút và nhanh chóng đưa mẫu vào tủ nhiệt độ -80 $^{\circ}\text{C}$ trong 10 phút để thực hiện sốc nhiệt. Sau đó, mẫu được ly tâm với tốc độ 15,000 vòng/phút trong 01 phút. Dịch nổi được sử dụng để khuếch đại trình tự 16S - rDNA với cặp mồi 20F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1500R (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3') (Weisburg & ctg., 1991). Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 0.8% để kiểm tra kết quả. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit Isolate II PCR và Gel Kit rồi tiến hành giải trình tự. Dữ liệu DNA được căn chỉnh bằng phần mềm ATGC và so với các trình tự đã biết được liệt kê trong ngân hàng gen của NCBI dựa trên công cụ BLAST NUCLEOTIDE. Cây phả hệ của chủng tuyển chọn được xây dựng bằng phương pháp Neighbor Joining trong phần mềm MEGA7.0. với chỉ số bootstrap 1,000 lần.

4. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

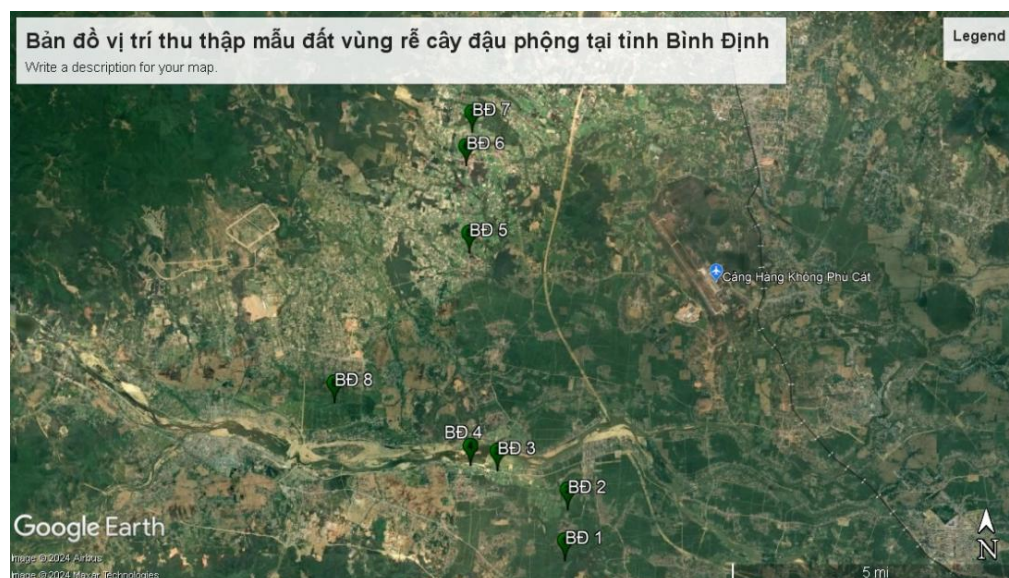
4.1. Kết quả phân lập vi sinh vật chịu nhiệt từ đất trồng đậu phộng thu thập từ tỉnh Bình Định

4.1.1. Kết quả thu thập mẫu đất

Tám mẫu đất vùng rễ cây đậu phộng được thu ở các vườn thuộc thị xã An Nhơn và huyện Tây Sơn tại tỉnh Bình Định. Mỗi vườn cách nhau trên 1km với thông tin vị trí của các mẫu được thể hiện tại Hình 2.

Hình 2

Bản Đồ Vị Trí Thu Thập Mẫu Đất Vùng Rễ Cây Đậu Phộng tại Tỉnh Bình Định



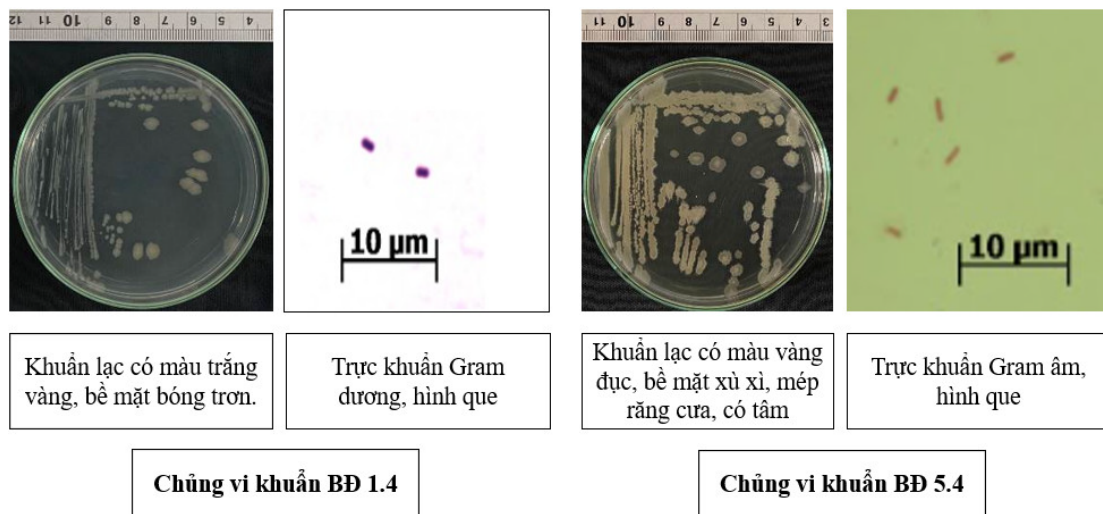
Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

4.1.2. Kết quả phân lập vi sinh vật chịu nhiệt

Từ 08 mẫu đất thu thập được, dịch phân lập được trải trên các môi trường đĩa thạch TSA và ủ trong 24 giờ, nhiệt độ 50°C. Khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn hình thành được trên môi trường chứng tỏ các chủng này có khả năng chịu nhiệt cao. 24 chủng vi khuẩn có đặc trưng về màu sắc, hình dạng được lựa chọn, tách rỗng, cấy chuyển để làm thuần. Sau khi quan sát đặc điểm hình thái, kết quả thể hiện, đa số các chủng vi khuẩn là tế bào Gram dương có dạng hình que, chỉ có một chủng vi khuẩn BD 5.4 thuộc vi khuẩn Gram âm. Khuẩn lạc của 24 chủng vi khuẩn tập trung vào 02 nhóm khuẩn lạc có hình tròn, bề mặt trơn bóng và bề mặt xù xì, mép có răng cưa.

Hình 3

Đặc Điểm Đại Thể, Vi Thể của Vi Khuẩn BD 1.4 và BD 5.4 trên Môi Trường TSA



Nguồn: Kết quả phân tích của nhóm nghiên cứu

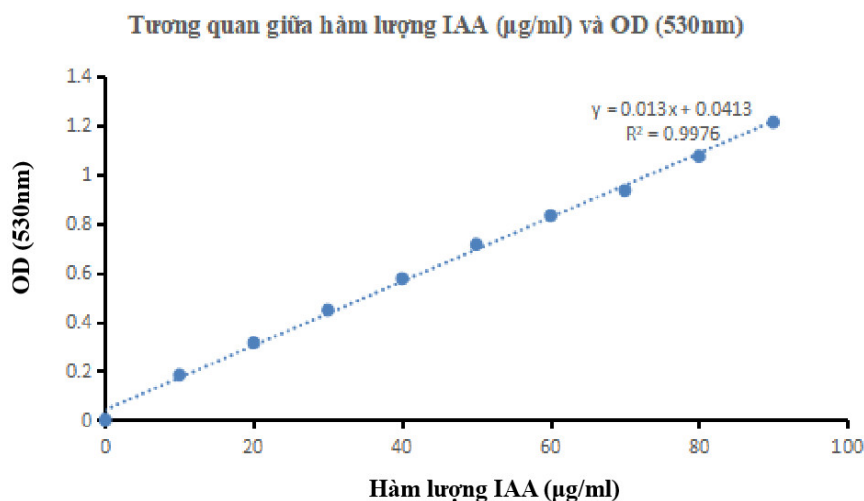
4.2. Kết quả đánh giá khả năng sinh tổng hợp IAA của các chủng vi sinh vật

4.2.1. Kết quả xây dựng đồ thị đường chuẩn IAA

Phương trình đường chuẩn IAA sau khảo sát thực nghiệm: $y = 0.013x + 0.0413$ và $R^2 = 0.9976$ (Hình 4).

Hình 4

Biểu Đồ về sự Tương Quan giữa Hàm Lượng IAA (µg/ml) và OD (530nm)



Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

4.2.2. Kết quả định lượng hàm lượng IAA sinh tổng hợp của các chủng vi khuẩn

Kết quả đánh giá khả năng sản sinh IAA của 24 chủng vi khuẩn chịu nhiệt cho thấy, dịch sau ly tâm của 19/24 chủng vi khuẩn phản ứng với thuốc thử Salkowski, chứng tỏ 19 chủng này có khả năng sản xuất IAA. Hàm lượng IAA sinh tổng hợp của các chủng vi khuẩn này được trình bày tại Bảng 1.

Bảng 1

Hàm Lượng IAA ($\mu\text{g/ml}$) Sinh Tổng Hợp của 24 Chủng Vi Khuẩn sau 48 Giờ Nuôi Cấy

STT	Chủng vi khuẩn	Hàm lượng IAA sinh tổng hợp ($\mu\text{g/ml}$)
1	BĐ 1.1	$15.13^e \pm 0.35$
2	BĐ 1.2	$4.67^{gh} \pm 0.58$
3	BĐ 1.3	$52.36^b \pm 1.10$
4	BĐ 1.4	$71.21^a \pm 0.15$
5	BĐ 2.1	$1.85^{hi} \pm 0.09$
6	BĐ 2.2	$9.49^f \pm 2.15$
7	BĐ 3.1	$0.41^i \pm 0.25$
8	BĐ 3.2	$2.95^{ghi} \pm 0.12$
9	BĐ 4.1	$6.16^g \pm 0.09$
10	BĐ 4.2	$31.28^d \pm 0.08$
11	BĐ 4.3	$0.00^i \pm 0.00$
12	BĐ 5.1	$5.54^{gh} \pm 1.05$
13	BĐ 5.2	$1.85^{hi} \pm 0.84$
14	BĐ 5.3	$54.36^b \pm 0.36$
15	BĐ 5.4	$0.00^i \pm 0.00$
16	BĐ 6.1	$0.00^i \pm 0.00$
17	BĐ 6.2	$2.69^{ghi} \pm 0.79$
18	BĐ 6.3	$3.23^{ghi} \pm 0.49$
19	BĐ 6.4	$0.08^i \pm 0.05$
20	BĐ 7.1	$49.08^c \pm 0.47$
21	BĐ 7.2	$1.90^{hi} \pm 0.20$
22	BĐ 8.1	$0.00^i \pm 0.00$
23	BĐ 8.2	$0.00^i \pm 0.00$
24	BĐ 8.3	$11.44^f \pm 0.08$
CV (%)	14.46	
P	< .0001	

Ghi chú: Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt qua phép kiểm định Duncan

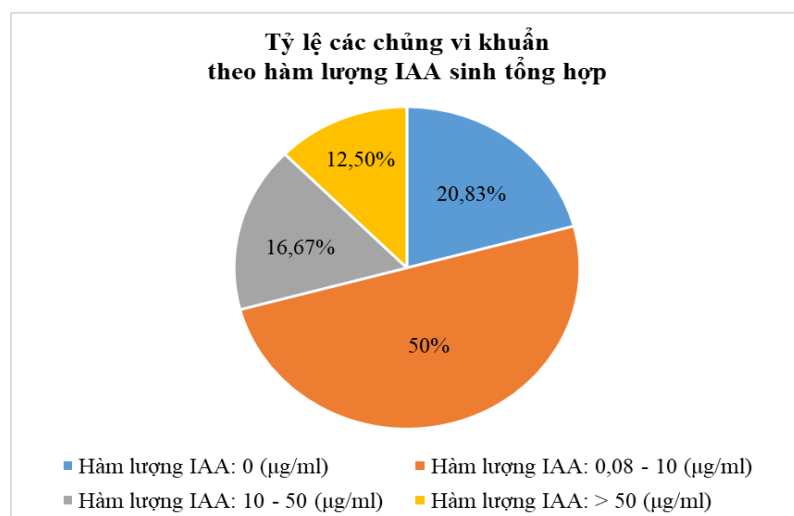
Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Trong 24 chủng vi khuẩn chịu nhiệt lựa chọn được, có 05 chủng vi khuẩn BĐ 4.3, BĐ 5.4, BĐ 6.1, BĐ 8.1 và BĐ 8.2 (chiếm 20.83%) không sinh tổng hợp IAA, 50% tổng số vi khuẩn cho hàm lượng IAA từ 0.08 - 10 $\mu\text{g/ml}$, 04 chủng vi khuẩn (BĐ 1.1, BĐ 4.2, BĐ 7.1 và BĐ 8.3) có hàm lượng IAA sinh ra từ 10 - 50 $\mu\text{g/ml}$ và 03 chủng vi khuẩn (BĐ 1.3, BĐ 1.4 và BĐ 5.3) chiếm 12.50% có hàm lượng IAA sinh tổng hợp > 50 $\mu\text{g/ml}$ (Hình 5).

Kết quả dữ liệu ở Bảng 1 thể hiện, 24 chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp IAA có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê. Hàm lượng IAA sinh tổng hợp của 24 chủng vi khuẩn này dao động từ 0 - 71.21 $\mu\text{g/ml}$. Trong đó, khả năng sinh tổng hợp IAA của vi khuẩn BĐ 1.4 cao nhất với hàm lượng IAA sinh ra đạt 71.21 $\mu\text{g/ml}$. Kết quả này cao hơn so với nghiên cứu của Agustian và cộng sự (2010) và của Herlina và cộng sự (2017). Vì vậy, chủng vi khuẩn BĐ 1.4 được lựa chọn để thực hiện thí nghiệm tiếp theo.

Hình 5

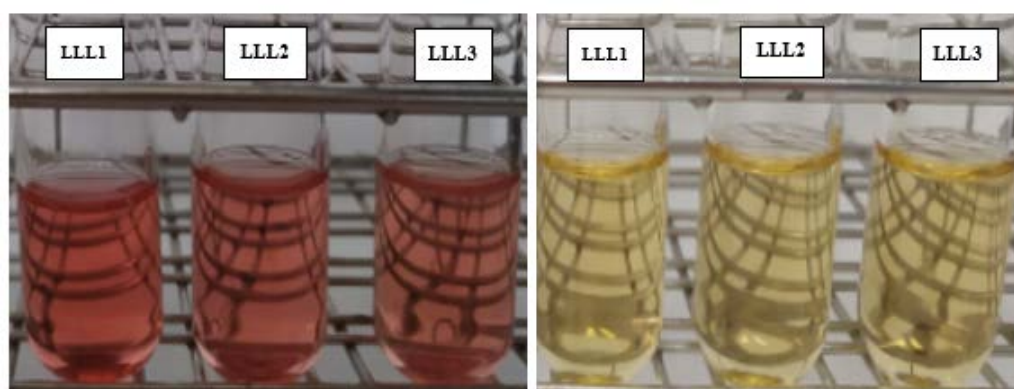
Biểu Đồ về Tỷ Lệ Phần Trăm các Chủng Vi Sinh được Phân Nhóm theo Hàm Lượng IAA Sinh Tổng Hợp trong Môi Trường Nhân Nuôi



Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Hình 6

Sự Phản Ứng với Thuốc Thử Salkowski của Dịch Nuôi Cấy sau Ly Tâm Chủng Vi Khuẩn BĐ 1.4 so với Đối Chứng



a

b

Ghi chú: a: Dịch nuôi cấy sau ly tâm chủng vi khuẩn BĐ 1.4 phản ứng với thuốc thử Salkowski

b: Đối chứng

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

4.3. Kết quả định danh chủng vi sinh có khả năng chịu nhiệt và sản sinh IAA

Vùng gen 16S - rDNA của vi khuẩn BD 1.4 được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi 20F và 1500R. Kết quả giải trình tự cho thấy, chủng BD 1.4 có độ tương đồng 99.72% với trình tự gen của chủng vi khuẩn *Bacillus wudalianchiensis*. Kết quả được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2

Kết Quả BLAST Vùng Gen 16S - Rdna của Vi Khuẩn BD 1.4

STT	Tên chủng	Mã số chủng so sánh	Độ tương đồng (%)	Độ bao phủ (%)	Tên loài
1	BD 1.4	NR1577421	99.72	100	<i>Bacillus wudalianchiensis</i>

Nguồn: Kết quả xử lý từ dữ liệu điều tra

Trình tự chủng vi khuẩn BD 1.4:

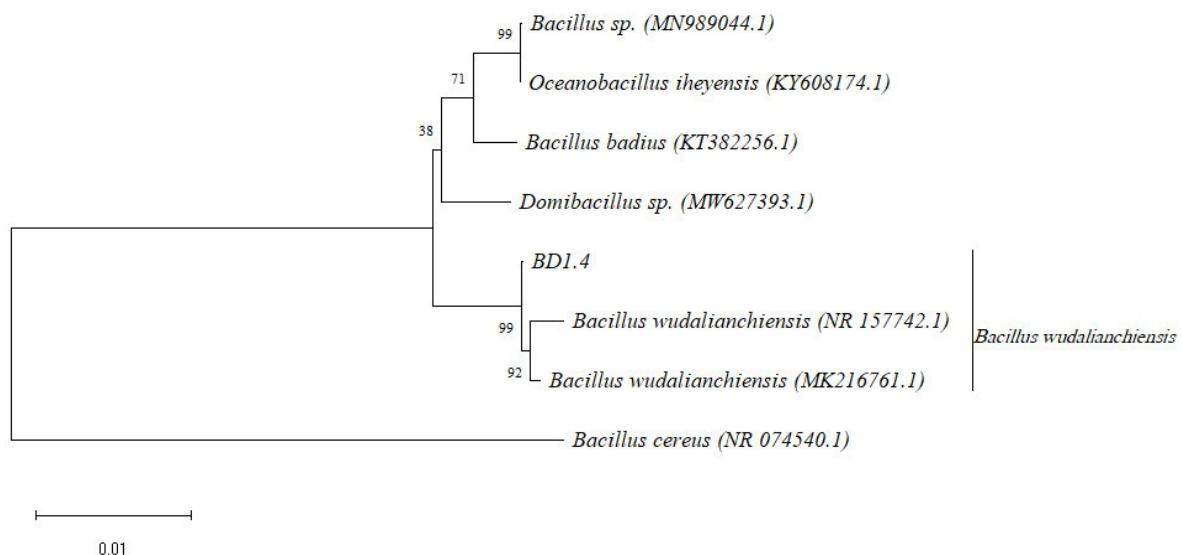
GCAAGTCGAGCGGACTTGACGGAGCTTGCTCTGTTCAAGTTAGCGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG
GGCTAATACCGGATATTCTTTTTTCTCCGCATGGAGAAGAATGGAAAGGCGGCTTCG
GCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCC
ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA
AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCT
GTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGGGAGTAAGTGTCCGTACCTTGACGGTACCTAAC
CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC
GTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTTCTTAAGTCTGATGTG
AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGGCTTGAGTGCAGA
AGAGGAGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAC
ACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTG
GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAA
GTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTG
GGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGC
GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACA
TCCCGCTGACCGGTCTGGAGACAGATCTTTCCTTCGGGGACAGCGGTGACAGGTGG
TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTG
ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG
CTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCAAGGTTTAGCC
AATCCCATAAAACCATTCCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGC
CGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
TACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAAC
CCTTACGGG

Cây phát sinh loài của chủng BD 1.4 với các loài tham khảo được xây dựng theo phương pháp Neighbor Joining dựa trên khoảng cách giữa các loài với nhau. Kết quả thể hiện, chủng BD 1.4 có mối quan hệ gần với *B. wudalianchiensis* và không tương đồng với loài gây bệnh (*Bacillus cereus*), tương tự với kết quả BLAST trên NCBI (Hình 7). Từ đó có thể kết luận, chủng vi khuẩn BD 1.4 thuộc loài *B. wudalianchiensis*. *Bacillus wudalianchiensis* là loài vi khuẩn được công bố đầu tiên vào năm 2017 bởi Liu và cộng sự (2017). Đến năm 2019, dựa trên các thông số kiểu hình, phân loại hóa học và kiểu gen, *Bacillus wudalianchiensis* DSM 100757T đã được phân loại lại thành *Pseudobacillus wudalianchiensis* (Verma & ctg., 2019).

Qua nhiều nghiên cứu đã được báo cáo cho thấy, vi khuẩn *Bacillus* spp. có tiềm năng ứng dụng vào sản xuất chế phẩm sinh học phục vụ nông nghiệp nhờ vào khả năng sản sinh IAA hay chống chịu được stress như stress nhiệt, stress mặn, ... Hai chủng PGPR *B. megaterium* A20, *B. subtilis* A45 đã được báo cáo là có khả năng sản xuất ra hormone auxin IAA giúp thúc đẩy sự phát triển của rễ đậu phộng (Yuttavanichakul & ctg., 2012). Năm 2015, Xu và cộng sự qua nghiên cứu cũng cho thấy, khi bổ sung vi khuẩn *B. megaterium* có khả năng sản sinh IAA vào đất giúp đậu phộng phát triển tốt hơn (Xu & ctg., 2015). Tiềm năng ứng dụng trong sản xuất cây trồng của vi khuẩn *B. wudalianchiensis* cũng được nghiên cứu và công bố trong các năm gần đây. Năm 2017, Liu và cộng sự (2017) đã tiết lộ vi khuẩn *B. wudalianchiensis* có khả năng chịu được nhiệt độ cao. Loài vi khuẩn này cũng đã được báo cáo giúp cải thiện năng suất của cây *Camelina sativa* (Miyashita & Fujitac, 2019). Bên cạnh đó, vi khuẩn *B. wudalianchiensis* cũng thể hiện tính an toàn và được ứng dụng trong nông nghiệp nhờ có khả năng thúc đẩy sự tăng trưởng thực vật như phân giải lân, sản xuất IAA, siderphore, giúp thực vật chống chịu hạn hán hay stress mặn, ... (Vekataramappa & ctg., 2022). Tại Việt Nam, *B. wudalianchiensis* là một loài vi khuẩn mới nên cần thực hiện các nghiên cứu sâu hơn để hiểu rõ về các cơ chế mà chủng vi khuẩn này giúp kích thích quá trình sinh trưởng và phát triển của cây trồng.

Hình 7

Cây Phát Sinh Loài của Chủng BD 1.4 được Xây Dựng dựa trên Phân Tích Trình Tự 16S - Rdna với các Loài có Quan Hệ Họ Hàng Gần



Nguồn: Kết quả xử lý từ dữ liệu điều tra

5. Kết luận & gợi ý

Từ 08 mẫu đất trồng đậu phộng thu thập tại tỉnh Bình Định, 24 chủng vi khuẩn chịu nhiệt độ cao đã được lựa chọn. Trong đó, khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng vi khuẩn BD 1.4 đạt cao nhất với hàm lượng IAA đạt 71.21 $\mu\text{g/ml}$ sau 48 giờ nuôi cấy. Kết quả định danh sinh học phân tử cho thấy, chủng vi khuẩn BD 1.4 tương đồng 99.72% với chủng *B. wudalianchiensis* NR1577421. Để ứng dụng của chủng BD 1.4 trong sản xuất nông nghiệp, cần thực hiện khảo sát các điều kiện, môi trường nuôi cấy và thời gian bảo quản thích hợp để khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng vi khuẩn này đạt hiệu quả tốt. Ngoài ra, cần phải có các đánh giá về khả năng gây bệnh cho cây trồng, con người và động vật để đảm bảo về tính an toàn của chủng vi khuẩn *B. wudalianchiensis* BD 1.4.

Tài liệu tham khảo

- Agustian, A., Nuriyani, N., Maira, L., & Emalinda, O. (2010). Rhizobakteria Penghasil Fitohormon Iaa Pada Rhizosfir Tumbuhan Semak Karamunting, Titonia, Dan Tanaman Pangan. *Jurnal Solum*, VII(1), 49-60.
- Balota, M. (2012). *Effects of drought and heat on peanut (Arachis hypogaea L.) production*. Virginia Polytechnic Institute and State University. https://www.pubs.ext.vt.edu/content/dam/pubs_ext_vt_edu/AREC/AREC-27/AREC-27NP-pdf.pdf
- Bui, D. T., Ngo, P. T., & Cao, D. N. (2021). Phân lập và nhận diện vi khuẩn nội sinh có khả năng cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA trong cây đậu phộng (Lạc) (*Arachis hypogaea* L.) trồng tại 03 huyện miền núi tỉnh Bình Định [Isolation and identification of endophytic bacteria capable of fixing nitrogen, solubilizing phosphorus and synthesizing IAA in peanut plants (*Arachis hypogaea* L.) grown in 03 mountainous districts of Binh Dinh Province]. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 57(6B), 125-131.
- Dai, L., Zhang, G., Yu, Z., Ding, H., Xu, Y., & Zhang, Z. (2019). Effect of drought stress and developmental stages on microbial community structure and diversity in peanut rhizosphere soil. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), Article 2265.
- Dastogeer, K. M. G., Zahan, M. I., Rhaman, M. S., Sarker, M. S. A., & Chakraborty, A. (2022). Microbe-mediated thermotolerance in plants and pertinent mechanisms - A meta-analysis and review. *Front Microbiol*, 13, 1-21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.833566>
- Dey, R., Pal, K. K., Bhatt, D. M., & Chauhan, S. M. (2004). Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 159(4), 371-394. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.08.004>
- Do, Q. V., Phung, M. L., Truong, T. D., Pham, T. T. T., Dang, T. V., & Nguyen, K. T. (2021). The impact of extreme events and climate change on agricultural and fishery enterprises in central Vietnam. *Sustainability*, 13(13), Article 7121. <https://doi.org/10.3390/su13137121>
- Do, T. T. X., Pham, B. V., Truong, T. T., & Phan, N. T. P. (2021). Ảnh hưởng của liều lượng đạm và lân đến sinh trưởng và năng suất của giống lạc ldh.09 trên đất cát biển ở tỉnh Bình Định [Effects of nitrogen and phosphorus dosage on growth and yield of peanut variety ldh.09 on sandy coastal soil in Binh Dinh Province]. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 130(3B), 31-142. <https://doi.org/10.26459/hueunijard.v130i3B.6059>
- Fraczek, M. G., Zhao, C., Dineen, L., Lebedinec, R., Bowyer, P., & Bromley, M. (2019). Fast and reliable PCR amplification from *Aspergillus fumigatus* sporesuspension without traditional DNA extraction. *Current Protocols in Microbiology*, 54(1), Article e89. <https://doi.org/10.1002/cpmc.89>
- Herlina, L., Pukan, K. K., & Mustikaningtyas, D. (2017). The endophytic bacteria producing IAA (Indole Acetic Acid) in *Arachis hypogaea*. *Cell Biology and Development*, 1(1), 31-35.
- Hossain, Md. S., Frith, Ch., Bhattacharyya, S. S., DeLaune, P. B., & Gentry, T. J. (2023). Isolation and characterization of bacterial endophytes from small nodules of field grown peanut. *Microorganisms*, 11(8), Article 1941. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11081941>

- Katz, D. S. (2008). *The streak plate protocol*. <https://asm.org/ASM/media/Protocol-Images/The-Streak-Plate-Protocol.pdf?ext=.pdf>
- Khan, N., Ali, S., Shahid, M. A., Mustafa, A., Sayyed, R. Z., & Curá, J. Al. (2021). Insights into the interactions among roots, rhizosphere, and rhizobacteria for improving plant growth and tolerance to abiotic stresses: A review. *Cells*, 10(6), Article 155. <https://doi.org/10.3390/cells10061551>
- Li, S. S., Yang, Z. C., Wang, D., Li, S., Zhu, K., & Zhai, Y. (2023). Role of *Bacillus subtilis* BE-L21 in enhancing the heat tolerance of spinach seedlings. *Biologia Plantarum*, 67, 36-44. <https://doi.org/10.32615/bp.2023.001>
- Li, H., Li, Ch., Song, X., Li, J., Zhang, P., Sun, F., Geng, Z., & Liu, X. (2023). Isolation and identification of antagonistic *Bacillus amyloliquefaciens* HSE-12 and its effects on peanut growth and rhizosphere microbial community. *Sec. Microbe and Virus Interactions with Plants*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1274346>
- Li, Y. B., Zhang, Z. P., Yuan, Y., Huang, H. Ch., Mei, X. Y., Du, F., Yang, M., Liu, Y.-X., & Zhu, S. S. (2022). Appropriate soil heat treatment promotes growth and disease suppression of *Panax notoginseng* by Interfering with the Bacterial Community. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(3), 294-301. <https://doi.org/10.4014/jmb.2112.12005>
- Liu, B., Liu, G. H., Sengonca, C., Schumann, P., Wang, J. P., Zhu, Y. J., & Zhang, H. F. (2017). *Bacillus wudalianchiensis* sp. nov., isolated from grass soils of the Wudalianchi scenic area. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(8), 2897-2902. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002042>
- Miyashita, H., & Fujitac, K. (2019). Improvement of *Camelina sativa* yield using a plant growth-promoting rhizobacterium. *Soil Science and Plant Nutrition*, 65(6), 566-569.
- Mohite, B. (2013). Isolation and characterization of Indole Acetic Acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(3), 638-649.
- Nguyen, M. T., & Do, T. M. (2017). Nghiên cứu phân lập và tuyển chọn vi sinh vật nội sinh từ vùng sinh thái đất mặn tại Huyện Gao Thủy, tỉnh Nam Định [Research on isolation and selection of endophytic microorganisms from saline soil ecological zone in Gao Thuy District, Nam Dinh Province]. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 15(8), 1022-1032.
- Nguyen, G. V., Pham, H. H., Vu, D. T. N., Pham, H. K., & Pylnev, V. V. (2024). Isolation and characterization of Indole Acetic Acid-producing bacteria isolated from rhizospheric soil of paddy rice. *International Conference on Ensuring Sustainable Development: Ecology, Energy, Earth Science and Agriculture (AEES2023)*, Article 494. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202449404030>
- Notununu, I., Moleleki, L., Roopnarain, A., & Adeleke, R. (2022). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on the molecular responses of maize under drought and heat stresses: A review. *Pedosphere*, 32(1), 90-106.
- Paulsen, G. M. (1994). High temperature responses of crop plants. In *Physiology and determination of crop yield* (pp. 365-389).

- Peng, Q., Wang, H., Tong, J., Kabir, M. H., Huang, Z., & Xiao, L. (2013). Effects of indole-3-acetic acid and auxin transport inhibitor on auxin distribution and development of peanut at pegging stage. *Scientia Horticulturae*, 162, 76-81.
- Ping, L., Xinxing, G., Kunming, H., Liqin, S., & Yan, L. (2023). Isolation and efficient strain screening of microorganisms from peanut rhizosphere. *Archive*, 50(10), 4433-4447.
- Prasad, P. V. V., Craufurd, P. Q., Kakani, V. G., Wheeler, T. R., & Boote, K. J. (2001). Influence of high temperature during pre- and post-anthesis stages of floral development on fruit-set and pollen germination in peanut. *Functional Plant Biology*, 28, 233-240.
- Senthil, M., John, S., Lijo, H., & Samuel, J. (2024). *Isolation and identification of bacteria from heat treated rhizosphere soil*. https://www.researchgate.net/publication/380493069_Isolation_and_identification_of_bacteria_from_heat_treated_rhizosphere_soil
- Shepherd, M. D., Kharel, M. K., Bosserman, M. A., & Rohr, J. (2010). Laboratory maintenance of *Streptomyces* species. *Current Protocols in Microbiology*, 10(10E.1). <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc10e01s18>
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Reman, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant Signaling. *Federation of European Microbiological Societies*, 31, 425-448.
- Variath, M. T., & Janila, P. (2017). *Economic and academic importance of peanut*. Springer.
- Vasant, G., Bhatt, S., & Raghav, R. (2023). Isolation and molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria from groundnut (*Arachis hypogaea* L.) rhizosphere. *Current Agriculture Research Journal*, 11(1), 337-347.
- Vekataramappa, R., Mahadev, N. K., Venkatesh, S., Balakrishnan, K., Suryan, S., Shivashankar, N. G., & Seshagiri, S. (2022). Isolation, characterization and identification of multifaceted halotolerant *Bacillus licheniformis* and *Bacillus wudalianchiensis* from rhizospheric soils of bangalore. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciens*, 11(6), Article e3553.
- Verma, A., Pal, Y., Ojha, A. K., Kumari, M., Khatri, I., Rameshkumar, N., Schumann, P., Dastager, S. G., & Krishnamurthi, S. (2019). Taxonomic insights into the phylogeny of *Bacillus badius* and proposal for its reclassification to the genus *Pseudobacillus* as *Pseudobacillus badius* comb. nov. and reclassification of *Bacillus wudalianchiensis* Liu et al., 2017 as *Pseudobacillus wudalianchiensis* comb. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 42(3), 360-372.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703.
- Xu, L., Xu, W., Jiang, Y., Hu, F., & Li, H. (2015). Effects of interactions of auxin-producing bacteria and bacterial-feeding nematodes on regulation of peanut growths. *PLoS ONE*, 10(4), Article e0124361. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124361>
- Xu, W. Y., Wang, M. L., Sun, X. X., Shu, Ch. L., Zhang, J., & Geng, L. L. (2021). Peanut (*Arachis hypogaea* L.) pod and rhizosphere harbored different bacterial communities. *Rhizosphere*, 19, Article 100373.

- Yan, Z. D., Ye, L., Yue, W., Wen, W. G., Bing, W. B., & Ying, J. (2016). Isolation and identification of IAA-producing strains from peanut rhizosphere and its promoting effects on peanut growth. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 38(1), Article 104.
- Yuttavanichakul, W., Lawongsa, P., Wongkaew, S., Teaumroong, N., Boonkerd, N., Nomura, N., & Tittabutr, P. (2012). Improvement of peanut rhizobial inoculant by incorporation of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as biocontrol against the seed borne fungus, *Aspergillus niger*. *Biological Control*, 63(2), 87-97.
- Zhang, W., Zhang, B. W., Deng, J. F., Li, L., Yi, T. Y., & Hong, Y. Y. (2021). The resistance of peanut to soil-borne pathogens improved by rhizosphere probiotics under calcium treatment. *BMC Microbiol*, 21, Article 299. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02355-3>
- Zhang, X., Yang, Z., Wang, L., Yue, Y., Wang, L., & Yang, X. (2023). The effects of plant growth-promoting rhizobacteria on plants under temperature stress: A meta-analysis. *Rhizosphere*, 28, Article 100788.

