

Phân lập, định danh chủng vi khuẩn chịu mặn, có hoạt tính phân giải lân vô cơ cho vùng Đồng bằng sông Cửu Long

Nguyễn Đức Thành^{1*}, Nguyễn Thế Quyết¹, Hà Viết Cường², Phạm Xuân Hội¹

¹Viện Di truyền Nông nghiệp

²Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 16/9/2019; ngày chuyển phản biện 19/9/2019; ngày nhận phản biện 28/11/2019; ngày chấp nhận đăng 9/12/2019

Tóm tắt:

Vi khuẩn phân giải lân có vai trò quan trọng trong sản xuất nông nghiệp. Mục đích của nghiên cứu này nhằm phân lập, tuyển chọn và định danh vi khuẩn có hoạt tính phân giải lân vô cơ trên môi trường PVK có bổ sung muối NaCl $\geq 1\%$ từ các mẫu đất trồng cây bưởi bị nhiễm mặn ở tỉnh Bến Tre. Kết quả đã xác định được mẫu T2917 và T3602 có hoạt tính phân giải lân vô cơ cao nhất trên môi trường PVK. Khuẩn lạc mẫu T2917 có hình tròn, lồi, sinh tiết sắc tố màu vàng nhạt, tế bào dạng hình que ngắn, có khả năng di động, nhuộm gram âm, chịu NaCl 5%. Mẫu phân lập T3602 không sinh tiết sắc tố, màu trắng đục, tế bào có dạng hình cầu, hình ovan, có khả năng di động, nhuộm gram âm và có khả năng chịu NaCl 3%. Phản ứng PCR đã nhận được đoạn gen 16S ARN ribosome của vi khuẩn có kích thước khoảng 1.500 bp. Phân tích hệ gen 16S ARN ribosome đã định danh được mẫu T2917 gần nhất với loài *Pseudomonas oryzae*, chi *Pseudomonas* và mẫu T3602 gần nhất với loài *Burkholderia* sp., chi *Burkholderia*.

Từ khóa: bưởi Da xanh, chịu mặn, vi khuẩn phân giải lân.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Khô hạn, xâm nhập mặn tại nhiều tỉnh ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long, trong đó có tỉnh Bến Tre đã gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sinh trưởng, phát triển và năng suất của nhiều loại cây ăn quả như bưởi, sầu riêng. Bên cạnh đó, việc lạm dụng quá nhiều phân bón vô cơ diễn ra liên tục trong nhiều năm đã góp phần làm cho đất bị nhiễm mặn. Đất bị nhiễm mặn có hàm lượng muối tan cao, dẫn đến áp suất thẩm thấu của dung dịch đất tăng cao, natri trao đổi ở mức độ cao, dẫn đến tính chất vật lý của đất rất xấu, hàm lượng dễ tiêu của một số chất dinh dưỡng cần thiết rất thấp. Vi sinh vật phân giải lân là các vi sinh vật có khả năng chuyển hóa lân khó tan thành dạng dễ tiêu cho cây trồng sử dụng [1, 2]. Ngoài ra, vi sinh vật phân giải lân cũng đóng vai trò kích thích sinh trưởng thực vật như tổng hợp indole acetic acid (IAA), gibberellic axit (GA), cytokinin, ethylene, hydro cyanide (HCN), cố định nitơ và đối kháng nấm gây bệnh cây có nguồn gốc từ đất [3]. Trong tự nhiên, lượng lân khó tan thông thường chiếm 95-99% lân tổng số [4]. Các axit hữu cơ được vi sinh vật tiết ra trên môi trường là tác nhân chủ yếu phân giải lân khó tan, khoáng hóa các hợp chất lân hữu cơ tạo nguồn lân dễ tiêu cung cấp cho đất

và cây trồng, giúp cho quá trình photphorin hóa, tổng hợp protein, lipid, phytohormon diễn ra liên tục trong cây, giúp cây có thể trao đổi nước, chất khoáng trong điều kiện đất bị nhiễm mặn [5, 6].

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập, xác định được các chủng vi khuẩn chịu NaCl, có hoạt tính sinh học phân giải lân vô cơ nhằm sản xuất được chế phẩm vi sinh vật, giúp phục hồi cây bưởi Da xanh sinh trưởng phát triển trong điều kiện đất đã bị nhiễm mặn tại tỉnh Bến Tre nói riêng, Đồng bằng sông Cửu Long nói chung.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Các mẫu đất trồng cây bưởi Da xanh bị nhiễm mặn ở tỉnh Bến Tre.

Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Mẫu đất được thu thập vào tháng 10/2017. Các thí nghiệm phân lập, định danh, đánh giá hoạt tính sinh học của chủng vi khuẩn phân lập được thực hiện trong năm 2018 tại Bộ môn Công nghệ vi sinh, Viện Di truyền Nông nghiệp.

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

Isolation and characterisation of salt tolerant and inorganic phosphate solubilising bacteria from the Mekong River Delta

Duc Thanh Nguyen^{1*}, The Quyet Nguyen¹,
Viet Cuong Ha², Xuan Hoi Pham¹

¹Agricultural Genetics Institute

²Department of Agronomy, Vietnam National University of Agriculture

Received 16 September 2019; accepted 9 December 2019

Abstract:

Phosphorus solubilising bacteria play an important role in agricultural production. The purpose of this study was conducted to isolate, select, and identify bacteria with inorganic phosphorus solubilising activity on Pikovskaya (PVK) medium containing sodium chloride $\geq 1\%$ from pomelo cultivated soil samples under salt stress condition in Ben Tre province. The results showed that the T2917 and T3602 isolates exhibited the highest inorganic phosphorus solubilising activity on the PVK medium. The colony of T2917 isolate was round, pale yellow pigmented on the PVK medium, and the cell of this isolate was short rod-shaped, motile, gram-negative staining, and resistant to NaCl 5% level. Meanwhile, the colony of T3602 isolate did not produce pigments, milky colour on the PVK medium, and its cells was spherical, oval, motile, gram-negative staining, and resistant to NaCl 3% level. The PCR reaction amplified the 16S ribosomal RNA gene of the bacteria with approximately 1,500 base pairs. Phylogenetic analysis of the 16S ribosomal RNA gene indicated that T2917 isolate belongs to *Pseudomonas* genus and the closest related species is *Pseudomonas oryzae*; and T3602 isolate was closely related to *Burkholderia* sp., *Burkholderia* genus.

Keywords: Daxanh pomelo, phosphate solubilising bacteria, salt tolerance.

Classification number: 4.1

Phương pháp nghiên cứu

Môi trường nuôi cấy: môi trường PVK (Pikovskaya medium) dùng để phân lập, xác định đặc điểm hình thái 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, agar 20,0 g và nước cất 1.000 ml.

Phương pháp thu thập mẫu: thu thập mẫu đất trồng cây bưởi Da xanh tại 2 huyện Chợ Lách và Châu Thành của tỉnh Bến Tre, mỗi huyện lấy 6 mẫu 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 lắc (100 vòng/phút trong thời gian 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 chà đều, sau đó đặt đĩa nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ 30°C trong 4-7 ngày. Trên mỗi mẫu phân lập, 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, sau đó chủng vi khuẩn được cấy chuyển sang các đĩa petri chứa môi trường PVK khác 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 vi khuẩn được tiến hành phân tích theo các phương pháp của Nguyễn Xuân Thành và cs (2007) [7].

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 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) [8]. 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') [9] 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 mồi dùng trong phản ứng PCR.

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 (National Center for Biotechnology Information, Hoa Kỳ) (bảng 1 và 2). Phương pháp phân tích trình tự và phả hệ được thực hiện với các phần mềm ClustalW2 [10] và MEGA 6.0 [11].

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

Loài vi khuẩn	Mã truy cập Ngân hàng gen	Nguồn gốc phân lập	Quốc gia
<i>P. oryzae</i>	MG571765	Đất	Ấn Độ
<i>P. oryzae</i> *	NR_117269	Không rõ	Bi
<i>P. lutea</i> *	NR_029103	Rễ cây	Tây Ban Nha
<i>P. lutea</i>	KJ997740	Đất	Ấn Độ
<i>P. rhizosphaerae</i> *	NR_029063	Đất	Tây Ban Nha
<i>P. graminis</i> *	NR_026395	Rễ cây	Pháp
<i>P. putida</i> *	NR_043424	Không rõ	Nhật Bản
<i>P. entomophila</i> *	NR_102854	Đất	Pháp
<i>P. entomophila</i> *	NR_115336	Không rõ	Pháp
<i>P. fragi</i> *	NR_024946	Không rõ	Nhật Bản

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

Bảng 2. Các loài vi khuẩn *Burkholderia* spp. dùng trong phân tích phả hệ vùng gen 16S ARN ribosome.

Loài vi khuẩn	Mã truy cập Ngân hàng gen	Nguồn gốc phân lập	Quốc gia
<i>Burkholderia</i> sp.	KF761524	Đất canh tác	Côlômbia
<i>Burkholderia</i> sp.	EF114423	Không rõ	Ôttrâyli
<i>Burkholderia</i> sp.	EF114419	Không rõ	Ôttrâyli
<i>Burkholderia</i> sp.	EF114409	Không rõ	Ôttrâyli
<i>Burkholderia</i> sp.	EF114418	Không rõ	Ôttrâyli
<i>Burkholderia</i> sp.	MH211376	Rễ cây lạc	Việt Nam

<i>Burkholderia cepacia</i> *	NR_029209	Không rõ	Pháp
<i>Burkholderia cepacia</i>	EU742139	Rễ cây bông	Ấn Độ
<i>Burkholderia lata</i> *	NR_102890	Đất	Ấn Độ
<i>Burkholderia lata</i>	AM905038	Hoa	Braxin
<i>Burkholderia ubonensis</i> *	NR_040830	Không rõ	Nhật Bản
<i>Burkholderia ubonensis</i> *	NR_116153	Không rõ	Pháp
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> *	NR_041720	Rễ lúa	Việt Nam
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	AB568311	Rễ cây cò	Malaysia
<i>Paraburkholderia kurur-</i> <i>riensis</i> *	NR_024721	Nước ngọt	Nhật Bản

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

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Một số đặc điểm hình thái

Từ 6 mẫu đất thu thập đã phân lập, tuyển chọn được 2 mẫu phân lập có hoạt tính tốt nhất như chịu NaCl, có hoạt tính phân giải lân vô cơ được bảo quản trong ống thạch nghiêng để xác định đặc điểm hình thái và định danh đến mức loài. Một số đặc điểm hình thái của 2 mẫu phân lập được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Đặc điểm hình thái của 2 mẫu phân lập tuyển chọn trên môi trường PVK.

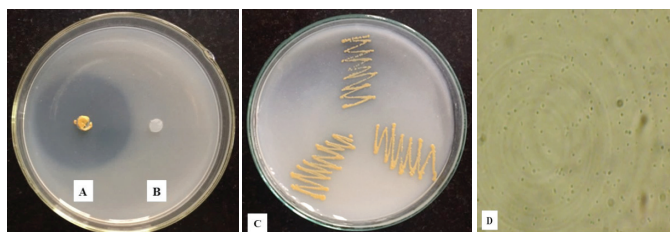
Chỉ tiêu theo dõi	Mẫu T2917	Mẫu T3602
Hình thái khuẩn lạc	Hình tròn, lồi, sinh tiết sắc tố màu vàng nhạt	Hình tròn, lồi, trơn bóng, không sinh tiết sắc tố, màu trắng đục
Hình thái tế bào	Hình que ngắn	Hình cầu, hình ovan
Nhuộm gram	Âm tính (-)	Âm tính (-)
Khả năng di động	Có	Có
Đường kính vòng phân giải lân $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	3,7±0,16 cm	2,2±0,44 cm
Chịu NaCl	5%	3%

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

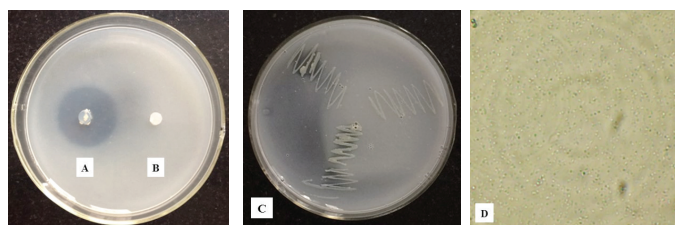
Khuẩn lạc mẫu phân lập T2917 có hình tròn, lồi, sinh tiết sắc tố màu vàng nhạt, còn mẫu T3602 không sinh tiết sắc tố, màu trắng đục.

Quan sát dưới kính hiển vi (80X), tế bào mẫu phân lập T2917 có dạng hình que ngắn, có khả năng di động, nhuộm gram âm, hình thành đường kính vòng phân giải lân $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ lớn (3,7±0,16 cm) và vẫn có thể sinh trưởng phát triển bình thường trên môi trường PVK có bổ sung NaCl 5% (hình 1). Một số đặc điểm hình thái của mẫu T2917 cũng tương tự như các báo cáo đã công bố [12, 13] thuộc chi *Pseudomonas*.

Còn mẫu phân lập T3602 có dạng hình cầu, hình ovan, có khả năng di động, nhuộm gram âm và chịu được NaCl 3% (hình 2). Một số báo cáo [14, 15] cũng đã mô tả đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn thuộc chi *Burkholderia* có hoạt tính phân giải lân vô cơ giống với mẫu T3602 trong nghiên cứu này.



Hình 1. Vòng phân giải lân của mẫu T2917 (A) và đối chứng (B) trên môi trường PVK; hình thái khuẩn lạc (C) và hình thái tế bào (D) của mẫu T2917.



Hình 2. Vòng phân giải lân của mẫu T3602 (A) và đối chứng (B) trên môi trường PVK; hình thái khuẩn lạc (C) và hình thái tế bào (D) của mẫu T3602.

Định danh vi khuẩn bằng PCR và giải trình tự

Các mẫu phân lập trong nghiên cứu này đều có khả năng chịu NaCl 1%, có hoạt tính phân giải lân vô cơ trên môi trường PVK được xác định sơ bộ thuộc chi *Pseudomonas* và *Burkholderia*. Nhằm định danh đến tên loài, cặp mồi 27F/1525R [9] đã được sử dụng trong phản ứng PCR để nhân đoạn gen 16S ARN ribosome của vi khuẩn.

Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy, các mẫu T2917 và T3602 tạo băng sản phẩm 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 T2917 là 1.426 bp và mẫu T3602 là 1.429 bp. Các trình tự này đã được đăng ký lên Ngân hàng gen với mã truy cập MN272346 (mẫu T2917) và MN270338 (mẫu T3602).

Dựa trên trình tự nucleotide thu được, tiến hành tìm kiếm các chuỗi nucleotide gần gũi với trình tự của các mẫu phân tích bằng công cụ trực tuyến (BLAST search) trên Ngân hàng gen (bảng 4 và 5).

Bảng 4. Các trình tự gần gũi trên Ngân hàng gen của mẫu phân tích T2917.

STT	Tên loài gần gũi nhất*	Mã truy cập	Phần trăm đoạn so sánh (%)	Mức đồng nhất trình tự (%)
1	<i>P. oryzae</i> 16S ribosomal RNA gene	MG571765	100	99,93
2	<i>Pseudomonas</i> sp. Os24 16S ribosomal RNA gene	HQ728558	100	99,86
3	<i>P. oryzae</i> 16S ribosomal RNA gene	NR_117269	100	99,79

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

Kết quả phân tích cho thấy, các trình tự nucleotide tìm được đều là các chuỗi mã hóa gen 16S ARN ribosome của vi khuẩn, trong đó mẫu T2917 (100% đoạn so sánh có mức đồng nhất trình tự 99,79-99,93%) gần gũi nhất với các mẫu phân lập thuộc loài *P. oryzae* đã được công bố có hoạt tính phân giải lân vô cơ, phân giải hydrocacbon. Vi khuẩn *P. oryzae* lần đầu được phát hiện trên rễ cây lúa tại Nhật Bản [12].

Các chuỗi nucleotide gần gũi với trình tự của mẫu phân tích T3602 được trình bày ở bảng 5.

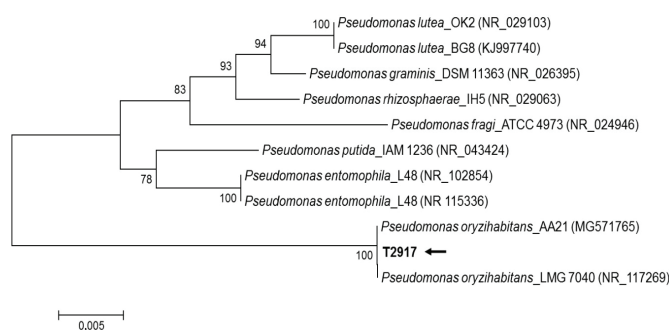
Bảng 5. Các trình tự gần gũi trên Ngân hàng gen của mẫu phân tích T3602.

STT	Tên loài gần gũi nhất*	Mã truy cập	Phần trăm đoạn so sánh (%)	Mức đồng nhất trình tự (%)
1	<i>Burkholderia</i> sp. 2 PSB-69 16S ribosomal RNA gene	KF761524	100	99,93
2	<i>Burkholderia</i> sp. MSMB33 16S ribosomal RNA gene	EF114423	100	98,39
3	<i>Burkholderia</i> sp. MSMB13 16S ribosomal RNA gene	EF114419	100	98,39

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

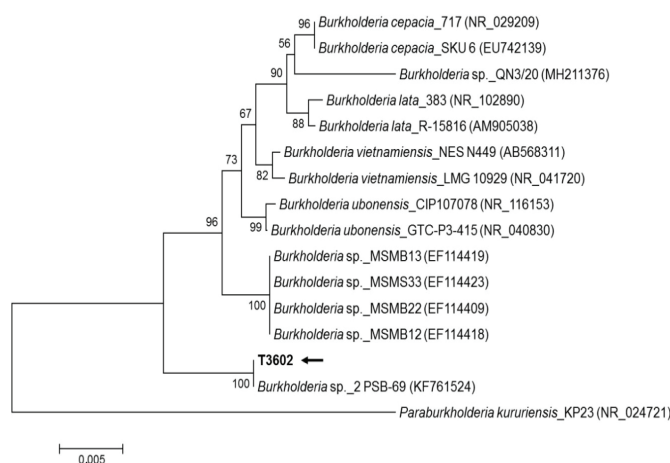
Kết quả tìm kiếm các chuỗi tương đồng trên Ngân hàng gen cho thấy, 100% trình tự của mẫu T3602 có mức đồng nhất cao nhất (99,93%) với loài vi khuẩn *Burkholderia* sp. 2 PSB-69 (mã truy cập KF761524) thuộc chi *Burkholderia*.

Cây phả hệ được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-Joining và độ tin cậy của các mối quan hệ phả hệ được tính toán bằng kỹ thuật “bootstrap” với 1.000 lần lặp. Quan hệ của mẫu T2917 được so sánh với đại diện các mẫu chuẩn của loài. Kết quả được trình bày ở hình 3.



Hình 3. Cây phả hệ dựa trên vùng 5' của gen 16S ARN ribosome của các mẫu vi khuẩn *Pseudomonas*.

Kết quả phân tích phả hệ cho thấy, mẫu T2917 nằm cùng nhánh với các mẫu phân lập đã được công bố là loài *P. oryzae*. Dựa vào tài liệu đã công bố, vi khuẩn *P. oryzae* có mức độ an toàn sinh học thuộc nhóm 2 [16]. Quan hệ phả hệ của mẫu T3602 được phân tích với đại diện của các mẫu chuẩn của loài thuộc chi *Burkholderia*. Kết quả được trình bày ở hình 4.



Hình 4. Cây phả hệ dựa trên vùng 5' của gen 16S ARN ribosome của các mẫu vi khuẩn *Burkholderia*.

Kết quả phân tích phả hệ cho thấy rằng, mẫu T3602 nằm cùng nhánh với mẫu phân lập đã được công bố là loài *Burkholderia* sp. 2 PSB-69. Đây là loài vi khuẩn đã được công bố có hoạt tính phân giải lân vô cơ khó tan phân lập từ rễ cây cọ dầu tại Colombia [15]. Dựa vào tài liệu đã công bố, vi khuẩn *Burkholderia* sp. có mức độ an toàn sinh học thuộc nhóm 1 [16].

Nghiên cứu này đã xác định được chủng *P. oryzae* T2917 và *Burkholderia* sp. T3602 có khả năng chịu NaCl $\geq 1\%$, có hoạt tính phân giải lân vô cơ, đảm bảo an toàn sinh học, đều có tiềm năng sản xuất chế phẩm vi sinh vật sử dụng cho cây ăn quả tại các vùng đất bị nhiễm mặn.

Kết luận

Đã phân lập được 2 chủng vi khuẩn *P. oryzae* T2917 và *Burkholderia* sp. T3602 từ vùng đất trồng bưởi Da xanh ở tỉnh Bến Tre có khả năng chịu nồng độ muối NaCl $\geq 3\%$, có hoạt tính phân giải lân vô cơ ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) với đường kính vòng phân giải $3,7 \pm 0,16$ và $2,2 \pm 0,44$ cm). Hai chủng này có tiềm năng trong sản xuất chế phẩm vi sinh sử dụng trong nông nghiệp, đặc biệt ở vùng đất bị nhiễm mặn.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện từ nguồn kinh phí do Bộ Khoa học và Công nghệ cấp thông qua đề tài mã số ĐTDL. CN-29/17. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S.B. Sharma, R.Z. Sayyed, M.H. Trivedi, T.A. Gobi (2013), "Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils", *SpringerPlus*, **2**(1), pp.587-591.
- [2] A. Atekan, Y. Nuraini, E. Handayanto, S. Syekhfani (2014), "The potential of phosphate solubilizing bacteria isolated from sugarcane wastes for solubilizing phosphate", *Journal of Degraded and Mining Lands Management*, **1**(4), pp.175-182.
- [3] M. Tahir, M.A. Sarwar (2013), "Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A budding complement of synthetic fertilizers for improving crop production", *Pakistan Journal of Life and Social Sciences*, **11**(1), pp.1-7.
- [4] D.S. Hayman (1975), *Phosphorus cycling by soil microorganisms and plant roots*, Soil Microbiology, Butterworths, London, pp.67-91.
- [5] A.C. Gaur (1990), *Phosphate solubilizing micro-organisms as biofertilizer*, Omega Scientific Publishers, New Dehli, 176 pp.
- [6] D. Paul, H. Lade (2014), "Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review", *Agronomy for Sustainable Development*, **34**(4), pp.737-752.
- [7] 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, 101tr.
- [8] H. Wang, M. Qi, A.J. Cutler (1993), "A simple method of preparing plant samples for PCR", *Nucleic Acids Research*, **21**(17), pp.41-53.
- [9] W.G. Weisburg, S.M. Barns, D.A. Pelletier, D.J. Lane (1991), "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study", *Journal of Bacteriology*, **173**(2), pp.697-703.
- [10] H.W. McWilliam, M. Li, S. Uludag, Y.M. Squizzato, N. Park, A.P. Buso, T. Cowley, R. Lopez (2013), "Analysis tool web services from the EMBL-EBI", *Nucleic Acids Research*, **41**, pp.597-600.
- [11] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar (2013), "MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0", *Molecular Biology and Evolution*, **30**(12), pp.2725-2729.
- [12] K. Kodama, N. Kimura and K. Komagata (1985), "Two new species of *Pseudomonas*: *P. oryzae* isolated from rice paddy and clinical specimens and *P. luteola* isolated from clinical specimens", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **35**(4), pp.467-474.
- [13] E. Wahdi, N.R. Mubarak, R. Widyastuti (2016), "Characterization of phosphate solubilising bacteria from limestone quarry in Cirebon Indonesia", *Journal of International Environmental Application and Science*, **11**(4), pp.312-317.
- [14] Nguyễn Khởi Nghĩa, Nguyễn Thị Kiều Oanh (2017), "Phân lập và tuyển chọn dòng vi khuẩn chịu mặn có khả năng hòa tan lân từ nền đất lúa trong mô hình canh tác lúa - tôm tại một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long", *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, **15**(1), tr.121-131.
- [15] E. Acevedo, T. Galindo-Castañeda, F. Prada, M. Navia, H.M. Romero (2014), "Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Colombia", *Applied Soil Ecology*, **80**, pp.26-33.
- [16] L.C. Reimer, et al. (2018), "Bac Dive in 2019: bacterial phenotypic data for high-throughput biodiversity analysis", *Nucleic Acids Research*, **47**(D1), pp.631-636.