

Đặc điểm sinh học và định danh chủng vi khuẩn *Bacillus altitudinis* T1008 phân lập từ đất nhiễm mặn

Nguyễn Đức Thành^{1*}, Nguyễn Thế Quyết¹, Hà Viết Cường², Đỗ Tấn Dũng²,
Đào Thị Thu Hằng¹, Phạm Thị Lý Thu¹, Phạm Xuân Hội¹

¹Viện Di truyền Nông nghiệp

²Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 15/6/2020; ngày chuyển phản biện 18/6/2020; ngày nhận phản biện 20/7/2020; ngày chấp nhận đăng 29/7/2020

Tóm tắt:

Chủng vi khuẩn T1008 được phân lập từ các mẫu đất bị nhiễm mặn thu thập tại tỉnh Bến Tre trên môi trường Pikovskaya, Luria-Bertani có bổ sung NaCl 1% đã được nghiên cứu và định danh tên loài. Kết quả cho thấy, khuẩn lạc của chủng vi khuẩn có dạng tròn không đều, màu trắng đến vàng nhạt, tế bào có hình que ngắn, di động, gram dương, tạo bào tử và chịu được nồng độ NaCl 5%, có hoạt tính phân giải lân vô cơ và tổng hợp indole acetic acid (IAA) trong điều kiện *in vitro*, có thể sinh trưởng phát triển tốt ở điều kiện nhiệt độ từ 25-40°C. Vùng gen 16S ARN ribosome có mức tương đồng 100% với loài vi khuẩn *Bacillus altitudinis*. Đây là chủng vi khuẩn lần đầu tiên được công bố có tiềm năng tạo chế phẩm vi sinh ứng dụng trong trồng trọt trên vùng đất bị nhiễm mặn.

Từ khóa: *Bacillus altitudinis*, đất nhiễm mặn, IAA, lân vô cơ, tạo bào tử.

Chỉ số phân loại: 1.6

Đặt vấn đề

Tính đến đầu tháng 3/2020 đã có 5 tỉnh (Kiên Giang, Bến Tre, Tiền Giang, Cà Mau, Long An) thuộc vùng Đồng bằng sông Cửu Long công bố tình huống khẩn cấp về hạn hán và xâm nhập mặn. Mặc dù các địa phương đã rút kinh nghiệm từ những đợt hạn hán và xâm nhập mặn trước đây nhưng vẫn không tránh được thiệt hại. Tỉnh Bến Tre là địa phương chịu ảnh hưởng sớm nhất của xâm nhập mặn. Đợt hạn mặn 2015-2016 được xem là kỷ lục, 100 năm mới lặp lại thì mùa khô năm 2020 đã phá vỡ mọi kỷ lục được xác lập trước đó.

Nhiều loài vi khuẩn như các loài thuộc chi *Bacillus* khi lây nhiễm lên cây trồng giúp cho cây trồng tăng khả năng chống khô hạn, chịu được độ mặn trong đất hoặc trong nước tưới, đóng vai trò quan trọng trong quá trình thâm thấu và tạo điều kiện cho sự hấp thụ nước có nồng độ muối cao hơn [1, 2]. Bên cạnh đó, các loài vi khuẩn này cũng đóng vai trò trực tiếp hoặc gián tiếp giúp tăng sức đề kháng, khả năng chống chịu bệnh, đồng thời tăng khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng trong đất. Loài vi khuẩn *B. altitudinis* đã được nghiên cứu ứng dụng vào sản xuất nông nghiệp, phân bố rộng rãi trong khí quyển, đất, nước và cây trồng dưới dạng nội sinh [3]. Vi khuẩn *B. altitudinis* đã được nghiên cứu có nhiều hoạt tính sinh học như có khả năng phân giải lân vô cơ, kali, HCN, tổng hợp IAA, phân giải lông vũ và đối kháng với tác

nhân gây bệnh cây như vi khuẩn và nấm bệnh [4-9].

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập, xác định được các chủng vi khuẩn *B. altitudinis* có khả năng chịu NaCl và có hoạt tính sinh học trong việc tạo ra chế phẩm vi sinh vật cho sản xuất cây ăn quả (bưởi Da xanh, sầu riêng) tại tỉnh Bến Tre nói riêng, Đồng bằng sông Cửu Long nói chung.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Mẫu đất trồng cây sầu riêng, cây bưởi Da xanh nhiễm mặn thu thập ở tỉnh Bến Tre.

Thí nghiệm phân lập, định danh, đánh giá hoạt tính, đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn *B. altitudinis* T1008 được thực hiện tại Bộ môn Công nghệ vi sinh, Viện Di truyền Nông nghiệp.

Phương pháp nghiên cứu

Môi trường nuôi cấy:

Môi trường Pikovskaya (PVK) dùng để phân lập vi khuẩn có khả năng phân giải lân khó tan, chứa nguồn lân vô cơ là $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, gồm: glucose (10,0 g), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (5,0 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5 g), KCl (0,2 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g), MnSO_4 (0,002 g), FeSO_4 (0,002 g), cao nấm men (0,5 g),

* Tác giả liên hệ: Email: thanhnguyen.at@gmail.com

Identification and biological characteristics of *Bacillus altitudinis* strain T1008 isolated from affected saline soils

Duc Thanh Nguyen^{1*}, The Quyet Nguyen¹,
Viet Cuong Ha², Tan Dung Do², Thi Thu Hang Dao¹,
Thi Ly Thu Pham¹, Xuan Hoi Pham¹

¹Agricultural Genetics Institute

²Department of Agronomy, Vietnam National University
of Agriculture

Received 15 June 2020; accepted 29 July 2020

Abstract:

Bacillus altitudinis T1008 strain was isolated from saline soil samples collected in Ben Tre province using Pikovskaya and Luria-Bertani medium containing sodium chloride 1% was determined and identified to level species. The results showed that the colonies were irregularly round, white to pale yellow; the cell was short rod-shaped, and motile. This strain was a gram-positive, spore-forming bacterium and resistant to sodium chloride 5% level; hydrolysed the inorganic phosphate compounds, synthesised indole acetic acid under *in vitro* conditions, and grew and developed well at temperature between 25-40°C. The result of the 16S ribosomal RNA sequence analysis indicated that this strain showed a similarity of 100% to *Bacillus altitudinis* species, *Bacillus* genus. This is the first report of *B. altitudinis* T1008 strain as a potential microbial inoculant for crop production in affected saline soils.

Keywords: affected saline soil, *B. altitudinis*, IAA, inorganic phosphate, spore-forming.

Classification number: 1.6

agar (20,0 g) và nước cất 1.000 ml.

Môi trường Luria-Bertani (LB) dùng để phân lập vi khuẩn có khả năng tổng hợp chất kích thích sinh trưởng thực vật, gồm: tryptone (10,0 g), cao nấm men (5,0 g), NaCl (10,0 g), agar (20,0 g) và nước cất 1.000 ml.

Phương pháp thu thập mẫu: thu thập mẫu đất trồng cây sầu riêng, bưởi Da xanh tại huyện Chợ Lách, tỉnh Bến Tre đã bị nhiễm mặn. Mẫu đất được lấy ở độ sâu tầng đất 0-30 cm, 0,5 kg đất/mẫu, cho vào lọ nhựa sạch, ghi thông tin mẫu thu thập.

Phương pháp phân lập: cân 10 g mẫu đất thu thập, nghiền nhỏ rồi cho vào bình tam giác loại 250 ml có chứa 100 ml nước cất vô trùng, lắc trên máy (100 vòng/phút trong 20 phút). Tiếp tục pha loãng mẫu theo dãy thập phân liên tiếp cho đến khi dung dịch mẫu có nồng độ pha loãng 10^{-6} . Ở mỗi một nồng độ pha loãng, dùng pipet hút lấy 0,1 ml dung dịch sang đĩa petri chứa môi trường đặc hiệu PVK có bổ sung thêm NaCl 1%. Dùng que cấy vô trùng chạch đều, sau đó đặt đĩa nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ 30°C trong 4-7 ngày. Chủng vi khuẩn có đặc điểm hình thái đặc trưng được cấy chuyển sang các đĩa petri chứa môi trường mới để làm thuần.

Phương pháp xác định một số đặc điểm hình thái: hình thái khuẩn lạc và tế bào, nhuộm gram, khả năng di động của mẫu phân lập được tiến hành phân tích theo phương pháp mô tả của Nguyễn Xuân Thành và cs (2007) [10].

Phương pháp xác định khả năng phân giải lân vô cơ: chủng vi khuẩn có hoạt tính phân giải lân hình thành vòng phân giải (hay vòng tròn trong suốt) bao quanh khuẩn lạc trên môi trường PVK. Đường kính vòng phân giải lân $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ được xác định theo công thức:

$$k = D - d \text{ (cm)}$$

Trong đó: k là hệ số phân giải; D là đường kính vòng phân giải (cm); d là đường kính lỗ đục (cm).

Phương pháp xác định khả năng sinh IAA: chủng vi khuẩn sau khi làm thuần được nuôi cấy trên môi trường LB lỏng có bổ sung 0,1% tryptophan ở 28°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút trên máy lắc ổn nhiệt trong thời gian 2 ngày. Sau 2 ngày nuôi cấy, ly tâm ống nghiệm nuôi dịch vi khuẩn ở tốc độ 5.000 vòng/phút trong 10 phút. Loại bỏ cặn, thu dịch trên tủa để kiểm tra khả năng sinh tổng hợp IAA bằng thuốc thử Salkowski theo theo Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 10784:2015 [11]. Nếu thấy dịch thử nghiệm chuyển sang màu đỏ, hồng, hoặc hồng nhạt thì chứng tỏ có IAA thô đã được sinh ra trong môi trường nuôi cấy.

Phương pháp xác định danh tính vi khuẩn bằng PCR và giải trình tự:

Tách chiết ADN tổng số: ADN tổng số của vi khuẩn được chiết bằng NaOH có cải tiến theo phương pháp của Wang và cs (1993) [12]. Khuẩn lạc thuần (30 mg) trên môi trường PVK được cho vào ống eppendorf loại 2,0 ml có chứa 50 µl NaOH 0,5 M, nghiền mẫu bằng đầu tip xanh. ADN tổng số được hòa trong 50 µl đệm Tris 0,1 M, pH 8,0 và được bảo quản ở điều kiện -20°C cho đến khi sử dụng.

Phản ứng PCR và giải trình tự: sử dụng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') và 1525R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') [13] để nhân vùng gen 16S ARN ribosome của vi khuẩn. Cho vào mỗi tuýp PCR loại 0,5 ml với tổng thể tích phản ứng là 25 µl, trong đó có chứa 2,5 µl đệm PCR, 0,5 µl dNTPs, 1 µl mỗi loại mồi, 1

μl ADN tổng số và 18,8 μl nước cất vô trùng, khử ion. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% trong đệm TAE 1X với thời gian 20 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Giải trình tự trực tiếp 2 chiều với bộ môi dùng trong phản ứng PCR của Hãng Macrogen (Hàn Quốc).

Phân tích phả hệ: dựa vào trình tự nucleotide thu được, tìm kiếm các trình tự gần gũi bằng chương trình trực tuyến BLAST search tại NCBI (bảng 1). Chủng vi khuẩn *Pseudomonas boreopolis* được sử dụng làm đối chứng. Phương pháp phân tích trình tự và phả hệ được thực hiện với các phần mềm ClustalW2 [14] và MEGA 6.0 [15].

Bảng 1. Các loài vi khuẩn *Bacillus* spp. dùng trong phân tích phả hệ vùng gen 16S ARN ribosome.

Tên loài	Mẫu phân lập	Mã truy cập Ngân hàng gen	Quốc gia
<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b ^T	NR_042337	Singapore
<i>Bacillus altitudinis</i>	Cr2-1 ^T	CP031774	Belarus
<i>Bacillus altitudinis</i>	IHB B1644	MT328683	Ấn Độ
<i>Bacillus atrophaeus</i>	JCM 9070 ^T	NR_024689	Nhật Bản
<i>Bacillus atrophaeus</i>	GLPB6	HF545325	Ấn Độ
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579 ^T	NR_074540	Pháp
<i>Bacillus halodurans</i>	DSM 497 ^T	NR_025446	Đức
<i>Bacillus halodurans</i>	38C-2-1	AB274919	Nhật Bản
<i>Bacillus velezensis</i>	FZB42 ^T	NR_075005	Đức
<i>Bacillus velezensis</i>	BB06	MN818627	Đức
<i>Pseudomonas boreopolis</i>	ATCC 33662 ^T	NR_040801	-

Ghi chú: ^T: mẫu chuẩn của loài (type species).

Kết quả và thảo luận

Một số đặc điểm hình thái

Mẫu phân lập T1008 được đánh giá sơ bộ có hoạt tính tốt, như khả năng chịu được NaCl 1%, có hoạt tính phân giải lân vô cơ, mang các đặc điểm hình thái cơ bản của loài vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*. Do đó, mẫu phân lập này đã được lựa chọn để định danh tên loài và xác định một số đặc điểm sinh học trong nghiên cứu này. Đặc điểm hình thái của mẫu phân lập T1008 được trình bày ở bảng 2.

Khuẩn lạc mẫu phân lập T1008 có mép hình răng cưa, bề mặt lồi, bóng mịn trên môi trường PVK và LB. Tế bào hình que ngắn, có khả năng di động, tạo bào tử, nhuộm gram dương, hình thành đường kính vòng phân giải lân trên môi trường PVK. Một số đặc điểm hình thái của mẫu T1008 cũng tương tự như các báo cáo đã công bố, có khả năng thuộc chi *Bacillus*.

Đánh giá một số đặc tính hóa sinh trong thí nghiệm này đã cho biết rằng, mẫu phân lập T1008 có khả năng sử dụng nguồn mannitol, glucose, thủy phân tinh bột. Kết quả này

Bảng 2. Đặc điểm hình thái của mẫu phân lập T1008.

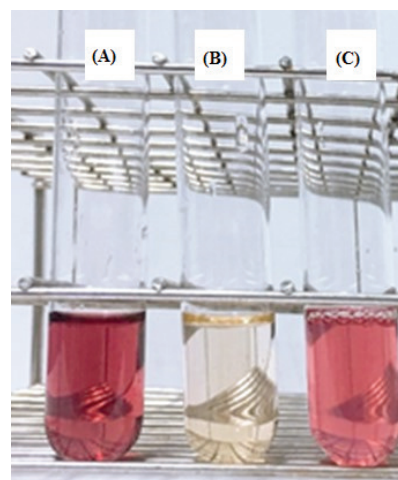
Chỉ tiêu theo dõi	Môi trường PVK	Môi trường LB
Hình thái khuẩn lạc	Mép khuẩn lạc có hình răng cưa, tròn, bề mặt lồi, bóng mịn, tạo vòng vô khuẩn trên môi trường PVK	Mép khuẩn lạc có hình răng cưa, tròn, bề mặt lồi, bóng mịn, không sinh tiết sắc tố
Hình thái tế bào	Hình que ngắn, đứng riêng rẽ hoặc có nối đôi hay nối từng chuỗi	Hình que ngắn, đứng riêng rẽ hoặc có nối đôi hay nối từng chuỗi
Nhuộm gram	Gram (+)	Gram (+)
Khả năng di động	Có	Có
Sinh tiết sắc tố trên môi trường	Không	Không
Đường kính vòng phân giải lân $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	2,8±0,13 cm	0,0

Ghi chú: đo kích thước sau 7 ngày nuôi cấy, nhiệt độ 30°C.

cũng giống với mô tả của Jin và cs (2012) [8], Lu và cs (2017) [9].

Xác định khả năng sinh IAA bằng thuốc thử Salkowski

Mẫu phân lập T1008 sau khi làm thuần được nuôi cấy trên môi trường LB lỏng, có bổ sung 0,1% tryptophan ở 28°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút trên máy ổn nhiệt trong thời gian 2 ngày. Sau nuôi lắc, loại bỏ cặn, thu dịch trên tủa để kiểm tra khả năng sinh tổng hợp IAA bằng thuốc thử Salkowski. Kết quả định tính cho thấy, dịch nuôi cấy mẫu T1008 chuyển sang màu hồng sau khi nhuộm với thuốc thử Salkowski. Điều này chứng tỏ có IAA thô đã được sinh ra trong dịch nuôi cấy mẫu T1008 (hình 1).



Hình 1. Đánh giá hoạt tính tổng hợp chất kích thích sinh trưởng thực vật bằng thuốc thử Salkowski. (A) đối chứng dương; (B) đối chứng âm; (C) mẫu thử T1008.

Định danh vi khuẩn bằng PCR và giải trình tự

Nhằm xác định đến loài phân lập T1008, phản ứng PCR

được dùng với cặp mồi 27F và 1525R [13] đã khuếch đại vạch băng với kích thước khoảng 1.500 bp tương ứng với kích thước cặp mồi sử dụng trong phản ứng PCR (hình không đưa ra). Tiếp theo, sản phẩm PCR từ các mẫu này được tinh sạch bằng kit tách chiết theo hướng dẫn của nhà sản xuất và được giải trình tự 2 chiều dùng cặp mồi giống như trong phản ứng PCR. Sau khi cắt bỏ các đoạn nhiễu, thu được trình tự nucleotide của mẫu T1008 là 1.446 bp được đăng ký lên Ngân hàng gen với mã truy cập MN272333.

Tiến hành tìm kiếm các chuỗi nucleotide gần gũi với trình tự của các mẫu phân tích T1008 bằng công cụ trực tuyến (BLAST search) trên Ngân hàng gen (bảng 3).

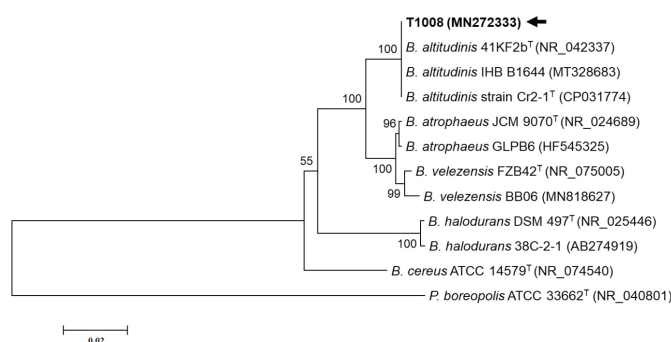
Bảng 3. Các trình tự gần trên Ngân hàng gen của mẫu phân tích T1008.

TT	Tên loài gần nhất*	Mẫu phân lập	Mã truy cập	Phần trăm đoạn so sánh	Mức đồng nhất trình tự (%)
1	<i>Bacillus altitudinis</i>	IHB B1614	MT328638	100	100
2	<i>Bacillus altitudinis</i>	SCU11	CP038517	100	100
3	<i>Bacillus altitudinis</i>	Cr2-1	CP031774	100	100

Ghi chú: *: chỉ trình bày 3 trình tự nucleotide.

Kết quả phân tích cho thấy, trình tự nucleotide tìm được đều là các chuỗi mã hóa gen 16S ARN ribosome của vi khuẩn, trong đó mẫu T1008 (100% đoạn so sánh có mức đồng nhất trình tự 100%) gần nhất với các mẫu phân lập thuộc loài *B. altitudinis* đã được công bố trên Ngân hàng gen. Trong đó, loài vi khuẩn *B. altitudinis* lần đầu được phân lập trên khí quyển [3].

Quan hệ của mẫu T1008 được so sánh với đại diện các mẫu vi khuẩn chuẩn của loài. Kết quả được trình bày ở hình 2.



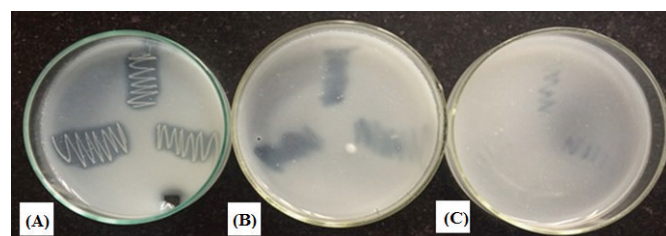
Hình 2. Cây phả hệ dựa trên vùng gen 16S ARN ribosome của các mẫu vi khuẩn *Bacillus* spp. Chủng vi khuẩn T1008 phân lập tại Việt Nam (in chữ đậm) và các mẫu vi khuẩn sẵn có trên Ngân hàng gen; T: mẫu chuẩn của loài. Thanh bar trình bày khoảng cách di truyền. Giá trị ở các nốt là giá trị thống kê bootstrap dưới dạng % (1.000 lần lặp).

Dựa trên kết quả phân tích phả hệ cho thấy, mẫu phân lập T1008 nằm cùng nhánh với các loài *B. altitudinis*, trong đó có mẫu chuẩn của loài là 41KF2b (mã truy cập NR_042337). Kết quả phân tích trình tự từ giải trình tự vùng gen 16S ARN

ribosome, phân tích phả hệ đã xác định được chính xác tên loài từ mẫu phân lập T1008 là loài *B. altitudinis*.

Khả năng chịu NaCl

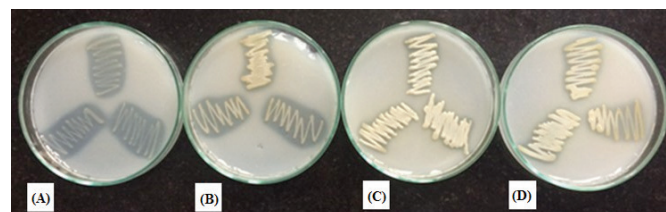
Để đánh giá khả năng chịu NaCl từ 1 đến 5% của chủng vi khuẩn *B. altitudinis* T1008 trên môi trường PVK trong đĩa petri, chúng tôi thí nghiệm mỗi lần 3 đĩa, với 3 lần nhắc lại. Kết quả cho thấy, chủng vi khuẩn *B. altitudinis* T1008 chịu được nồng độ NaCl 1-5%, tuy nhiên khuẩn lạc vi khuẩn phát triển tốt nhất ở nồng độ NaCl 1%, ngược lại phát triển chậm và thưa hơn cả ở nồng độ NaCl 5% (hình 3). Khả năng chịu NaCl của chủng vi khuẩn *B. altitudinis* T1008 trong nghiên cứu này thấp hơn so với kết quả của tác giả Jin và cs (2012) [8], chủng vi khuẩn *B. altitudinis* ZJ 186 chịu được NaCl 8-10%.



Hình 3. Khả năng chịu muối NaCl của chủng vi khuẩn *B. altitudinis* T1008 trên môi trường PVK. (A) NaCl 1%; (B) NaCl 3%; (C) NaCl 5%.

Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy

Nhiệt độ là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự phát triển của vi sinh vật. Đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến sinh trưởng phát triển của chủng vi khuẩn *B. altitudinis* T1008 có khả năng chịu NaCl 1%, có hoạt tính sinh học (phân giải lân, tổng hợp IAA) trên môi trường PVK được thực hiện tại 25, 30, 35 và 40°C. Kết quả thí nghiệm cho thấy, chủng vi khuẩn *B. altitudinis* T1008 sinh trưởng phát triển bình thường ở dải nhiệt độ 25-40°C. Tại ngưỡng nhiệt độ 25°C vòng phân giải lân $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ rõ nhất, ở 40°C, vòng phân giải lân vẫn rõ, thậm chí khuẩn lạc dày đặc hơn (hình 4). So sánh với kết quả của Kumar và cs (2011) [4], vi khuẩn *B. altitudinis* sinh trưởng, phát triển ở ngưỡng nhiệt độ 8-45°C.



Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến sinh trưởng phát triển của chủng vi khuẩn *B. altitudinis* T1008 trên môi trường PVK. (A) 25°C, (B) 30°C, (C) 35°C, (D) 40°C.

Kết luận

Chủng vi khuẩn T1008 được phân lập từ các mẫu đất bị nhiễm mặn tại tỉnh Bến Tre trên môi trường Pikovskaya, Luria-Bertani có bổ sung NaCl 1%, khuẩn lạc có dạng tròn không đều, màu trắng đến vàng nhạt, tế bào có hình que ngắn, di động, gram dương, tạo bào tử và có khả năng chịu được nồng độ NaCl 5%, có hoạt tính phân giải lân vô cơ và tổng hợp IAA trong điều kiện *in vitro*, có thể sinh trưởng phát triển tốt ở điều kiện nhiệt độ 25-40°C. Kết quả định danh cho thấy, chủng T1008 thuộc *Bacillus altitudinis*, đây là chủng vi khuẩn lần đầu tiên được công bố có tiềm năng tạo chế phẩm vi sinh ứng dụng trong trồng trọt trên vùng đất bị nhiễm mặn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M.S. Khan, et al. (2007), "Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture: a review", *Agronomy for Sustainable Development*, **27**(1), pp.29-43.
- [2] D.K. Maheshwari (2013), *Bacteria in agrobiolgy: disease management*, Springer Science and Business Media.
- [3] S. Shivaji, et al. (2006), "*Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**, pp.1-9.
- [4] E.V. Kumar, et al. (2011), "A novel serine alkaline protease from *Bacillus altitudinis* GVC11 and its application as a dehairing agent", *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **34**(4), pp.403-409.
- [5] Nguyễn Thị Đơn, Nguyễn Thị Kiều Diễm, Cao Ngọc Điệp (2012), "Phân lập và nhận diện vi khuẩn hòa tan lân và kali từ mẫu vật liệu phong hóa đá hoa cương núi Sập, tỉnh An Giang", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học An Giang*, **24a**, tr.179-186.
- [6] D.N. Adhyaru, et al. (2014), "Enhanced production of cellulase-free, thermo-alkali-solvent-stable xylanase from *Bacillus altitudinis* DHN8, its characterization and application in sorghum straw saccharification", *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **3**(2), pp.182-190.
- [7] P. Mehta, et al. (2015), "Functional diversity of phosphate solubilizing plant growth promoting rhizobacteria isolated from apple trees in the trans Himalayan region of Himachal Pradesh, India", *Biological Agriculture and Horticulture*, **31**(4), pp.265-288.
- [8] X.B. Jin, et al. (2012), "Isolation and identification of *Bacillus altitudinis* ZJ 186 from marine soil samples and its antifungal activity against *Magnaporthe oryzae*", *Current Research in Bacteriology*, **5**(1), pp.13-23.
- [9] X. Lu, et al. (2017), "Isolation and characterization of *Bacillus altitudinis* JSCX-1 as a new potential biocontrol agent against *Phytophthora sojae* in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]", *Plant and Soil*, **416**(1-2), pp.53-66.
- [10] Nguyễn Xuân Thành, Vũ Thị Hoàn, Nguyễn Thế Bình, Đinh Hồng Duyên (2007), *Thực tập vi sinh vật chuyên ngành*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [11] Bộ Khoa học và Công nghệ (2015), *Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 10784:2015: Vi sinh vật - Khả năng sinh tổng hợp axit 3-indol-axetic (IAA)*.
- [12] H. Wang, et al. (1993), "A simple method of preparing plant samples for PCR", *Nucleic Acids Research*, **21**(17), pp.41-53.
- [13] W.G. Weisburg, et al. (1991), "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study", *Journal of Bacteriology*, **173**(2), pp.697-703.
- [14] H.W. McWilliam, et al. (2013), "Analysis tool web services from the EMBL-EBI", *Nucleic Acids Research*, **41**, pp.597-600.
- [15] K. Tamura, et al. (2013), "MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0", *Molecular Biology and Evolution*, **30**(12), pp.2725-2729.