

Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân giải phosphate khó tan từ đất vùng rẫy lúa ở tỉnh Hải Dương

Nguyễn Thu Hương¹, Trần Thị Thúy Hà², Nguyễn Văn Giang^{1*}

¹Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Trung tâm Công nghệ sinh học thủy sản, Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản I

Ngày nhận bài 9/7/2018; ngày chuyển phản biện 11/7/2018; ngày nhận phản biện 31/7/2018; ngày chấp nhận đăng 7/8/2018

Tóm tắt:

Thí nghiệm này được tiến hành với mục đích phân lập, tuyển chọn và khảo sát một số đặc tính của các chủng vi khuẩn phân giải phosphate khó tan được phân lập từ các mẫu đất vùng rẫy lúa. Kết quả, từ các mẫu đất thu thập ở các xã thuộc huyện Gia Lộc, Hải Dương, 14 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải phosphate khó tan đã được phân lập và tuyển chọn. Trong đó, chủng GL2 và HD3 biểu hiện khả năng phân giải phosphate khó tan cao nhất, có khả năng tổng hợp IAA, siderophore. Khả năng phân giải phosphate khó tan của 2 chủng này mạnh nhất khi nuôi trong môi trường NBRIP với nguồn carbon là glucose, nguồn nitơ là cao nấm men hay các muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, NH_4NO_3 ở nhiệt độ 30°C, pH 5-7. Chủng vi khuẩn HD3 được định danh và ký hiệu là *Pseudomonas aeruginosa* HD3.

Từ khóa: IAA, nguồn carbon, nguồn nitơ, *Pseudomonas* sp., vi sinh vật phân giải phosphate, vùng rẫy.

Chỉ số phân loại: 1.6

Đặt vấn đề

Phospho (P) tham gia cấu trúc của axit nucleic, phospholipid, phytin và là thành phần của ADP, ATP, AMP, đóng vai trò quan trọng trong quá trình cố định, dự trữ và chuyển hóa năng lượng. P có trong thành phần của hệ thống coenzyme như NAD, NADP, FAD, FMN, đóng vai trò quan trọng trong các phản ứng oxy hóa khử của cây, đặc biệt là quá trình quang hợp và hô hấp. P thúc đẩy quá trình trao đổi nước và nâng cao khả năng chống chịu của cây trồng. Khi thiếu P, sự hình thành tế bào mới bị chậm lại, cây còi cọc, ít phân cành, bộ rễ cây phát triển kém, ảnh hưởng đến việc hấp thụ các chất dinh dưỡng, hạn chế quá trình quang hợp và hô hấp, ảnh hưởng đến quá trình đậu quả, quá trình chín của quả và hạt, giảm tính chống chịu, ảnh hưởng lớn đến năng suất cây trồng [1].

Đất trồng trọt ở nước ta hình thành trong vùng nhiệt đới ẩm có mức độ phong hóa mạnh nên hầu hết đất nghèo đến rất nghèo P. P dễ tiêu ở đất đồi đỏ vàng là 2-4 mg/100 g đất; đất đỏ bazan, đất xám là 3-5 mg; đất phèn 2-8 mg; đất lúa nước 5-10 mg; đất bạc màu 3-5 mg; đất cát biển 1-5 mg/100 g đất. Đất phù sa sông Hồng có lượng P dễ tiêu khá hơn. Trong môi trường đất chua (pH<4,5), nghèo Ca^{2+} , Mg^{2+} , hàm lượng Al^{3+} và Fe^{3+} tự do rất cao nên dạng P hòa tan trong nước hầu như rất ít, P trong đất tồn tại chủ yếu ở

dạng photphat sắt, photphat nhôm kết tủa đến 80% [2]. Chỉ khoảng 25% lượng P bón vào đất được cây trồng sử dụng, phần còn lại thường bị cố định bởi các ion nhôm, sắt thành dạng không dễ cho cây trồng sử dụng [3]. Nhiều loài vi sinh vật cư trú tại vùng rẫy cây trồng có khả năng chuyển hóa các hợp chất phosphate vô cơ khó tan thành dạng phosphate dễ được hấp thụ bởi rễ cây [4] bằng cách tiết ra các acid hữu cơ, enzyme phosphatase [5]. Nghiên cứu này được tiến hành với mục đích phân lập, tuyển chọn chủng vi sinh vật có khả năng phân giải phosphate khó tan từ đất vùng rẫy lúa.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Các mẫu đất vùng rẫy lúa được thu tại các xã Gia Khánh, Gia Tân, Gia Lương, Hoàng Diệu, huyện Gia Lộc, tỉnh Hải Dương. Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 11/2017-7/2018 tại Phòng thí nghiệm công nghệ vi sinh, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

Phương pháp nghiên cứu

Phân lập chủng vi sinh vật phân giải phosphate: các mẫu đất được sấy khô, nghiền nhỏ. Lấy 1 g đất pha với nước cất vô trùng đến nồng độ pha loãng 10^{-5} - 10^{-6} . Hút 0,5 ml dung dịch đất đã pha loãng ở nồng độ trên cấy trải trên

*Tác giả liên hệ: Email: nvgiang@vnua.edu.vn

Isolation, identification and characterisation of phosphate solubilising bacteria from rice rhizosphere

Thu Huong Nguyen¹, Thi Thuy Ha Tran²,
Van Giang Nguyen^{1*}

¹Vietnam National University of Agriculture

²Research Institute for Aquaculture No 1

Received 9 July 2018; accepted 7 August 2018

Abstract:

This study was carried out with the aim to isolate and characterise the phosphate solubilising bacteria from rice rhizosphere soil samples in Gia Loc district, Hai Duong province. From soil samples collected from the area, 14 bacterial strains with phosphate solubilising activity were isolated. Two strains of them GL2 and HD3 exhibited the maximum activity and could produce phytohormone IAA and siderophore. The strains GL2 and HD3 exhibited highest phosphate solubilising activity when they were cultured in a NBRIP medium with glucose as carbon sources and yeast extract or salts $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, NH_4NO_3 as nitrogen sources at 30°C, pH 5-7. The bacterial strain HD3 had identified and named *Pseudomonas aeruginosa* HD3.

Keywords: carbon source, IAA, nitrogen source, phosphate solubilising bacteria (PSB), *Pseudomonas* sp., rhizosphere.

Classification number: 1.6

đĩa petri chứa môi trường NBRIP theo mô tả của Chung và cs (2005) [6]. Các đĩa petri này được đặt trong tủ nuôi cấy ở 30°C, quan sát sự hình thành khuẩn lạc. Chủng vi khuẩn có khả năng phân giải phosphate sẽ tạo vòng sáng xung quanh khuẩn lạc. Môi trường NBRIP (g/l): glucose 10, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25, KCl 0,2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 và pH 7,0.

Hoạt độ phân giải phosphate: các chủng vi sinh vật được nuôi trong môi trường NBRIP lỏng ở 30°C, 4 ngày, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Dịch nuôi được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút, ở 4°C, thu dịch nổi để kiểm tra hàm lượng PO_4^{3-} được giải phóng vào môi trường bằng phương pháp Xanh molipdate [7].

Xác định khả năng sinh IAA: các chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi trong môi trường LB lỏng được bổ sung

100 mg/l L-tryptophan, lắc ở 200 vòng/phút trong bóng tối. Dịch nuôi vi khuẩn được ly tâm 10.000 vòng/phút, ở 4°C trong 15 phút. Thu dịch nổi để kiểm tra khả năng sinh tổng hợp IAA bằng thuốc thử Salkowskitheo theo Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN10784:2015 [8].

Khả năng tổng hợp siderophore: các chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi trên môi trường thạch CAS. Nếu chủng vi khuẩn tổng hợp siderophore, môi trường thạch xung quanh khuẩn lạc sẽ có màu vàng chanh hay vàng đậm. Môi trường CAS gồm chrome azurol S (CAS) 60,5 mg, hexadecyltrimethyl amoni bromua (HDTMA) 72,9 mg, Piperazin-1,4-bis (acid 2-ethanesulfonic) (PIPETS) 30,24 g, 1mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ trong 10mM HCl 10 ml, agar (0,9% w/v).

Ảnh hưởng của nguồn carbon: chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi trong môi trường NBRIP lỏng với các nguồn carbon là glucose, fructose, xylose, maltose, manitose, lactose, saccarose, dextrin ở 30°C, 4 ngày, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Dịch nuôi được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút, ở 4°C, thu dịch nổi để kiểm tra hàm lượng PO_4^{3-} được giải phóng vào môi trường bằng phương pháp Xanh molipdate [7].

Ảnh hưởng của nguồn nitơ: chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi trong môi trường NBRIP lỏng với các nguồn nitơ là $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , KNO_3 , NH_4NO_3 , NH_4Cl , pepton, cao nấm men, casein ở 30°C, 4 ngày, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Dịch nuôi được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút, ở 4°C, thu dịch nổi để kiểm tra hàm lượng PO_4^{3-} được giải phóng vào môi trường bằng phương pháp Xanh molipdate [7].

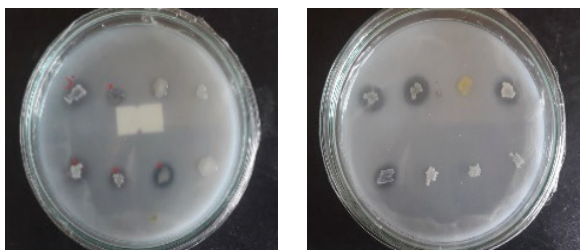
Khảo sát ảnh hưởng của pH và nhiệt độ môi trường: các chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi lỏng lắc trong môi trường NBRIP lỏng, tốc độ 200 vòng/phút, tại các giá trị pH (4, 5, 6, 7, 8, 9) và nhiệt độ 25, 30, 37 và 40°C. Sau 4 ngày, dịch nuôi vi khuẩn được ly tâm 10.000 vòng/phút, trong 10 phút, ở 4°C. Hàm lượng PO_4^{3-} giải phóng vào môi trường được xác định theo phương pháp Xanh molybdate [7].

Định danh chủng HD3: chủng vi khuẩn HD3 được định danh theo phương pháp giải trình tự nucleotide 16S rRNA tại Công ty TNHH Phù Sa và so sánh với các trình tự nucleotide trên Genbank NCBI bằng phần mềm BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Kết quả và thảo luận

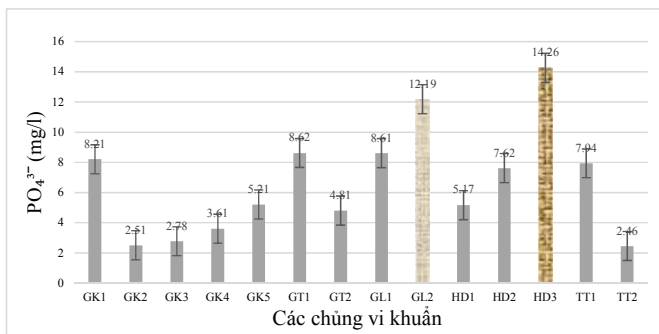
Phân lập chủng vi khuẩn phân giải phosphate

Từ các mẫu đất thu được tại các xã thuộc huyện Gia Lộc, Hải Dương, tiến hành pha loãng mẫu đất và cấy trải trên môi trường NBRIP. Sau 5 ngày, dựa trên vòng phân giải phosphate xuất hiện xung quanh khuẩn lạc, 14 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải phosphate khó tan đã được phân lập và cấy chuyển để làm thuần (hình 1).



Hình 1. Kết quả phân lập chủng vi sinh vật phân giải phosphate trên môi trường NBRIP.

Các chủng này được nuôi trong môi trường NBRIP lỏng để khảo sát hoạt độ phân giải phosphate khó tan. Sau 3 ngày, dịch nuôi vi khuẩn được ly tâm, thu phần dịch nổi để kiểm tra lượng PO_4^{3-} được giải phóng vào môi trường theo phương pháp được Ames (1966) mô tả [7]. Kết quả (hình 2) cho thấy, tất cả 14 chủng này đều có khả năng phân giải phosphate khó tan.



Hình 2. Hoạt độ phân giải phosphate của các chủng phân lập được.

Lượng phosphate được phân giải từ các chủng này dao động từ 2,46 đến 14,26 mg/l. Hai chủng biểu hiện khả năng phân giải phosphate khó tan mạnh nhất là HD3 và GL2 với hàm lượng tương ứng là 14,26 và 12,19 mg/l. Các chủng vi khuẩn vùng rễ thường có khả năng phân hủy nhiều loại cơ chất, trong đó có phosphate để cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng. Baliah và cs (2016) [3] đã tuyển chọn được *Bacillus megaterium*, *P. putida* và *P. fluorescence* với hoạt độ phân giải phosphate cao. Islam và cs (2007) [9] đã thu nhận được một số chủng vi khuẩn từ vùng rễ lúa (*Oryza sativa* L. cv. BR29) có khả năng phân giải phosphate cao như *Acinetobacter* sp. BR-12, *Klebsiella* sp. BR-15, *Acinetobacter* sp. BR-25, *Enterobacter* sp. BR-26, *Microbacterium* sp. BRS-1 và *Pseudomonas* sp. BRS-2. Trong đất, P thường bị cố định bởi các ion nhôm, sắt dưới dạng phosphate nhôm và phosphate sắt, vì vậy sau khi đánh giá khả năng phân hủy phosphate canxi, 5 chủng có hoạt độ mạnh nhất được kiểm tra khả năng phân giải phosphate nhôm và sắt. Kết quả cả 5 chủng này đều không có khả năng hòa tan AlPO_4 hay FePO_4 khi các hợp chất này được sử dụng như nguồn P trong môi trường nuôi cấy. Islam và cs (2007) cũng thu được kết quả tương tự khi đánh giá khả năng phân

giải phosphate của các vi khuẩn phân lập được từ vùng rễ lúa [9]. Dựa trên hoạt độ phân giải phosphate canxi trong môi trường nuôi, chủng GL2 và HD3 được chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Khảo sát khả năng sinh IAA và siderophore

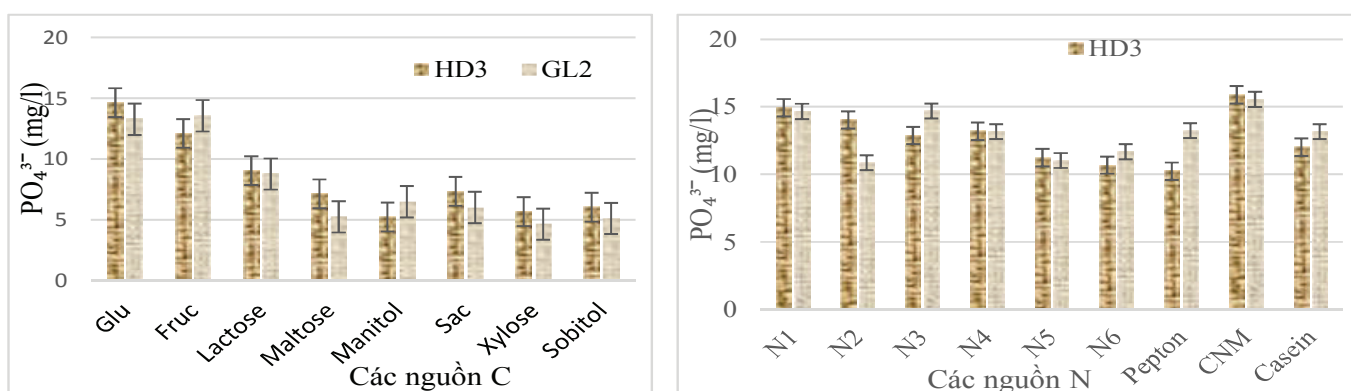
Các chủng vi sinh vật vùng rễ thường được xem như là các vi sinh vật kích thích sinh trưởng cây trồng, vì chúng không chỉ tiết ra các enzyme ngoại bào để phân hủy các cơ chất trong đất xung quanh rễ cây thành các chất dễ được cây hấp thụ, mà còn tổng hợp các chất kích thích sinh trưởng cây trồng, hợp chất vận chuyển sắt [10]. Hai chủng vi khuẩn GL2 và HD3 đã được khảo sát khả năng sinh tổng hợp IAA và siderophore. Kết quả cho thấy, hai chủng này trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* đã tổng hợp IAA với hàm lượng 9,86 và 8,92 $\mu\text{g/ml}$ tương ứng với chủng HD3 và GL2. Cả hai chủng khi nuôi cấy trên môi trường CAS đều làm môi trường chuyển sang màu vàng chanh, chứng tỏ chúng đã tổng hợp được siderophore - một hợp chất quan trọng giúp vi sinh vật vùng rễ thu nhận sắt từ môi trường xung quanh. Một số nghiên cứu khác cũng đã khẳng định vi sinh vật phân giải phosphate được phân lập từ vùng rễ các loại cây lương thực đều có khả năng tổng hợp IAA ở các nồng độ khác nhau [11, 12].

Ảnh hưởng của nguồn carbon và nitơ

Hai chủng vi khuẩn GL2 và HD3 được đánh giá khả năng hòa tan phosphate sau 4 ngày nuôi trong môi trường NBRIP lỏng với các nguồn nitơ và carbon khác nhau. Kết quả (hình 3) cho thấy, chúng đều sử dụng được các nguồn carbon trong môi trường nuôi cấy và biểu hiện khả năng phân giải phosphate.

Hàm lượng PO_4^{3-} (mg/l) được giải phóng bởi chủng HD3 dao động trong khoảng 5,22 đến 14,26 mg/l, chủng GL2 trong khoảng 4,64 đến 13,56 mg/l. Nguồn carbon thích hợp với chủng HD3 là glucose, với chủng GL2 là fructose. Khi đánh giá ảnh hưởng của các nguồn carbon tới khả năng phân giải phosphate của các chủng vi khuẩn phân lập từ đất, Mujahid và cs (2015) [13] nhận thấy, glucose và fructose là nguồn carbon thích hợp nhất với các chủng này. Mardad và cs (2014) [14] đã báo cáo, các chủng vi khuẩn nghiên cứu đều có khả năng phân giải phosphate mạnh khi được nuôi trong môi trường có glucose. Baliah và cs (2016) lại kết luận rằng, các chủng vi khuẩn phân giải phosphate ưa thích sử dụng maltose và lactose, trong khi saccarose là nguồn carbon không thích hợp [3].

Khi được nuôi 4 ngày trong môi trường NBRIP có bổ sung các nguồn nitơ khác nhau, khả năng phân giải phosphate của hai chủng GL2 và HD3 có sự biến động tùy theo nguồn nitơ được sử dụng. Hàm lượng phosphate được giải phóng bởi chủng HD3 dao động trong khoảng 10,23 đến 15,9 mg/l, của chủng GL2 trong khoảng 10,86 đến 15,6 mg/l. Nguồn nitơ hữu cơ thích hợp với chủng HD3 và GL2



Hình 3. Ảnh hưởng của nguồn carbon và nitơ đến khả năng phân giải phosphate của hai chủng GL2 và HD3 (Glu: Glucose; Fruc: fructose; Sac: saccarose; N1: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; N2: NH_4Cl ; N3: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; N4: NH_4NO_3 ; N5: NaNO_3 ; N6: KNO_3 ; CNM: cao nấm men).

là cao nấm men, nguồn nitơ vô cơ là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, NH_4NO_3 . Các chủng vi khuẩn phân giải phosphate trong nghiên cứu của Baliah và cs (2016) lại ưa thích NH_4Cl , NH_4NO_3 , KNO_3 [3]. Ngược lại, theo báo cáo của Mujahid và cs (2015), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 là nguồn nitơ được các chủng phân giải phosphate ưa sử dụng [13]. Một số nghiên cứu công bố rằng nguồn nitơ dạng ammonia tốt hơn dạng nitrate [15].

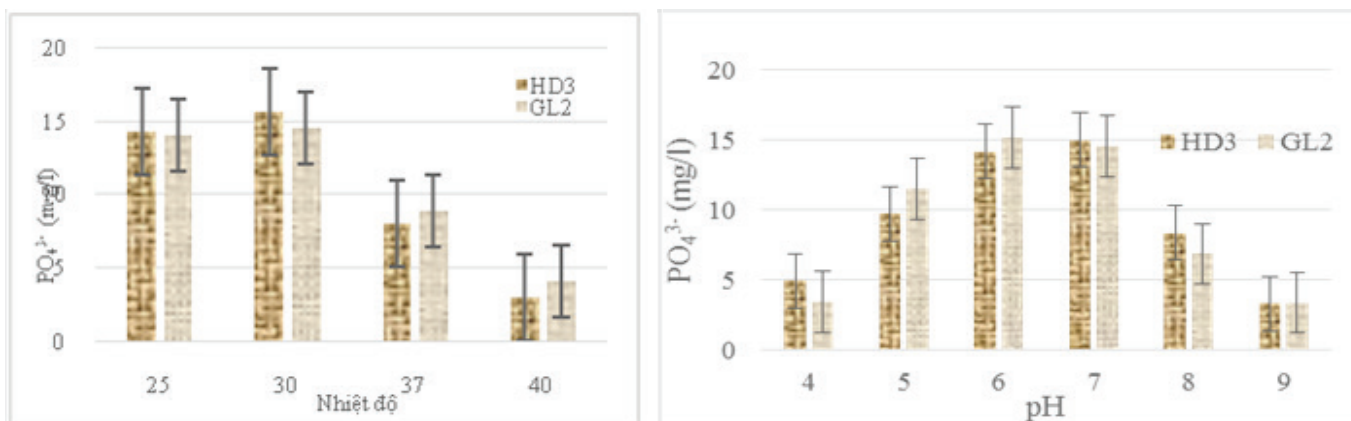
Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và pH môi trường

Nhiệt độ và pH môi trường là các thông số vật lý ảnh hưởng mạnh tới sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật, tới các hoạt động trao đổi chất, các phản ứng được xúc tác bởi các enzyme, vì nhiệt độ quá thấp hay quá cao có thể làm chậm quá trình tổng hợp enzyme hoặc làm enzyme bị biến tính. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của pH và nhiệt độ môi trường nuôi tới khả năng phân giải phosphate của hai chủng GL2 và HD3 được trình bày ở hình 4.

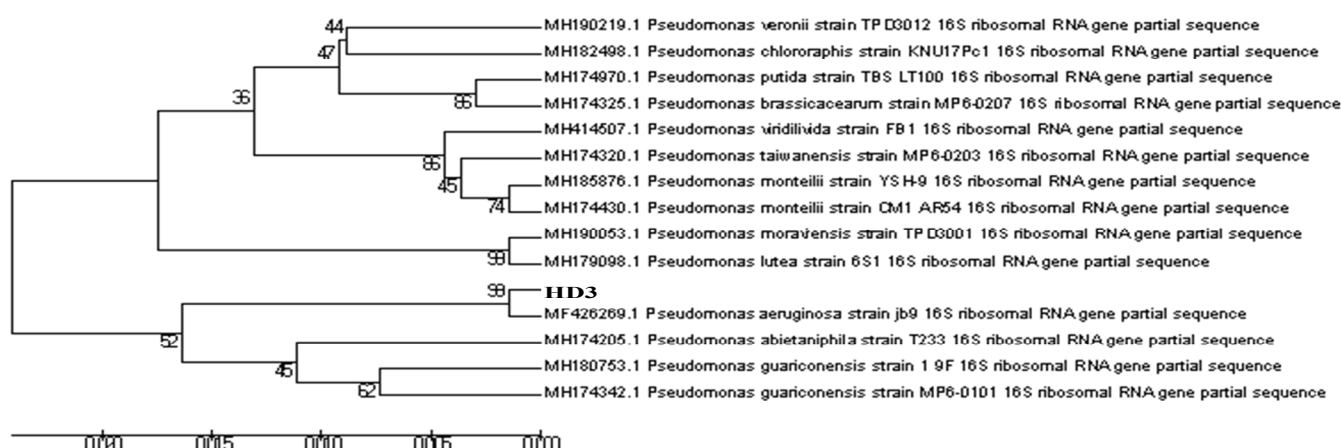
Khả năng phân giải phosphate của hai chủng vi khuẩn GL2 và HD3 tăng khi nhiệt độ thấp hơn 30°C . Khi tăng nhiệt độ cao hơn 30°C , khả năng phân giải phosphate giảm, chứng tỏ enzyme phân giải phosphate hoặc khả năng tổng hợp các acid hữu cơ của chủng vi khuẩn nghiên cứu giảm.

Mujahid và cs (2015) thông báo, các chủng vi khuẩn biểu hiện khả năng hòa tan phosphate mạnh ở 30°C , tăng nhiệt độ dẫn đến giảm khả năng phân giải phosphate [13]. Nhiệt độ tối ưu để các chủng vi khuẩn biểu hiện khả năng hòa tan phosphate được các nhà nghiên cứu công bố rất khác nhau. Theo Shahab và Ahmed (2009) [16], 25°C là nhiệt độ tối ưu cho các chủng vi khuẩn hòa tan phosphate, trong khi Kang và cs (2002) cho rằng nhiệt độ tối ưu là 28°C [17], Mardad và cs (2014) kết luận nhiệt độ thích hợp với chủng *Enterobacter hormaechei* là 37°C [14].

pH cũng là thông số ảnh hưởng mạnh tới sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật, thông qua tác động tới vận chuyển một số sản phẩm qua màng tế bào, mỗi chủng vi sinh vật sẽ phát triển tốt trong dải pH thích hợp. Trong thí nghiệm này, hai chủng GL2 và HD3 biểu hiện khả năng phân giải phosphate mạnh tại pH 5-7. Tại các giá trị pH khác, khả năng phân giải phosphate của hai chủng này không cao (hình 4). Kết quả thu được tương tự với kết quả đã được Mardad và cs (2014) công bố [14]. Mujahid và cs (2015) kết luận pH 5-7 rất thích hợp với các chủng vi khuẩn có khả năng hòa tan phosphate, khả năng này giảm khi pH thấp hơn 5 hoặc cao hơn 8 [13]. Các vi sinh vật như *B. subtilis*, *B. megaterium* và *P. aeruginosa* tổng hợp lượng lớn enzym phosphatase



Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường và pH tới khả năng phân giải phosphate của chủng GL2 và HD3.



Hình 5. Kết quả định danh, phân loại chủng vi khuẩn HD3 dựa trên so sánh trình tự nucleotide 16S rRNA.

trong môi trường nuôi cấy để khoáng hóa phosphate hữu cơ. Phosphatase có nguồn gốc vi sinh vật đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân giải phosphate. Enzyme này được phân loại thành enzyme phosphatase kiềm và acid. Phosphatase acid thúc đẩy quá trình phân giải các cơ chất phosphate tổng hợp như p-nitrophenyl phosphate [3].

Định danh chủng vi khuẩn HD3

Kết quả so sánh trình tự nucleotide 16S rRNA của chủng HD3 với các trình tự nucleotide 16S rRNA trên Ngân hàng gen NCBI bằng chương trình BLAST và dựng cây phân loại được trình bày ở hình 5.

Chủng HD3 có quan hệ rất gần với chủng *P. aeruginosa* jb9, do đó chủng HD3 được ký hiệu là *P. aeruginosa* HD3.

Kết luận

Từ các mẫu đất thu thập ở các xã thuộc huyện Gia Lộc, Hải Dương, 14 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải phosphate khó tan đã được phân lập và tuyển chọn. Trong đó, hai chủng GL2 và HD3 biểu hiện hoạt tính phân giải phosphate cao nhất, có khả năng sinh tổng hợp IAA, siderophore, chúng đều sinh trưởng và biểu hiện hoạt tính phân giải phosphate mạnh nhất khi được nuôi trong môi trường NBRIP với nguồn carbon là glucose và fructose, nguồn nitơ là cao nấm men hoặc các muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, NH_4NO_3 tại 30°C, pH 5-7. Chủng vi khuẩn HD3 được định danh và ký hiệu là *P. aeruginosa* HD3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] S. Alam, et al. (2002), "In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere", *Int. J. Agri. Biol.*, **4**(4), pp.454-458.

[2] <http://tnnn.hoingonddan.org.vn/sitespages/news/1093/46470/hieu-luc-su-dung-cac-loai-phan-lan-rat-thap-vi-sao>.

[3] T. Baliah, et al. (2016), "Isolation, identification and characterization of phosphate solubilizing bacteria from different crop soils of Srivilliputtur Taluk, Virudhunagar District, Tamil Nadu", *Tropical Ecology*, **57**(3), pp.465-474.

[4] A. Dave, H.H. Patel (2003), "Impact of different carbon and nitrogen sources on phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens*", *Indian Journal of Microbiology*, **43**, pp.33-36.

[5] H. Fankem, et al. (2006), "Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon", *African Journal of Biotechnology*, **5**, pp.2450-2460.

[6] H. Chung, et al. (2005), "Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea", *Soil Biol. Biochem.*, **37**(10), pp.1970-1974.

[7] B.N. Ames (1966), "Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphate", *Methods in Enzymology*, **8**, pp.115-118.

[8] TCVN10784:2015 (2015), *Vi sinh vật - Xác định khả năng sinh tổng hợp axit 3-indol acetic (IAA)*.

[9] T.M. Islam, et al. (2007), "Isolation and identification of potential Phosphate Solubilizing Bacteria from the Rhizoplane of *Oryza sativa* L. cv. BR29 of Bangladesh", *Z. Naturforsch. C.*, **62**(1-2), pp.103-110.

[10] P. Vejan, et al. (2016), "Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability - a review", *Molecule*, **21**, doi: 10.3390/molecules21050573.

[11] J.M. Mulissa, et al. (2015), "Characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria isolated from lentil growing areas of Ethiopia", *African Journal of Microbiology Research*, **9**(25), pp.1637-1648.

[12] S. Shahab, N. Ahmed, N.S. Khan (2009), "Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs", *Afr. J. Agric. Res.*, **4**, pp.1312-1316.

[13] T.Y. Mujahid, et al. (2015), "Effects of different physical and chemical parameters on phosphate solubilization activity of plant growth promoting bacteria isolated from indigenous soil", *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, **5**, pp.64-70.

[14] I. Mardad, et al. (2014), "Effect of carbon, nitrogen sources and abiotic stress on phosphate solubilization by bacterial strains isolated from a moroccan rock phosphate deposit", *J. Adv. Chem. Eng.*, **4**(1), doi: 10.4172/2090-4568.1000102.

[15] P. Illmer, F. Schinner (1995), "Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms", *Soil Biol. Biochem.*, **27**, pp.257-263.

[16] S. Shahab, N. Ahmed (2009), "Effect of various parameters on the efficiency of zincphosphate solubilization by indigenous bacterial isolates", *Afr. J. Biotechnol.*, **7**, pp.1543-1549.

[17] S.C. Kang, et al. (2002), "Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a soil-inhabiting fungus *Fomitopsis* sp. PS 102", *Curr. Sci.*, **82**, pp.439-442.