

PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN NỘI SINH TỪ RỄ CÂY NHA ĐAM (*ALOE VERA*)

Nguyễn Văn Giang*, Trần Thị Đào, Trịnh Thị Thúy An

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

Email*: nvgiang@vnua.edu.vn

Ngày gửi bài: 12.11.2015

Ngày chấp nhận: 29.05.2016

TÓM TẮT

Thực vật có mối quan hệ rất chặt chẽ với vi sinh vật đặc biệt là các vi khuẩn nội sinh. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, vi khuẩn nội sinh có tác động thúc đẩy tăng trưởng thực vật và kiểm soát sinh học đối với các tác nhân gây bệnh trên thực vật. Vi khuẩn nội sinh đã được phân lập từ nhiều loài thực vật trong đó bao gồm cả các cây trồng nông nghiệp và cây cỏ dại. Tuy nhiên, nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh trong cây nha đam (*Aloe vera*) còn hạn chế. Trong nghiên cứu này, 14 chủng vi khuẩn nội sinh từ rễ cây nha đam được thu thập ở ba vùng khác nhau đã được phân lập trên môi trường NA. 2 chủng trong số 14 chủng vi khuẩn nội sinh phân lập được có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Erwinia carotovora* gây bệnh thối nhũn là TB2 và TQ5, riêng chủng TQ5 có khả năng kháng vi khuẩn *Burkholderia glumae*. Chủng PT11 và TQ3 vừa có khả năng phân giải phosphate khó tan vừa có khả năng sinh IAA với hàm lượng cao. Điều kiện nhiệt độ và pH thích hợp nhất cho sự sản sinh IAA của hai chủng vi khuẩn nội sinh này là 35°C và pH 6.

Từ khóa: IAA, vi khuẩn đối kháng, vi khuẩn nội sinh.

Isolation and Characteristics of Some Bacterial Endophytes from Root of Aloe Vera

ABSTRACT

Plants interact closely with microorganisms, especially endophytic bacteria. Many researches showed that endophytic bacteria have positive effect on plant growth and render plants resistance against phytopathogens. Bacterial endophytes have been isolated from different plants, including agricultural crops and wild plants. In this study, 14 bacterial isolates from roots of *Aloe vera* collected from three different areas in Vietnam were isolated on NA medium. Among them, two isolates, designated as TB2 and TQ5 showed high activity against pathogenic soft rot, *Erwinia carotovora*. Especially, TQ5 isolate showed resistance against both *Burkholderia glumae* and *Erwinia carotovora*, which are two serious plant pathogenic bacteria. The other two isolates, PT11 and TQ3 exhibited phosphate solubilizing capability and IAA producing activity. The optimum temperature and pH for IAA production of these isolates were 35°C and 6.0, respectively.

Keywords: Antagonism, endophytic bacteria, IAA.

1. MỞ ĐẦU

Vi sinh vật nội sinh là những vi sinh vật liên kết với thực vật, sống trong các mô sống của cây chủ mà không gây ra bất kỳ tác hại nào cho cây chủ (Ahmed *et al.*, 2012; Hallmann *et al.*, 1997). Các vi sinh vật nội sinh phổ biến bao gồm các loài nấm, vi khuẩn và xạ khuẩn, chúng có

thể được phân lập từ các cây trồng nông nghiệp hay cây cỏ hoang dại, từ cả cây một lá mầm và cây hai lá mầm. Một số vi khuẩn nội sinh có khả năng thúc đẩy tăng trưởng thực vật và kiểm soát sinh học với các tác nhân gây bệnh. Khả năng thúc đẩy tăng trưởng thực vật có thể thông qua việc cung cấp các chất dinh dưỡng cho cây, điều hòa các phytohormone, hay làm tăng tính

khả dụng của các nguyên tố khoáng. Các nghiên cứu đã chứng minh nhiều vi khuẩn nội sinh có khả năng cố định N_2 , tổng hợp indole-3-acetic acid, sản sinh siderophore, ACC deaminase và phân giải phosphate khó tan. Bên cạnh đó, vi khuẩn nội sinh có khả năng kiểm soát sinh học với các loại nấm, vi khuẩn và tuyến trùng gây bệnh trên thực vật. Do đó, khi cư trú trong mô thực vật, vi sinh vật nội sinh đem lại cho cây trồng nhiều điều kiện thuận lợi giúp cây trồng phát triển tốt (Dhanya and Padmavathy, 2014). Từ những lợi ích và tiềm năng to lớn của các vi sinh vật nội sinh, việc tìm kiếm và đánh giá đặc điểm của các vi sinh vật nội sinh là một hướng đi đúng đắn trong công cuộc phát triển một nền nông nghiệp sạch và bền vững

Nha đam (*Aloe vera*) được biết đến là cây dược liệu quý, có chứa rất nhiều hợp chất sinh học có tiềm năng và đã được sử dụng phổ biến trong ngành công nghiệp dược, công nghiệp thực phẩm và mỹ phẩm. Lớp gel bên trong lá cây nha đam chứa nhiều hợp chất phenol như aloin-A, aloesin, isoaloesin D, aloesin E được ứng dụng trong điều trị bệnh ung bướu, bệnh tiểu đường, viêm loét và bệnh ung thư (Mamta Gupta *et al.*, 2012). Ở nước ta, cây nha đam chủ yếu được trồng trên những vùng đất cát và đất pha cát ven biển kém màu mỡ, canh tác các cây trồng khác kém hiệu quả. Nhiều nhóm vi sinh vật có vai trò đa dạng trong sinh lý học thực vật có thể được phát hiện từ cây nha đam. Tuy nhiên, đặc tính thúc đẩy tăng trưởng thực vật của vi khuẩn nội sinh từ cây nha đam vẫn chưa được nghiên cứu đầy đủ.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Rễ cây nha đam khỏe mạnh được thu thập từ các vùng: Phú Thọ, Thái Bình, Tuyên Quang. Mẫu vi khuẩn gây bệnh cây được cung cấp từ bộ sưu tập giống của Bộ môn Vi sinh, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam: *Erwinia carotovora* ATCC 15713 tác nhân gây bệnh thối nhũn, *Burkholderia glumae* gây bệnh đen lép hạt lúa.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập vi khuẩn nội sinh (Justin and Christopher, 2003)

Mẫu rễ cây sau khi được thu thập được rửa dưới vòi nước chảy để loại bỏ đất và sau đó được cắt thành các lát nhỏ. Lát cắt rễ sau đó được ngâm trong ethanol 99% trong 1 phút, rửa lại mẫu bằng nước cất vô trùng 1 lần sau đó tiến hành khử trùng với natri hypoclorit 3,125% trong 6 phút, rửa mẫu bằng nước cất vô trùng 1 lần, ngâm mẫu trong ethanol 99% trong vòng 30 giây, rửa mẫu bằng nước cất vô trùng 1 lần. Mẫu sau khi khử trùng được kiểm tra sự vô trùng bề mặt bằng cách lấy 0,1ml nước rửa mẫu lần cuối cùng cấy trang trên đĩa petri chứa môi trường NA (peptone 0,5%, cao thịt bò 0,2%, cao nấm men (yeast extract) 0,3%, NaCl 0,5%, agar 1,8%, pH = 7), ủ mẫu ở 30°C và quan sát sự phát triển của vi khuẩn sau 2 ngày. Nếu không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm trong thử nghiệm này chứng tỏ việc khử trùng đã loại bỏ hoàn toàn các vi sinh vật trên bề mặt rễ. Mẫu rễ nha đam sau khi khử trùng xong được thấm khô và cấy trên môi trường NA ở 30°C trong 2 ngày để phân lập vi khuẩn nội sinh.

2.2.2. Đánh giá một số đặc điểm sinh học của các chủng phân lập được

Đặc điểm sinh hóa: Khả năng di động (Elbeltagy *et al.*, 2000): Mỗi chủng vi khuẩn được cấy vào giếng ở trung tâm của đĩa môi trường NA (nutrient agar) bán rắn (0,2% agar) ở 30°C, quan sát sự khuếch tán của vi khuẩn sau 24 giờ. Hoạt tính cellulase được xác định theo phương pháp của Singh *et al.*, (2013) trên môi trường có bổ sung cơ chất CMC 1%, dung dịch đệm citrate, ủ ở 37°C, sử dụng dung dịch lugol 1X làm thuốc nhuộm; Hoạt tính pectinase được xác định theo phương pháp của Cotty *et al.* (1990) trên môi trường chứa 1g pectin, 2g agar pha trong 100ml đệm phosphate pH = 7, ủ ở 37°C, sử dụng dung dịch lugol 1X làm thuốc nhuộm. Khả năng phân giải phosphate khó tan (Singh *et al.*, 2013): Chủng vi khuẩn được cấy chấm điểm trên đĩa môi trường Pikovaskya (1% Glucose; 0,5% $Ca_3(PO_4)_2$; 0,05% $(NH_4)_2SO_4$; 0,02% NaCl; 0,01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,02% KCl; 0,05% yeast extract; 0,0002% $MnSO_4 \cdot H_2O$;

0,0002% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2% agar, pH = 7) ở 30°C trong 3 ngày. Chủng vi khuẩn có khả năng phân giải phosphate khó tan sẽ tạo vòng sáng xung quanh khuẩn lạc.

2.2.3. Khảo sát khả năng sinh IAA của các chủng vi khuẩn phân lập (Glickmann and Dessaux, 1995)

Hàm lượng IAA sinh ra được xác định bằng phương pháp so màu sử dụng thuốc thử Salkowski (300ml H_2SO_4 98%, 15ml FeCl_3 0,5M). Các chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường NA có bổ sung 0,1% tryptophan, 30°C, lắc 200 vòng/phút. Sau 48h, dịch vi khuẩn được ly tâm 5.500 vòng/ phút trong 5 phút, thu dịch trong.

1ml dịch trong được bổ sung thêm 2ml thuốc thử Salkowski, lắc đều, để trong bóng tối trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Dung dịch được so màu ở bước sóng 530nm. Hàm lượng IAA trong dung dịch được xác định thông qua đường chuẩn sử dụng chất chuẩn là IAA (Merck), với dải nồng độ lần lượt là 0, 5, 10, 20, 30, 40 và 50 $\mu\text{g/ml}$.

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến khả năng sinh IAA của các chủng phân lập

Các chủng vi khuẩn chọn lọc được nuôi cấy trên môi trường NA lỏng có bổ sung L-Tryptophan (100 mg/l) trong hai ngày ở các mức nhiệt độ (25, 30, 35°C) và dải pH (4-8). Sau đó tiến hành xác định hàm lượng IAA sinh ra.

Khảo sát khả năng đối kháng của các chủng vi khuẩn phân lập với một số vi khuẩn gây bệnh cây theo phương pháp thổi thạch (Nguyễn Lâm Dũng và Phạm Thị Trân Châu, 1978)

Vi khuẩn nội sinh được cấy đều trên đĩa petri chứa môi trường NA. Sau 2 ngày nuôi cấy, thổi thạch vi khuẩn được cấy vào đĩa petri chứa môi trường LB đã được cấy trải vi khuẩn gây bệnh cây ủ ở nhiệt độ 4 - 8°C trong khoảng 4 - 8 giờ để chất kháng khuẩn khuếch tán vào môi trường, sau đó nuôi cấy ở 37°C và quan sát kết quả sau 16h.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Một số đặc điểm của các chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập

Từ các mẫu rễ cây nha đam thu được ở ba vùng Phú Thọ, Tuyên Quang, Thái Bình, chúng tôi đã phân lập được 14 mẫu vi khuẩn nội sinh được gọi là chủng phân lập (Bảng 1).

Các chủng này được ký hiệu theo địa điểm lấy mẫu và được đánh số thứ tự. Các chủng vi khuẩn nội sinh phân lập được có hình thái, kích thước khuẩn lạc và màu sắc đa dạng. Các khuẩn lạc đều có bề mặt trơn, tròn đều hoặc lượn sóng; màu trắng, trắng đục, màu vàng nhạt, vàng cam hoặc màu nâu. Trong số 14 chủng phân lập được có 12 chủng là trực khuẩn, 2 chủng là cầu khuẩn; có 3 vi khuẩn Gram âm và 11 vi khuẩn Gram dương. Các chủng phân lập được có khuẩn lạc tròn đều, màu trắng và vàng chiếm đa số. Tế bào của đa số các chủng này có hình que, ngắn. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu khác về đặc điểm hình thái của một số vi khuẩn nội sinh. Nguyễn Hữu Hiệp và cs. (2008) đã báo cáo khuẩn lạc của các vi khuẩn nội sinh được phân lập từ cây mía có dạng tròn, mép khuẩn lạc nguyên, đa số có màu vàng cam, một số dòng có màu vàng nhạt và đa số có dạng que ngắn. Kết quả nghiên cứu của Lương Thị Hồng Hiệp và Cao Ngọc Diệp (2011) cũng báo cáo về đặc điểm hình thái của vi khuẩn nội sinh và có sự tương đồng với hình thái của các vi khuẩn phân lập được trong nghiên cứu này. Singh et al. (2013) đã báo cáo về đặc điểm hình thái của vi khuẩn nội sinh như khuẩn lạc có dạng tròn, rìa tròn đều hoặc lượn sóng, hình thái tế bào chiếm phần lớn là trực khuẩn ngắn.

Khả năng di động cũng như việc thể hiện hoạt tính cellulase, hoạt tính pectinase là những đặc điểm sinh hóa quan trọng giúp vi khuẩn nội sinh có thể xâm nhập và di chuyển bên trong mô thực vật. Trong số 14 chủng vi khuẩn nội sinh phân lập được có 8 chủng có khả năng di động: PT11, PT17, TB2, TB17, TQ3, TQ4, TQ6 và TQ8; 5 chủng có hoạt tính cellulose: PT2, PT5, TB2, TQ3 và TQ5, chỉ có 2 chủng có hoạt tính pectinase: TQ3 và TQ4 (Bảng 2).

Bảng 1. Hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào của các chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập

Chủng	Hình thái khuẩn lạc				Hình thái tế bào	Nhuộm Gram
	Bề mặt	Đặc tính quang học	Mép khuẩn lạc	Màu sắc		
PT2	Trơn nhầy	Đục	Tròn đều	Vàng nhạt	Trực khuẩn ngắn	+
PT5	Trơn bóng	Đục	Lượn sóng	Nâu	Trực khuẩn ngắn	+
PT11	Trơn bóng	Trong	Tròn đều	Trắng	Trực khuẩn ngắn	-
PT17	Trơn bóng	Đục	Tròn đều	Vàng nhạt	Cầu khuẩn	+
TB2	Trơn bóng	Đục	Lượn sóng	Vàng nhạt	Trực khuẩn ngắn	+
TB7	Trơn bóng	Đục	Lượn sóng	Nâu	Trực khuẩn ngắn	+
TB8	Trơn bóng	Đục	Tròn đều	Trắng đục	Trực khuẩn ngắn	+
TB17	Trơn bóng	Đục	Tròn đều	Trắng	Trực khuẩn ngắn	+
TB18	Trơn bóng	Đục	Tròn đều	Nâu	Trực khuẩn ngắn	+
TQ3	Trơn nhầy	Trong	Tròn đều	Vàng cam	Trực khuẩn ngắn	+
TQ4	Trơn bóng	Trong	Tròn đều	Trắng đục	Trực khuẩn ngắn	+
TQ5	Trơn nhầy	Đục	Tròn đều	Vàng nhạt	Cầu khuẩn	-
TQ6	Trơn nhầy	Trong	Tròn đều	Trắng đục	Trực khuẩn ngắn	-
TQ8	Trơn nhầy	Đục	Lượn sóng	Trắng đục	Trực khuẩn ngắn	+

Chú thích: (+) bắt màu thuốc nhuộm Gram; (-) không bắt màu thuốc nhuộm Gram

Bảng 2. Một số đặc điểm đặc trưng của các chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập

Chủng	Đặc điểm hóa sinh				
	Cellulase	Pectinase	Khả năng di động	Khả năng phân giải phosphate khó tan	Khả năng sinh IAA
PT2	+	-	-	+	-
PT5	+	-	-	-	-
PT11	-	-	+	+	+
PT17	-	-	+	-	+
TB2	+	-	+	-	-
TB7	-	-	-	+	-
TB8	-	-	-	-	-
TB17	-	-	+	+	-
TB18	-	-	-	+	-
TQ3	+	+	+	+	+
TQ4	-	+	+	-	+
TQ5	+	-	-	+	-
TQ6	-	-	+	+	+
TQ8	-	-	+	-	-

Ghi chú: (+) có hoạt tính; (-) không có hoạt tính

Đối với các vi khuẩn thúc đẩy tăng trưởng thực vật, khả năng phân giải phosphate khó tan được xem là một trong những đặc tính quan trọng liên quan đến nguồn dinh dưỡng của cây

trồng. Trong số 14 chủng vi khuẩn nội sinh phân lập được có 8 chủng vi khuẩn thể hiện khả năng phân giải phosphate khó tan (Bảng 2): PT2, PT11, TB7, TB17, TB18, TQ3, TQ5 và

TQ6. Cao Ngọc Diệp và Phan Thị Nhã (2011) đã phân lập được 45 chủng vi khuẩn nội sinh từ cây dứa có khả năng hòa tan lân khó tan.

IAA là một hormone sinh trưởng ở thực vật thuộc nhóm auxin, góp phần quan trọng vào kích thích sinh trưởng của cây trồng bằng cách tăng sự phát triển của rễ, số lượng rễ (Dhanya and Padmavathy, 2014). Trong số 14 chủng vi khuẩn nội sinh phân lập được có 5 chủng có khả năng sản sinh IAA. Bằng phương pháp so màu Salkovski, xác định được hai chủng PT11 và TQ3 có khả năng sinh IAA mạnh nhất với hàm lượng IAA sản sinh ra môi trường sau 6 ngày nuôi cấy. Chúng tôi tiến hành khảo sát tác động của nhiệt độ và pH môi trường nuôi cấy tới khả năng tổng hợp IAA của hai chủng này

Nhiệt độ và pH là các tác nhân vật lý không những ảnh hưởng đến sinh trưởng của vi khuẩn mà còn ảnh hưởng sâu sắc tới khả năng sinh ra các chất có hoạt tính sinh học của chúng. Do đó, việc xác định ảnh hưởng của nhiệt độ và pH môi trường đến khả năng sinh IAA của các chủng vi khuẩn phân lập được là cần thiết.

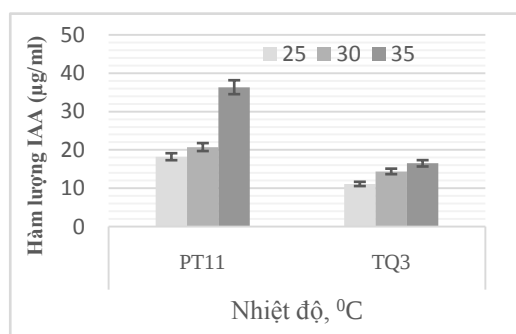
Sau 4 - 5 ngày nuôi cấy ở các mức nhiệt độ nghiên cứu (25, 30 và 35°C) trong tối, hàm lượng IAA trong dịch nuôi được xác định. Khả năng sinh IAA của chủng PT11 và TQ3 đều đạt cao nhất khi nuôi ở 35°C, đạt lần lượt là 36,32 µg/ml và 16,49 µg/ml; khi nuôi ở 25°C hai chủng này sinh IAA thấp nhất (Hình 2a). Điều này có thể được giải thích do các chủng vi khuẩn này được phân lập từ cây nha đam, một loài cây

chịu được nhiệt độ cao và thường được trồng ở những khu vực có điều kiện khí hậu nắng nóng. So với lượng IAA được tổng hợp bởi các chủng vi khuẩn nội sinh từ cây đậu (Pham Quang Hung and Annapurna, 2004) thì các chủng chủng tôi phân lập được có thể tổng hợp được IAA với hàm lượng tương đương và cao hơn một chút, tuy nhiên vẫn thấp hơn kết quả thu được bởi Tsavkelova *et al.* (2007).

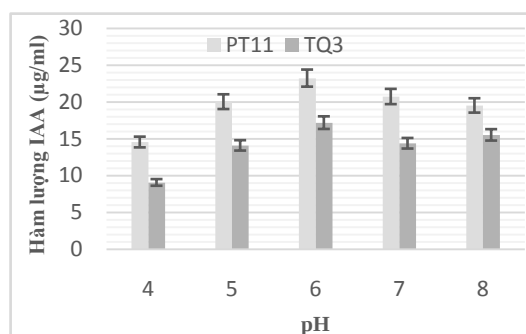
Chủng PT11 và TQ3 đều có khả năng sinh IAA cao khi nuôi trong môi trường có dải pH rộng từ 5,0 đến 8,0; trong đó hàm lượng IAA đạt cao nhất khi nuôi hai chủng này ở môi trường có pH 6,0, đạt là 23,23 µg/ml (PT11) và chủng TQ3 là 17,18 µg/ml (Hình 2b).

3.2. Khả năng đối kháng của các chủng vi khuẩn nội sinh với các chủng vi khuẩn gây bệnh cây

Vi khuẩn nội sinh được biết đến như là nhân tố kiểm soát sinh học với các tác nhân gây bệnh hại thực vật (Berg and Hallmann, 2006; Scherwinski *et al.*, 2008; Malfanova *et al.*, 2011). Chúng tôi đánh giá khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh thối nhũn và gây lem lép hạt của 14 chủng vi khuẩn nội sinh mới phân lập. Kết quả 2 chủng trong số 14 chủng vi khuẩn nội sinh phân lập được có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Erwinia carotovora* ATCC 15713 gây bệnh thối nhũn là TB2 và TQ5, riêng chủng TQ5 có khả năng kháng vi khuẩn *Burkholderia glumae* (Bảng 3).



(a)



(b)

Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ (a) và pH (b) đến khả năng sinh IAA của chủng PT11 và TQ3

Bảng 3. Khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh cây của các chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập

VKNS	<i>Erwinia carotovora</i> TCC 15713	<i>Burkholderia glumae</i>
PT2	-	-
PT5	-	-
PT11	-	-
PT17	-	-
TB2	+	-
TB7	-	-
TB8	-	-
TB17	-	-
TB18	-	-
TQ3	-	-
TQ4	-	-
TQ5	+	+
TQ6	-	-
TQ8	-	-

Ghi chú: VKNS-vi khuẩn nội sinh; (+) có khả năng đối kháng; (-) không có khả năng đối kháng

Vi khuẩn *Erwinia carotovora* gây bệnh trên nhiều đối tượng cây trồng như khoai tây, cà rốt, dưa chuột và cà chua làm ảnh hưởng đáng kể đến năng suất và chất lượng nông sản. Trong khi đó, vi khuẩn *Burkholderia glumae* gây lép hạt và làm thối thân, gốc lúa làm ảnh hưởng rất lớn đến sản lượng lúa. Các biện pháp phòng trừ chủ yếu vẫn là sử dụng các loại thuốc hóa học kết hợp với các biện pháp canh tác hợp lý. Do đó, việc tìm ra được 2 chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng kiểm soát sinh học với vi khuẩn *Burkholderia glumae* và *Erwinia carotovora* có ý nghĩa thực tế lớn, có tiềm năng để ứng dụng làm chế phẩm sinh học góp phần xây dựng một nền nông nghiệp sạch và bền vững.

4. KẾT LUẬN

Từ các mẫu rễ cây nha đam khác nhau, chúng tôi đã phân lập được 14 chủng vi khuẩn nội sinh; trong đó chủng PT11 và TQ3 biểu hiện khả năng phân giải phosphate khó tan và khả năng sinh IAA với hàm lượng cao. Điều kiện nhiệt độ và pH thích hợp nhất cho sự sản sinh

IAA của hai chủng vi khuẩn nội sinh này là 35°C và pH = 6.

Trong điều kiện phòng thí nghiệm, trong số 14 chủng vi khuẩn nội sinh phân lập được, chủng TB2 và TQ5 kháng *Erwinia carotovora* ATCC 15713, riêng chủng TQ5 có khả năng đối kháng vi khuẩn gây *Burkholderia glumae*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmed, M., M. Hussain, M. K. Dhar, S. Kaul. (2012). Isolation of microbial endophytes from some ethnomedicinal plants of Jammu and Kashmir. J Nat Prod Plant Resour., 2(2): 215-220.
- Berg G., J. Hallmann (2006). Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. In: Microbial root endophytes. Schulz B, Boyle C, Sieber TN (Eds.) Springer, Berlin, pp. 53-67.
- Cotty P. I., T. E. Cleveland, R. L. Brown and Mellon J. E (1990). Variation in polygalacturonase production among *Aspergillus flavus* isolates. Appl. Environ. Microbio., 56: 3885-3887.
- Cao Ngọc Diệp và Phan Thị Nhã (2011). Phân lập và xác định đặc tính vi khuẩn nội sinh trong cây khóm (*Ananas comosus* L.) trồng trên đất phèn thị xã Vị

- Thanh, tỉnh Hậu Giang. Tạp chí Công nghệ Sinh học, 9(2): 243-250.
- Dhanya N. Nair and S. Padmavathy (2014). Impact of Endophytic Microorganisms on Plants, Environment and Humans. The Scientific World Journal, Volume 2014, Article ID 250693, 11 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/250693>
- Elbeltagy A, K Nishioka, H Suzuki, T Sato, YI Sato, H Morisaki, H Mitsui and K Minamisawa (2000). Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. Soil Sci. Plant Nut., 46: 617-629.
- Glickmann, E. and Y. Dessaux (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Appl Environ Microbio., 61(2): 793-796
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF and Kloepper JW (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology, 43(10): 895-914.
- Justin T Coombs and Christopher MM Franco (2003). Isolation and Identification of Actinobacteria from Surface-Sterilized Wheat Roots. Applied and environmental microbiology, pp. 5603-5608.
- Lương Thị Hồng Hiệp và Cao Ngọc Điệp (2011). Phân lập và nhận diện vi khuẩn nội sinh trong cây cúc xuyên chi (*Wedelia trilobata* L. Hitchc.) bằng kỹ thuật PCR. Tạp chí Khoa học, 18a: 168-176.
- Malfanova N, Kamilova F, Validov S, Shcherbakov A, Chebotar V, Tikhonovich I, Lugtenberg B (2011). Characterization of *Bacillus subtilis* HC8, a novel plant-beneficial endophytic strain from giant hogweed. Microb. Biotech, 4: 523-532.
- Mamta Gupta, Shashi Kiran, Arvind Gulati, Bikram Singh, Rupinder Tewari (2012). Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. Microbiological Research, 167: 358-363.
- Nguyễn Lân Dũng, Phạm Thị Trân Châu (1978). Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học - Tập III. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Nguyễn Hữu Hiệp, Renato Fani, Lê Ngọc Thúy, Ngô Bảo Ngọc, Trần Thị Ngọc Tổ và Phạm Thị Khánh Vân (2008). Phân lập các dòng vi khuẩn nội sinh để sản xuất phân vi sinh ở quy mô phòng thí nghiệm cho cây mía trồng tại tỉnh Sóc Trăng. Tạp chí Nghiên cứu Khoa học, 8: 149-157
- Pham Quang Hung and K. Annapurna (2004). Isolation and characterization of endophytic bacteria in soybean (*Glycine* sp.) Omonrice, 12: 92-101
- Scherwinski K, Grosch R, Berg G, (2008). Effect of bacterial antagonists on lettuce: active biocontrol of *Rhizoctonia solani* and negligible, short-term effects on non-target microorganisms. FEMS Microbiol. Eco., 64: 106-16.
- Singh D, Sharma A & Saini GK (2013). Biochemical and molecular characterisation of the bacterial endophytes from native sugarcane varieties of Himalayan region. 3 Biotech., 3(3): 205-212.
- Tsavkelova E. A, Cherdyntseva T. A, Botina S. G, Netrusov A. I. (2007). Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. Microbiol Res., 162: 69-76.