

KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI PROTEIN, LIPID, TINH BỘT, CHITIN VÀ ỨC CHẾ NẤM CỦA VI KHUẨN VÙNG RỄ ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ CÂY TIÊU (*Piper nigrum* L.) TRỒNG Ở HUYỆN CHƠN THÀNH, TỈNH BÌNH PHƯỚC

Đặng Thị Ngọc Thanh^{1*}, Hà Bảo Sơn² và Châu Kim Xuyên³

¹Khoa Sư phạm Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Sài Gòn

²Trường Trung học cơ sở Nguyễn Hữu Thọ

³Trường Trung học phổ thông Năng khiếu Thể dục thể thao huyện Bình Chánh

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Đặng Thị Ngọc Thanh (email: ngocthanh272002@yahoo.com)

ABSTRACT

This study was conducted on 22 bacterial strains which were isolated from the rhizosphere of the black pepper plants and determined the ability of nitrogen fixation, phosphate solubilization, IAA synthesis, and siderophore production in a previous research. The ability to degrade organic compounds including starch, protein, lipid, chitin and the fungal inhibition of these bacteria has been investigated by using agar well diffusion method. The results showed that the number of bacterial strains capable of degrading starch, protein, chitin and lipid were 21, 20, 12, and 10 respectively. Two bacterial strains including MH13 and ML17.1 were able to inhibit indicator fungi in which MH13 able to inhibit *Fusarium* sp. and ML17.1 able to inhibit all of the fungi including *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus niger*, *A. flavus*, and *Cladosporium* sp. The top 4 strains have been identified as *Bacillus subtilis* (ML17.1 and MH13) and *Alcaligenes* sp. (CT5 and TT5) by using MALDI-TOF mass spectrometry. These are plant-growth-promoting rhizobacteria that have been reported for potential applications in agriculture.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện trên 22 chủng vi khuẩn đã được phân lập từ vùng rễ cây tiêu và đã xác định khả năng cố định đạm, hòa tan phosphate, tổng hợp IAA và sản xuất siderophore trong một nghiên cứu trước đây. Khả năng phân giải các hợp chất hữu cơ bao gồm tinh bột, protein, lipid, chitin và sự ức chế nấm của các vi khuẩn này đã được nghiên cứu bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch. Kết quả cho thấy số lượng các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải tinh bột, protein, chitin và lipid lần lượt là 21, 20, 12 và 10 chủng. Hai chủng vi khuẩn bao gồm MH13 và ML17.1 có thể ức chế nấm chỉ thị, trong đó MH13 có thể ức chế *Fusarium* sp. và ML17.1 có thể ức chế tất cả các loại nấm chỉ thị bao gồm *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus niger*, *A. flavus* và *Cladosporium* sp. Bốn chủng tốt nhất đã được xác định là *Bacillus subtilis* (ML17.1 và MH13) và *Alcaligenes* sp. (CT5 và TT5) bằng phương pháp khối phổ MALDI-TOF. Đây là các vi khuẩn thúc đẩy tăng trưởng thực vật đã được báo cáo về các ứng dụng tiềm năng trong nông nghiệp.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 08/09/2019

Ngày nhận bài sửa: 25/12/2019

Ngày duyệt đăng: 28/02/2020

Title:

The ability of degrading protein, lipid, starch, chitin, and fungal inhibiting of rhizobacteria isolated from black pepper plants (*Piper nigrum* L.) cultivated in Chon Thanh district, Binh Phuoc province

Từ khóa:

Biodegradation, black pepper plants (*Piper nigrum* L.), fungal inhibition, MALDI-TOF mass spectrometry, Plant Growth Promoting Rhizobacteria

Keywords:

Cây tiêu (*Piper nigrum* L.), khối phổ MALDI-TOF, phân hủy sinh học, ức chế nấm, vi khuẩn vùng rễ thúc đẩy tăng trưởng thực vật

Trích dẫn: Đặng Thị Ngọc Thanh, Hà Bảo Sơn và Châu Kim Xuyên, 2020. Khả năng phân giải protein, lipid, tinh bột, chitin và ức chế nấm của vi khuẩn vùng rễ được phân lập từ cây tiêu (*Piper nigrum* L.) trồng ở huyện Chơn Thành, tỉnh Bình Phước. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(1B): 95-103.

1 GIỚI THIỆU

Năm 2017, hồ tiêu là một trong 10 loại nông sản của Việt Nam có kim ngạch xuất khẩu đạt trên một tỷ USD. Tuy nhiên, khó khăn lớn nhất hiện nay của ngành hồ tiêu nước ta là vấn đề dư lượng thuốc trừ sâu và phân bón khiến cho việc xuất khẩu sang các thị trường như Mỹ, châu Âu gặp nhiều trở ngại. Canh tác hữu cơ là sự lựa chọn tất yếu trong sản xuất hồ tiêu cũng như các loại nông sản khác; trong đó đề cao vai trò của phân bón sinh học và kiểm soát sinh học nhằm giảm thiểu phân bón hoá học và hoá chất bảo vệ thực vật. Hiện nay, vi khuẩn vùng rễ thúc đẩy tăng trưởng thực vật, gọi tắt là PGPR (plant-growth promoting rhizobacteria), là đối tượng được biết đến nhiều trong xu hướng phát triển nông nghiệp bền vững. Đa số các PGPR thường không sở hữu từng đặc tính thúc đẩy tăng trưởng thực vật đơn lẻ mà thường có hiện tượng cộng tính (additive hypothesis) (Martinez-Viveros *et al.*, 2010; Ahemad and Kibret, 2014). Ngoài các cơ chế thúc đẩy tăng trưởng thực vật một cách trực tiếp như cố định đạm sinh học, hòa tan phosphate, sản xuất các phytohormone, nhiều PGPR còn sở hữu các cơ chế gián tiếp như kiểm soát sinh học hay đối kháng sinh học thông qua sự sản xuất cyanide, siderophore, kháng sinh và các enzyme thủy giải (Gupta *et al.*, 2015). Hoạt động đối kháng, trong đó có ức chế nấm bệnh, của PGPR được cho là do sự sản xuất các enzyme như chitinase, protease/elastase, β -1,3-glucanase giúp phân huỷ vách tế bào (Jadhav *et al.*, 2017). Hơn nữa, khi xuất tiết các enzyme ngoại bào vào môi trường, các vi khuẩn vùng rễ còn góp phần chuyển hóa một lượng lớn các hợp chất hữu cơ có sẵn trong đất thành dạng đơn giản mà cây có thể hấp thụ, từ đó làm tăng cường dinh dưỡng và hỗ trợ sức khỏe cho cây. Gianfreda (2015) cho rằng enzyme vùng rễ có hoạt tính và vai trò quan trọng hơn so với enzyme có trong đất đối với sự phân huỷ các cơ chất carbon và các chất hữu cơ chứa N, P và S.

Trên thế giới, hiện có nhiều công trình nghiên cứu trên đối tượng các PGPR sở hữu cùng lúc khả năng đối kháng sinh học và phân giải sinh học. Các PGPR có khả năng sinh enzyme ngoại bào như protease, cellulase, chitinase, lipase đã được phân lập và xác định đặc tính. Nhiều chủng PGPR trong số đó được nhận diện như là *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus sp.*, *Bacillus licheniformis*,... (Sayyed *et al.*, 2010; Bharucha *et al.*, 2013; Azman *et al.*, 2017). Yap (2012) cũng đã phân lập được các PGPR từ đất vùng rễ cây tiêu trồng tại Malaysia. Kết quả nghiên cứu cho thấy bốn chủng *Bacillus amyloliquefaciens* (WW6), *Bacillus atrophaeus* (MPB), *Bacillus subtilis* (CBF) and *Bacillus vallismortis* (WW14) có khả năng sản xuất các enzyme như cellulase, protease, và ức chế các nấm như *Colletotrichum*

capsici, *Fusarium solani*. Ở Việt Nam, trong 9 taxa nấm mốc được phân lập từ rễ các cây tiêu trồng ở Quảng Trị, có 4 taxa chiếm tỷ lệ lớn, bao gồm *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp.*, *Fusarium solani*, *Fusarium spp.*, và *Penicillium sp.* Trong đó, *Fusarium solani* thường được phân lập từ các cây bị vàng lá và có khả năng gây hại khi kết hợp với tuyến trùng *Meloidogyne incognita* (Thuy *et al.*, 2013). Các loài *Aspergillus* như *A. flavus*, *A. niger*, và các loài thuộc các chi *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, và *Trichoderma* cũng là các nấm mốc thường được phân lập từ tiêu hạt trong thương mại, lưu trữ và ngoài đồng tại một số nước như Brazil, Bahrain, Iraq, và Ả Rập (Freire *et al.*, 2000; Mandeel, 2005; Hashem and Alamri, 2010; Toma and Abdulla, 2013).

Trong nghiên cứu của Thanh và Tram (2018), có 22 chủng vi khuẩn đã được phân lập từ cây tiêu trồng tại huyện Chợ Thành, tỉnh Bình Phước; và bước đầu đã được xác định một số đặc tính PGPR như cố định đạm, hoà tan phosphate, tổng hợp IAA và siderophore. Để nối tiếp nghiên cứu này, các đặc tính PGPR gián tiếp bao gồm sự phân giải các chất hữu cơ là protein, lipid, tinh bột và chitin, và sự ức chế các nấm mốc thường nhiễm vào cây tiêu hoặc tiêu hạt bao gồm *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* và *Cladosporium* đã được tiến hành dò tìm. Các chủng PGPR cộng tính này sẽ là nguồn vật liệu tốt cho các nghiên cứu chế tạo phân vi sinh đa chức năng cho cây tiêu về sau.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Hai mươi hai chủng PGPR được phân lập từ cây tiêu trồng tại huyện Chợ Thành, tỉnh Bình Phước có trong bộ sưu tập giống của phòng thí nghiệm Vi sinh vật học Trường Đại học Sài Gòn. Năm chủng nấm chỉ thị gồm *Cladosporium sp.*, *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus flavus*, *A. niger* do Khoa Dược, Trường Đại học Y dược TP. Hồ Chí Minh cung cấp.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Hoạt hoá vi khuẩn và chuẩn bị dịch huyền phù

Sau thời gian lưu trữ, 22 chủng vi khuẩn đã được cấy chuyển và kiểm tra độ thuần trên môi trường LB (10 g tryptone, 5 g chiết nấm men, 10 g NaCl, 18 g agar, pH 7,0) (Bertani *et al.*, 1951). Lấy đầy một vòng que cấy sinh khối của mỗi chủng chuyển vào ống nghiệm chứa 5 mL môi trường LB lỏng, ủ trên máy lắc ôn nhiệt ở 30°C, 120 vòng/phút. Sau 48 giờ, lấy 1 mL dịch huyền phù vi khuẩn chuyển vào bình tam giác chứa 99 mL môi trường LB lỏng, tiếp tục

nuôi cấy trong vòng 24 – 48 giờ để tăng sinh vi khuẩn. Dịch huyền phù vi khuẩn được điều chỉnh độ đục tương ứng với chuẩn McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU mL⁻¹) (Ventorino *et al.*, 2016) sẽ được sử dụng cho tất cả các thí nghiệm về sau.

2.2.2 Khảo sát khả năng phân giải tinh bột, lipid, protein, và chitin

a. Công thức các loại môi trường chỉ thị

Môi trường “Mt1” (3 g cao thịt, 5 g peptone, 2 g tinh bột tan, pH 7,0) được sử dụng để kiểm tra khả năng phân giải tinh bột (Geetha *et al.*, 2003). Môi trường “TBA – olive oil” (5 g peptone, 3 g cao nấm men, 10 mL dầu olive, 0,05 g rhomadine B, pH 7,2) được sử dụng để kiểm tra khả năng phân giải lipid (Eugenia *et al.*, 2016). Môi trường “Skim milk” (5 g peptone, 3 g cao thịt, 1 g cao nấm men, 300 mL sữa gầy, pH 6,5) được sử dụng để kiểm tra khả năng phân giải protein (Sokol *et al.*, 1979). Môi trường “Colloidal chitin” (0,7 g K₂HPO₄, 0,3 g KH₂PO₄, 0,5 g MgSO₄.5H₂O, 0,01 g FeSO₄.7H₂O, 0,001 g ZnSO₄, 0,001 g MnCl₂, 0,5 g keo chitin, pH 6,5) được sử dụng để kiểm tra khả năng phân giải chitin (Hsu and Lockwood *et al.*, 1975).

b. Phương pháp xác định khả năng phân giải các hợp chất hữu cơ

Phương pháp khuếch tán giếng thạch đã được sử dụng để đánh giá khả năng phân giải các chất (Balouiri *et al.*, 2016). Dùng mũi khoan tiết trùng để tạo các giếng trên tấm thạch đĩa Petri, đường kính giếng là 5 mm. Thu 50 µL dịch huyền phù của mỗi chủng vi khuẩn (mật số $1,5 \times 10^8$ CFU mL⁻¹, đã được chuẩn bị theo Mục 2.2.1) nhỏ vào mỗi giếng. Ủ các đĩa Petri ở 30°C trong vòng 48 giờ; sau đó tiến hành quan sát sự tạo vòng trong suốt (halo) và đánh giá kết quả.

Để làm rõ sự xuất hiện của vòng halo, cần tiến hành nhuộm màu đĩa thạch với dung dịch Lugol’s chứa 150 mg/mL iodine (5 g iodine và 10 g potassium iodide trong 100 mL nước cất) đối với thí nghiệm xác định khả năng phân giải tinh bột, và với dung dịch Congo Red 0,1% (trong 15 phút; rửa lại bằng NaCl 1M) đối với thí nghiệm xác định khả năng phân giải chitin. Đối với thí nghiệm xác định khả năng phân giải lipid, sự phát huỳnh quang của phức hợp lipid và Rhomadine B dưới ánh đèn UV ở bước sóng 365 nm sẽ làm rõ sự xuất hiện của vòng halo. Riêng đối với sự phân giải protein, sự phân giải protein trong sữa sẽ tạo thành vòng halo trong hơn trên nền môi trường màu trắng đục; do vậy, không cần thêm sự hỗ trợ để hiện vòng.

c. Đánh giá khả năng phân giải các chất hữu cơ

Khả năng phân giải chất hữu cơ của các chủng vi khuẩn được đánh giá thông qua kích thước vòng

halo tạo ra xung quanh khuẩn lạc và được tính theo công thức: $KNPG = D - d$ (Azman *et al.*, 2017). Trong đó, KNPG là “khả năng phân giải cơ chất”, D là đường kính vòng halo và d là đường kính khuẩn lạc (đơn vị là cm).

2.2.3 Khảo sát khả năng kháng nấm

Đối với khảo sát khả năng kháng nấm, sử dụng phương pháp cấy kếp của Shrivastava *et al.* (2017). Năm chủng nấm chỉ thị gồm *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus flavus*, *A. niger* đã được nuôi cấy trên môi trường thạch đĩa PDA (Potato Dextrose Agar) (20 g cao khoai tây, 20 g dextrose, pH 7,0) trong vòng 5 ngày để thu lấy đĩa nấm (đường kính 5 mm; sử dụng mũi khoan vô trùng).

Chuẩn bị các Petri chứa môi trường PDA mới. Dùng mũi khoan vô trùng để tạo ra 3 giếng (đường kính 5 mm) nằm ở 3 góc và cách mép đĩa 1 cm. Lần lượt cho vào 3 giếng trong mỗi đĩa: 50 µL dịch huyền phù của mỗi chủng vi khuẩn (mật số $1,5 \times 10^8$ CFU mL⁻¹, đã được chuẩn bị theo Mục 2.2.1), 50 µL nước cất vô trùng (đối chứng âm I), 50 µL môi trường LB lỏng vô trùng (đối chứng âm II). Ở tâm điểm của mỗi đĩa Petri, đặt vào 1 đĩa nấm chỉ thị. Ủ các đĩa ở 30°C.

Sau 7 ngày nuôi cấy, tiến hành quan sát và ghi nhận các chủng có khả năng kháng nấm; từ đó tính tỷ lệ (%) của sự ức chế tăng trưởng (Growth Inhibition Index) theo công thức $(C - T) * 100 / C$. Trong đó, C là sự tăng trưởng của nấm chỉ thị trong nghiệm thức đối chứng (âm) và T là tăng trưởng của nấm chỉ thị trong nuôi cấy kếp.

2.2.4 Bố trí thí nghiệm và phân tích dữ liệu

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Đối chứng âm được tiến hành tương tự nhưng thay dịch huyền phù vi khuẩn bằng nước cất vô trùng. Riêng thí nghiệm khảo sát khả năng kháng nấm, sử dụng thêm một đối chứng âm khác đó là môi trường nuôi cấy vi khuẩn lỏng vô trùng để loại trừ tác dụng ức chế nấm có thể có trong thành phần môi trường này (LB lỏng). Các số liệu được kiểm định thống kê bằng phân tích phương sai một nhân tố ở độ tin cậy 95%, sử dụng phần mềm SPSS version 20.

Đối với sự định danh vi khuẩn, các chủng có khả năng phân giải chất hữu cơ và kháng nấm tốt đã được tuyển chọn và cấy chuyển trên môi trường thạch đĩa LB; gửi mẫu đến Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP. Hồ Chí Minh trong vòng 24 giờ để được nhận diện bằng phương pháp khối phổ MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization

– Time of Flight) (Hệ thống Bruker Daltonik MALDI Biotyper, Đức).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Khả năng phân giải protein, lipid, tinh bột và chitin của 22 chủng vi khuẩn vùng rễ cây tiêu

Hoạt tính phân giải các cơ chất hữu cơ bao gồm tinh bột, lipid, protein, chitin mà nghiên cứu này đã tiến hành dò tìm thông qua sự xuất hiện vòng halo cũng đã được nhiều tác giả trên thế giới thực hiện

trên đối tượng PGPR. Các tác giả cũng đã liên hệ hoạt tính này với khả năng sản xuất các enzyme tương ứng gồm amylase, lipase, protease và chitinase và đặc biệt là với tính kháng nấm (ngoại trừ amylase). Trong nghiên cứu này, khả năng phân giải protein, lipid, tinh bột và chitin, của 22 chủng vi khuẩn vùng rễ cây tiêu đã được đánh giá thông qua sự tạo vòng halo. Kết quả cho thấy có 21 chủng có khả năng tinh bột, 10 chủng có khả năng phân giải lipid, 20 chủng có khả năng phân giải protein, và 12 chủng có khả năng phân giải chitin (Bảng 1).

Bảng 1: Khả năng phân giải các hợp chất hữu cơ của 22 chủng PGPR

STT	Tên dòng	Khả năng phân giải (cm)			
		Tinh bột	Lipid	Protein	Chitin
1	CT2	0,73 ^{de}	0,20 ^c	0,43 ^{gh}	0,00 ^f
2	CT5	0,90 ^b	0,60 ^a	1,49 ^a	0,53 ^a
3	CT6	0,20 ^j	0,00 ^d	0,50 ^g	0,00 ^f
4	CT10	0,73 ^{de}	0,00 ^d	0,40 ^{hi}	0,00 ^f
5	CT12	0,50 ^h	0,20 ^c	0,40 ^{hi}	0,00 ^f
6	TT2	0,27 ^{ij}	0,00 ^d	1,07 ^d	0,40 ^d
7	TT5	0,73 ^{de}	0,00 ^d	1,36 ^b	0,20 ^e
8	TT6	0,80 ^{cd}	0,00 ^d	0,60 ^g	0,00 ^f
9	TT10	0,73 ^{de}	0,40 ^b	0,33 ^{ij}	0,00 ^f
10	TT11	0,73 ^{de}	0,00 ^d	0,00 ^l	0,00 ^f
11	ML4.1	0,33 ⁱ	0,20 ^c	0,90 ^e	0,00 ^f
12	ML4.2	0,60 ^{fg}	0,00 ^d	0,33 ^{ij}	0,20 ^e
13	ML4.31	0,73 ^{de}	0,00 ^d	1,20 ^c	0,20 ^e
14	ML4.32	0,63 ^f	0,40 ^b	1,40 ^{ab}	0,20 ^e
15	ML6.1	0,67 ^{ef}	0,20 ^c	1,00 ^d	0,40 ^d
16	ML6.2a	0,67 ^{ef}	0,00 ^d	0,50 ^g	0,00 ^f
17	ML6.2b	0,00 ^k	0,00 ^d	0,20 ^k	0,20 ^e
18	ML6.3	0,33 ⁱ	0,20 ^c	0,33 ^{ij}	0,20 ^e
19	ML13.1	0,53 ^{gh}	0,00 ^d	0,00 ^l	0,47 ^c
20	ML17.1	0,87 ^{bc}	0,40 ^b	0,40 ^{hi}	0,00 ^f
21	MH9	0,80 ^{cd}	0,00 ^d	0,20 ^k	0,50 ^b
22	MH13	1,13 ^a	0,60 ^a	0,40 ^{hi}	0,20 ^e
23	Đối chứng	0,00 ^k	0,00 ^d	0,00 ^l	0,00 ^f

Trong cùng một cột, các giá trị được theo sau bởi cùng ký tự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức alpha=0,05 theo phép thử Duncan.

3.1.1 Khả năng phân giải tinh bột

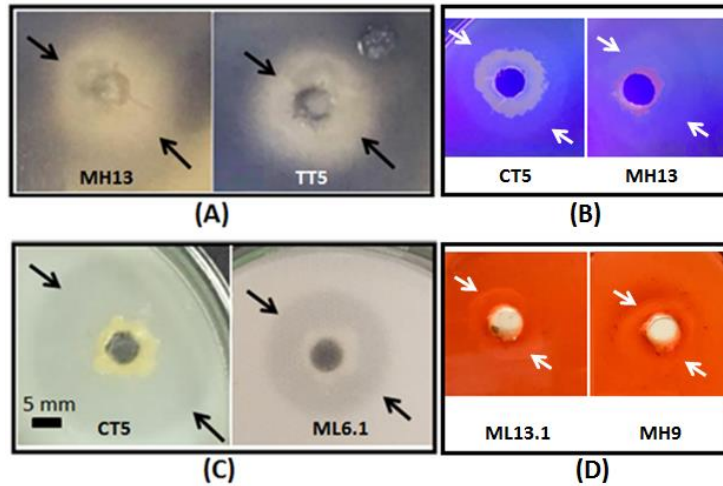
Xử lý đĩa thạch sau nuôi cấy bằng dung dịch Lugol đã giúp biểu thị vòng halo màu trắng trên nền môi trường bắt màu xanh tím (Hình 1A). Qua đó cho thấy, ngoại trừ chủng ML6.3, hai mươi một chủng còn lại đều có khả năng phân giải tinh bột với khả năng phân giải đạt từ 0,2 đến 1,13 cm. Trong đó có 5 chủng có khả năng phân giải thấp hơn 0,5 cm; 16 chủng có khả năng phân giải đạt từ 0,5 đến 1,0 cm, và một chủng có khả năng phân giải đạt trên 1,0 cm. Năm chủng phân giải tinh bột tốt nhất là MH13, CT5, ML17.1, MH9 và TT6.

Mặc dù tinh bột là chất dự trữ của thực vật, không phải của nấm và không liên quan đến tính

kháng nấm, nhưng trong việc dò tìm khả năng phân giải chất của các PGPR, nhiều tác giả cũng đã sử dụng môi trường chứa tinh bột tan để phát hiện khả năng phân giải cơ chất này. Choubane *et al.* (2016) đã tập trung nghiên cứu về đa dạng kiểu hình của các vi khuẩn vi khuẩn vùng rễ có khả năng tiết xuất amylase, đóng vai trò quan trọng trong sự phân giải chất xác bã thực vật có chứa tinh bột. Trong 137 chủng vi khuẩn vùng rễ có khả năng tiết amylase phân lập từ 8 loại cây thường mọc ở Algeria (Bắc Phi), các tác giả nhận thấy hoạt động amylase của các vi khuẩn phân lập từ 3 loại cây carob (*Ceratonia siliqua*), argan (*Argania spinosa*) và sung ngọt (*Ficus carica*) là đặc biệt mạnh. Khả năng phân giải của các dòng tốt nhất dao động từ 2,9 mm – 5,0 mm.

Khả năng phân giải tinh bột hay hoạt động của amylase cũng là đặc tính thường thấy của các PGPR. Trong 6 chủng vi khuẩn được tuyển chọn từ 140 chủng PGPR phân lập từ cây đậu xanh (*Vigna radita* L.) trồng tại Ấn Độ, có 5 chủng vi khuẩn (4 chủng Gram dương và một chủng Gram âm) biểu thị khả năng phân giải tinh bột (Geetha *et al.*, 2014). Trong khi đó, tất cả 13 chủng PGPR được phân lập từ cây

ớt *Capsicum annum* L. trồng trên đất nhiễm mặn ở Xinjiang, Trung Quốc đều có khả năng tiết amylase ngoại bào (Wang *et al.*, 2018). Ngoài vi nấm, các vi khuẩn như *Bacillus subtilis*, *Clostridium acetobutylicum* cũng đã được báo cáo về khả năng phân giải tinh bột (Dhawale *et al.*, 1982; Yazdanparast, 1993; Davison *et al.*, 1995).



Hình 1: Vòng halo được tạo ra bởi một số chủng vi khuẩn có khả năng phân giải tinh bột (A), lipid (B), protein (C), và chitin (D)

Đường kính giếng là 5 mm; các mũi tên dùng để chỉ giới hạn của vòng halo

3.1.2 Khả năng phân giải lipid

Dưới sự hỗ trợ của tia UV và phẩm nhuộm Rhomadine B, vòng halo xuất hiện do sự phân giải lipid được biểu thị rõ hơn (Hình 1B bên trên). Trong 22 chủng vi khuẩn đã khảo sát, có 10 chủng phân giải được lipid. Trong đó có 5 chủng có khả năng phân giải là 0,2 cm; 3 chủng có khả năng phân giải là 0,4 cm; và 2 chủng có khả năng phân giải là 0,6 cm (CT5, MH13).

Mặc dù thành phần chủ yếu của vách tế bào nấm là polysaccharide, đặc biệt là glucan và chitin, gần đây các hợp chất chứa lipid như glycolipid, triacylglycerol lipid, phosphatidylethanolamine cũng đã được tìm thấy. Tuy vai trò của lipid có trong thành phần màng sinh chất của tế bào nấm đã được xác nhận là có liên quan đến tính gây độc, hiện nay vai trò của lipid có trong thành phần vách tế bào nấm vẫn chưa được làm sáng tỏ hoàn toàn (Longo *et al.*, 2013; Feofilova *et al.* 2015; Rella *et al.*, 2016). Chính vì vậy, một số nghiên cứu về khả năng phân giải chất liên quan đến hoạt tính kháng nấm thường không xét đến khả năng phân giải lipid cũng như khả năng phân giải tinh bột như đã đề cập bên trên. Tuy nhiên, ở góc độ đối kháng sinh học nói chung, nhiều tác giả cũng đã tiến hành dò tìm khả năng phân giải lipid hoặc hoạt tính của lipase. Nghiên cứu của Geetha *et al.* (2014) trên 6 chủng vi khuẩn PGPR ở

cây đậu xanh cho thấy chỉ có 2 chủng biểu thị khả năng phân giải lipid. Ngược lại, trong nghiên cứu của Wang *et al.* (2018), tất cả 13 chủng PGPR được phân lập từ cây ớt đều có khả năng này. Đối với khả năng phân giải lipid thể hiện qua kích thước vòng halo, trong nghiên cứu của Azman *et al.*, (2017) được thực hiện trên các vi khuẩn liên kết cây lúa trồng tại Malaysia, khả năng này dao động từ 0,3 – 1,6 cm. Trong khi đó trong nghiên cứu của Dương Minh Lam và Vũ Thị Lý (2012), 8 chủng vi khuẩn được tuyển chọn từ 250 chủng vi khuẩn phân lập từ đất rừng ngập mặn Việt Nam lại có khả năng phân giải lipid đạt từ 1,7 – 2,1 cm. Các nghiên cứu trên vi khuẩn phân giải lipid và tinh bột ở Việt Nam thường nhằm đến mục tiêu ứng dụng trong lĩnh vực xử lý nước thải, chất thải hay trong lĩnh vực công nghiệp sản xuất chất tẩy rửa, công nghiệp thuộc da (Hà Thanh Toàn và *ctv.*, 2008; Dương Minh Lam và Vũ Thị Lý, 2012; Tu *et al.*, 2015) hơn là trong lĩnh vực chế tạo phân bón cho nông nghiệp.

3.1.3 Khả năng phân giải protein

Căn cứ trên sự xuất hiện của vòng halo có độ trong cao hơn so với môi trường màu trắng đục (Hình 1C bên trên), ngoại trừ 2 chủng TT11 và ML13.1, cả 20 chủng vi khuẩn còn lại đều có khả năng phân giải protein. Khả năng phân giải protein của các chủng đạt từ 0,2 đến 1,47 cm (tương đương

đường kính vòng halo là 0,7 đến 1,97 cm). Trong đó, có 10 chủng có khả năng phân giải protein dưới 0,5 cm; 4 chủng có khả năng phân giải từ 0,5 đến dưới 1,0 cm; và 6 chủng có khả năng phân giải đạt từ 1,0 cm trở lên (TT5, CT5, ML4.32, ML4.31, TT2, và ML6.1). Kết quả về khả năng phân giải protein nêu trên cũng tương đồng với kết quả của một số công bố của một số tác giả khác; ví dụ như khả năng phân giải protein (đo theo đường kính vòng halo) của các PGPR liên kết cây lúa trồng tại Malaysia là 0,2 – 1,63 cm (Azman *et al.*, 2017), và của các PGPR liên kết cây ớt trồng ở Việt Nam là 0,2 – 1,97 cm (Nguyễn Thị Liên và *ctv.*, 2016). Protease là enzyme phân giải protein. Protease cùng với các enzyme có vai trò phân giải polysaccharide như chitinase, cellulase, β -1,3-glucanase đã được xem là các enzyme chịu trách nhiệm chính trong khả năng đối kháng nấm của PGPR (Jadhav *et al.*, 2017). Nhiều công trình nghiên cứu về PGPR nói chung và PGPR đối kháng sinh học nói riêng cũng đã tiến hành dò tìm khả năng sinh enzyme protease của các vi khuẩn, qua đó cho thấy tỷ lệ vi khuẩn có khả năng này thay đổi theo đối tượng cây chủ: chiếm 23,7% trong tổng số 66 chủng tuyển chọn đã được phân lập từ các cây đại và cây bản địa của Ả Rập Saudi (El-Sayed *et al.*, 2014); chiếm 52,1% trong tổng số 48 chủng tuyển chọn đã được phân lập từ cây chè (trà) trồng tại Ấn Độ (Dutta and Thakur, 2017). Hai nghiên cứu này không đề cập kết quả về đường kính vòng halo.

3.1.4 Khả năng phân giải chitin

Xử lý đĩa thạch sau nuôi cấy bằng dung dịch Congo Red đã giúp biểu thị vòng halo trên nền môi trường bắt màu đỏ cam (Hình 1D bên trên). Qua đó cho thấy có 12 chủng phân giải được chitin; trong đó có 7 chủng có khả năng phân giải đạt 0,2 cm, và 5 chủng có khả năng phân giải đạt từ 0,4 đến 0,53 cm (CT5, MH9, ML13.1, TT2, ML6.1).

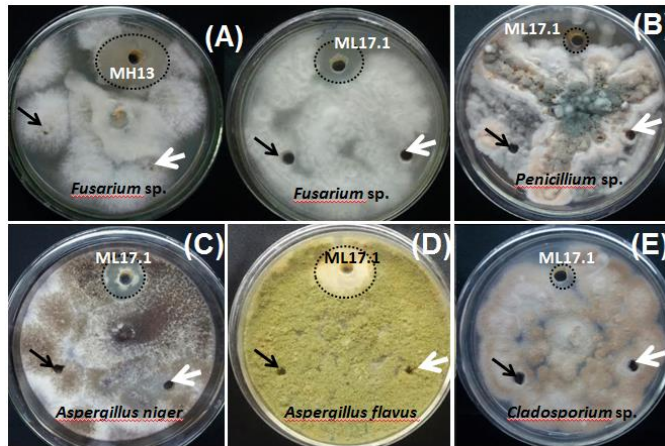
Tỷ lệ vi khuẩn phân giải chitin thay đổi theo loại cây chủ: chiếm 12,5% trong số các vi khuẩn vùng rễ cây cỏ linh lăng *Medicago sativa* (Bharucha *et al.*, 2013); chiếm 13,9% trong số các vi khuẩn được phân lập từ các cây đại và cây bản địa của Ả Rập Saudi (El-Sayed *et al.*, 2014); chiếm 29,2% trong số các vi khuẩn liên kết cây chè (trà) trồng tại Ấn Độ (Dutta and Thakur, 2017). Các nghiên cứu trên chỉ khảo sát khả năng phân giải chitin ở các dòng tuyển

chọn như là các thí nghiệm định tính (không trình bày kích thước vòng halo). Trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Liên và *ctv.* (2016), tỷ lệ vi khuẩn phân giải chitin chiếm 77,21% trong số các PGPR liên kết cây ớt, với đường kính vòng halo đạt từ 0,17 đến 3,10 cm. Trong nghiên cứu của Lê Minh Tường và *ctv.* (2016), 5 chủng *Streptomyces* có khả năng kháng *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư hại gấc đã biểu thị vòng halo phân giải chitin có đường kính đạt từ 1,4 cm đến 2,7 cm sau 7 ngày nuôi cấy.

Một số tác giả đã báo cáo về tác động của việc bón phân thải hoặc bùn thải đã được ủ dưới dạng phân trộn lên năng suất cây trồng, cấu trúc quần xã vi sinh vật đất, phản ứng của các enzyme tuyệt đối và đặc hiệu có trong đất (Lloret *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017). Qua đó cho thấy bùn thải hoặc phân trộn đã làm thay đổi tính chất lý hoá của đất, từ đó ảnh hưởng đến cấu trúc quần xã vi sinh vật đất, và gây ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme đất, đặc biệt là enzyme đặc hiệu. Như vậy, thành phần nguồn cơ chất bổ sung vào đất đã có tác dụng chọn lọc các quần thể vi khuẩn và kích hoạt việc tổng hợp các enzyme phù hợp nhằm phân giải các cơ chất tương ứng đó.

3.2 Khả năng kháng nấm

Kết quả khảo sát khả năng ức chế nấm của 22 chủng vi khuẩn theo phương pháp cấy kếp cho thấy có 2 chủng có khả năng ức chế *Fusarium* sp. là MH13 và ML17.1 với chỉ số ức chế sự tăng trưởng lần lượt là 52,3% và 29,3% (Hình 2A). Riêng chủng ML17.1 còn có khả năng ức chế được cả 4 chủng nấm chỉ thị còn lại là *Penicillium* sp., *Aspergillus niger*, *A. Flavus*, và *Cladosporium* sp. với chỉ số ức chế sự tăng trưởng lần lượt là 13,0%, 30,3%, 50,7%, và 10,0% (Hình 2B, C, D, E). Hai chủng MH13 và ML17.1 có khả năng phân giải tinh bột, lipid và protein tốt. Riêng chủng MH13 còn có khả năng phân giải chitin. Ngoài cơ chế kháng nấm do enzyme đã đề cập, các nghiên cứu đã cho thấy nhiều PGPR có hoạt động đối kháng nấm bệnh thông qua sự tiết các chất chống nấm như 2, 4-diacetylphloroglucinol, các hợp chất phenazine, các siderophore, hay sự cạnh tranh dinh dưỡng và chỗ ở. Các PGPR còn giúp cây chủ chống lại *Fusarium* sp. và bệnh héo cây khi chúng sở hữu khả năng phân huỷ fusaric acid do nấm này tiết ra (Saharan and Nehra, 2011).



Hình 2: Khả năng ức chế nấm của MH13 và ML17.1 đối với *Fusarium sp.* (A), *Penicillium sp.* (B), *Aspergillus niger* (C), *A. flavus* (D), *Cladosporium sp.* (E)

Vòng tròn chỉ vòng halo được tạo ra bởi vi khuẩn, các dấu mũi tên chỉ đối chứng âm I (nước cất vô trùng; bên trái) và đối chứng âm II (môi trường LB lỏng vô trùng; bên phải).

Dựa trên kết quả khảo sát khả năng phân giải các chất và kháng nấm nêu trên, có 4 chủng đã được chọn lọc để định danh bao gồm ML17.1, MH13, CT5, và TT5 theo phương pháp MALDI-TOF. Phương pháp này là một trong số các phương pháp định danh vi khuẩn đã được nhiều tác giả sử dụng trong lĩnh vực nghiên cứu về PGPR (Tani *et al.*, 2015; Thanh and Tram, 2018). Hai chủng MH13 và ML17.1 tương đồng với loài *Bacillus subtilis* ở độ tin cậy (score value) lần lượt là 2,237 và 2,205. Hai chủng CT5 và TT5 tương đồng với chi *Alcaligenes faecalis* ở độ tin cậy lần lượt là 1,846 và 1,976. Độ tin cậy từ 2,000 đến 3,000 cho kết quả chính xác đến mức “loài”; trong khi giá trị độ tin cậy nằm trong khoảng từ 1,700 đến 1,999 sẽ cho kết quả chính xác đến mức “chi” và tên loài là “có khả năng”. Các kết quả có độ tin cậy dưới 1,700 là không đáng tin cậy. Như vậy, hai chủng CT5 và TT5 có thể được xem là một loài trong chi *Alcaligenes* (*Alcaligenes sp.*) gần với *A. faecalis*.

Đối với hai loài đã được định danh là *Bacillus subtilis* và *Alcaligenes faecalis*, đây là các PGPR đã được báo cáo về khả năng thúc đẩy tăng trưởng thực vật theo cơ chế trực tiếp lẫn gián tiếp (Saharan and Nehra, 2011), Năm 2017, Mardanov *et al.* đã phân lập được *B. subtilis* ở đất vùng rễ cây cà chua trồng ở Nga. Qua nghiên cứu cho thấy, loài này có khả năng kháng nấm bệnh, sản xuất siderophore, tiết enzyme protease và cellulase, sản xuất HCN. Ranjbariyan *et al.* (2011) cũng đã phân lập được *B. subtilis* có khả năng kiểm soát sự phát triển của *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium marneffei*, và *Fusarium moniliforme* từ đất vùng Tehran, Iran. Đối với *Alcaligenes faecalis*, đây là một loài PGPR có khả năng sản xuất các enzyme lipase, cellulase, chitinase, sinh tổng hợp IAA (Ghodsalavi *et al.*,

2013). Sayyed *et al.* (2010) cũng đã phân lập được *A. faecalis* từ đất vùng rễ cây đậu phộng trồng ở Ấn Độ. Kết quả nghiên cứu còn cho thấy đây vi khuẩn này có khả năng sản xuất siderophore tốt, giúp gia tăng sự hấp thu sắt cho cây trồng.

4 KẾT LUẬN

Trong 22 chủng PGPR liên kết cây tiêu đã xác định được 21 chủng có khả năng phân giải tinh bột từ 0,2 đến 1,13 cm; 10 chủng có khả năng phân giải lipid từ 0,2 đến 0,6 cm; 20 chủng có khả năng phân giải protein từ 0,2 đến 1,47 cm; và 12 chủng có khả năng phân giải chitin từ 0,2 đến 0,53 cm. Có 2 chủng biểu thị khả năng kháng nấm. Trong đó, chủng MH13 có khả năng ức chế *Fusarium sp.* với chỉ số ức chế là 52,3%. Chủng ML17.1 có khả năng ức chế cả 5 chủng nấm chỉ thị gồm *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus niger*, *A. Flavus*, và *Cladosporium sp.* với chỉ số ức chế lần lượt là 29,3%, 13,0%, 30,3%, 50,7%, và 10,0%. Hai chủng ML17.1 và MH13 đã được nhận diện là *Bacillus subtilis*; và 2 chủng CT5 và TT5 đã được nhận diện là *Alcaligenes faecalis*. Đây là các loài PGPR có hoạt tính thúc đẩy tăng trưởng thực vật và đối kháng sinh học đã được báo cáo.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn đến Trường Đại học Sài Gòn; Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP. Hồ Chí Minh; Khoa Dược, Trường Đại học Y dược TP. Hồ Chí Minh; và đồng nghiệp Trương Thị Phương về sự hỗ trợ trong quá trình thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ahemad, M. and Kibret, M., 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting

- rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University-Science*. 26(1): 1-20.
- Azman, N.A., Sijam, K., Hata, E.M., Othman, R., and Saud, H.M., 2017. Screening of bacteria as antagonist against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the causal agent of bacterial leaf blight of paddy and as plant growth promoter. *Journal of Experimental Agriculture International*. 16(4): 1-15.
- Balouiri, M., Sadiki, M., and Ibsouda, S.K., 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2): 71-79.
- Bertani, G., 1951. Studies on Lysogenesis I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 62(3): 293-300.
- Bharucha, U.D., Patel, K.C., and Trivedi, U.B., 2013. *In vitro* screening of isolates for its plant growth promoting activities from the rhizosphere of Alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 3(5): 79-88.
- Choubane, S., Cheba, B.A., and Benourrad, A., 2016. Screening and phenotypic diversity of amylase producing rhizospheric bacteria from some North African plants. *Procedia Technology*. 22 (2016): 1197-1204.
- Davison, S.P., Santangelo, J.D., Reid, S.J., and Woods, D.R., 1995. A *Clostridium acetobutylicum* regulator gene (regA) affecting amylase production in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*. 141(4): 989-996.
- Dhawale, M.R., Wilson, J.J., Khachatourians, G.G., and Mike, W., 1982. Ingledew improved method for detection of starch hydrolysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 44(3): 747-750.
- Dutta, J., and Thakur, D., 2017. Evaluation of multifarious plant growth promoting traits, antagonistic potential and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with commercial tea plants grown in Darjeeling, India. *PLoS One*. 12(8):e0182302. doi: 10.1371/journal.pone.0182302. eCollection. Aug 3, 2017.
- Dương Minh Lam và Vũ Thị Lý, 2012. Nghiên cứu và tuyển chọn chủng *Bacillus* sinh lipase kiềm từ rừng ngập mặn. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*. 50(2): 259-266.
- El-Sayed, W.S., Akhka, A., El-Naggar, M.Y., and Elbadry, M., 2014. *In vitro* antagonistic activity, plant growth promoting traits and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with wild plants grown in arid soil. *Frontiers in Microbiology*. 5: 651. doi: 10.3389/fmicb.2014.00651.
- Eugenia, G., Lechuga, O., Zapata, I.Q., and Nino, K.A., 2016. Detection of extracellular enzymatic activity in microorganisms isolated from waste vegetable oil contaminated soil using plate methodologies. *African Journal of Biotechnology*. 15(11): 408-416.
- Feofilova, E.P., Sergeeva, Y.E., Mysyakina, I.S., and Bokareva, D.A., 2015. Lipid composition in cell walls and in mycelial and spore cells of mycelial fungi. *Microbiology*. 84(20): 170-176.
- Freire, F.C.O., Kozakiewicz, Z., and Paterson, R.R.M., 2000. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*. 149(1): 13-19.
- Geetha, K., Venkatesham, E., Hindumathi, A., and Bhadraiah, B., 2014. Isolation, screening and characterization of plant growth promoting bacteria and their effect on *Vigna radita* (L.) R. Wilczek. *Original Research Article*. 6: 799-809.
- Ghodsolavi, B., Ahmadzade, M. Soleimani, M., Madloo, P.B., and Taghizad-Farid, R., 2013. Isolation and characterization of rhizobacteria and their effects on root extracts of *Valeriana officinalis*. *Australian Journal of Crop Science*. 7(3): 338-344.
- Gianfreda, L., 2015. Enzymes of importance to rhizosphere processes. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 15(2): 283-306.
- Gupta, G., Pairhar, S.S., Ahirwar, N.K., Snehi, S.K., and Singh, V., 2015. Plant - growth promoting rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*. 7(2): 96-102.
- Hashem, M, and Alamri, S., 2010. Contamination of common spices in Saudi Arabia markets with potential mycotoxin-producing fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 17(2): 167-75.
- Hà Thanh Toàn, Mai Thu Thảo, Nguyễn Thu Phương, Trần Lê Kim Ngân, Bùi Thế Vinh, và Cao Ngọc Diệp, 2008. Phân lập vi khuẩn phân giải cellulose, tinh bột và protein trong nước rỉ từ bãi rác ở thành phố Cần Thơ. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 10: 195-202.
- Hsu, S., and Lockwood, J., 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Journal of Applied Microbiology*. 29: 422-426.
- Jadhav, H.P., Shaikh, S.S., and Sayyed, R.Z., 2017. Role of hydrolytic enzymes of rhizoflora in biocontrol of fungal phytopathogens: An overview. In: Mehnaz, S. (Ed.). *Rhizotrophs: Plant growth promotion to bioremediation*. Springer Nature Singapore Pte Ltd, pp. 183-283.
- Lê Minh Tường, Phạm Tuấn Vũ, và Võ Kim Phương, 2016. Định danh và khảo sát một số đặc tính của xạ khuẩn có triển vọng trong phòng trị bệnh thán thư hại gạo. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 14(9): 1331-1340.

- Liu, X., Guo, K., Huang, L., Ji, Z., Jiang, H. Hu, L., and Zhang, J., 2017. Responses of absolute and specific enzyme activity to consecutive application of composted sewage sludge in a Fluventic Ustochrept. PLoS One. 12(5): e0177796. doi: 10.1371/journal.pone.0177796. May 17, 2017.
- Lloret, E., Pascual, J.A., Elm, B., *et al.*, 2016. Sewage sludge addition modifies soil microbial communities and plant performance depending on the sludge stabilization process. Applied Soil Ecology. 101: 37-46.
- Longo, L.V.G., Nakayasu, E.S. Gazos-Lopes, F., *et al.*, 2013. Characterization of Cell Wall Lipids from the Pathogenic Phase of *Paracoccidioides brasiliensis* Cultivated in the Presence or Absence of Human Plasma. PLoS ONE 8(5): e63372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063372>
- Mandee, Q.A., 2005. Fungal contamination of some imported spices. Mycopathologia. 159(2): 291-298.
- Mardanov, A.M., Hadieva, G.F., Lutfullin, M.T., *et al.*, 2017. *Bacillus subtilis* strains with antifungal activity against the phytopathogenic fungi. 37 Agricultural Sciences. 8: 1-20.
- Martínez-Viveros, O., Jorquera, M.A., Crowley, D.E., Gajardo, G., and Mora, M.L., 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. Journal of Soil Science and Plant Nutrition. 10(3): 293-319.
- Nguyễn Thị Liên, Nguyễn Thị Yến Như, Trần Thị Xuân Mai, và Nguyễn Thị Pha, 2016. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn từ đất vùng rễ ớt có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên ớt. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 47b: 16-23.
- Ranjbariyan, A.R., Ghahfarokhi, M.S., Kalantari, S., and Razzaghi-Abyaneh, M., 2011. Molecular identification of antagonistic bacteria from Tehran soils and avaluation of their inhibitory activities toward pathogenic fungi. Iranian Journal of Microbiology. 3(3): 140-146.
- Rella, A., Farnoud, A.M., and Del Poeta, M., 2016. Plasma membrane lipids and their role in fungal virulence. Progress in Lipid Research. 61: 63-72.
- Saharan, B.S., and Nehra, V., 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. Life Sciences and Medicine Research. 21: 1-30.
- Sayed, R.Z., Gangurdem, N.S., Patel, P.R., Joshi, S.A., and Chincholkar, S.B., 2010. Siderophore production by *Alcaligenes faecalis* and its application for growth promotion in *Aerachis hypogaea*. Indian Journal Biotechnology. 9: 302-307.
- Shrivastava, G.P., Kumar, R., and Yandigeri, M.S., 2017. *In vitro* biocontrol activity of halotolerant *Streptomyces aureofaciens* K20: A potent antagonist against *Macrophomina phaseolina* (Tassi). Saudi Journal of Biological Sciences. 24: 192-199.
- Sokol, P.A., Ohman, D.E., and Iglewski, B.H., 1979. A more sensitive plate assay for detection of protease production by *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Clinical Microbiology. 9(4): 538-540.
- Tani, A., Sahin, N., Yoshiko, F., Kato, A., Sato, K., and Kimbara, K., 2015. Methylobacterium species promoting rice and barley growth and interaction specificity revealed with Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS) analysis. PLoS ONE. 10(6): e0129509. doi: 10.1371/journal.pone.0129509. eCollection 2015. Jun 8, 2015.
- Thanh, D.T.N. and Tram, D.T.T., 2018. Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria in black pepper (*Piper nigrum* L.) cultivated in Chon Thanh and Loc Ninh districts of Binh Phuoc province, Vietnam. International Journal of Innovations in Engineering and Technology. 10(1): 1-10. <http://dx.doi.org/10.21172/ijiet.101.01>
- Thuy, T.T.T., Chi, N.T.M., Yen, N.T., Anh, L.T.N., Te, L.L., and De Waele, D., 2013. Fungi associated with black pepper plants in Quang Tri province (Vietnam), and interaction between *Meloidogyne incognita* and *Fusarium solani*. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 46(4): 470-482.
- Toma, F.M., and Abdulla, N.Q.F, 2013. Isolation and identification of fungi from spices and medicinal plants. Research Journal of Environmental and Earth Sciences. 5(3): 131-138.
- Tu, N., Vinh, D.T.T., and Thu, L., 2015. Amylase producing *Bacillus megaterium* T04 isolated in Rach Lang stream of Vietnam. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 5(10): 12-15.
- Ventorino, V., Ionata, E., Birolo, L., *et al.*, 2016. Lignocellulose-adapted endo-cellulase producing *Streptomyces* strains for bioconversion of cellulose-based materials. Frontiers in Microbiology. 7: 2061. doi: 10.3389/fmicb.2016.02061
- Wang, W., Wu, Z., He, Y., Huang, Y., Li, X., and Ye, B.C., 2018. Plant growth promotion and alleviation of salinity stress in *Capsicum annum* L. by *Bacillus* isolated from saline soil in Xinjiang. Ecotoxicology and Environmental Safety. 164: 520-529.
- Yap, C.C., 2012. Rhizobacteria of pepper (*Piper nigrum*) and their antifungal activities. African Journal of Microbiology Research. 6(19): 4185-4193.
- Yazdanparast, R., 1993. Screening for starch-hydrolysing bacteria. Medical Journal of The Islamic Republic of Iran (MJIRI). 7(1): 35-41.