

**ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN**

TRẦN BẢO TRÂM

**NGHIÊN CỨU QUẦN XÃ VI SINH VẬT ĐẤT VÙNG RỄ CỦA
CÂY SÂM NGỌC LINH (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) VÀ
MỐI LIÊN QUAN VỚI MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM CỦA CÂY SÂM**

**Chuyên ngành: Vi sinh vật học
Mã số: 62420107**

**DỰ THẢO
TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ VI SINH VẬT HỌC**

Hà Nội – 2018

Trung tâm Sinh học Thực nghiệm – Viện Ứng dụng Công nghệ
và Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQGHN

Người hướng dẫn khoa học: 1. TS. Phạm Hương Sơn
2. TS. Phạm Thế Hải

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng cấp Đại học Quốc
gia chấm luận án tiến sĩ họp tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên
vào hồigiờ.....ngày.....tháng.....năm 20...

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam;
- Trung tâm Thông tin – Thư viện, Đại học Quốc gia Hà Nội

MỞ ĐẦU

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâm Ngọc Linh hay sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) là loài đặc hữu của Việt Nam, phân bố rất hẹp trên vùng có vĩ độ thấp (15° kinh độ đông), ở độ cao trên 1.500m thuộc vùng núi Ngọc Linh thuộc 2 tỉnh Kon Tum và Quảng Nam. Tác dụng dược lý của sâm Ngọc Linh cũng đã được nghiên cứu cho thấy làm giảm đáng kể rối loạn liên quan đến stress và thử nghiệm lâm sàng trên chuột giúp ức chế khối u trên da và gan, hiệu quả lâm sàng khẳng định giá trị của cây sâm Ngọc Linh sánh ngang với Nhân sâm (*Panax ginseng*). Do có giá trị làm dược liệu cao trên thị trường nên nhu cầu sử dụng và khai thác sâm Ngọc Linh tăng mạnh đã làm giảm đáng kể lượng sâm mọc tự nhiên.

Vi sinh vật đất là một trong những phần quan trọng nhất của hệ sinh thái đất và được coi như một thành phần tích hợp chất lượng đất tham gia vào nhiều quá trình sinh địa hóa. Vi sinh vật đất có tầm quan trọng cơ bản về năng lượng và chu kỳ vật chất, cấu trúc đất, cân bằng hệ sinh thái vi sinh vật đất ... Vì vậy nghiên cứu quần xã vi sinh vật trong đất có ý nghĩa quan trọng để hiểu được cơ chế cho việc tái canh cây trồng lâu năm như cây sâm Ngọc Linh đang là hướng nghiên cứu mới ở Việt Nam cũng như trên thế giới, kết quả bước đầu thu được sẽ là cơ sở dữ liệu đóng góp vào nguồn dữ liệu khoa học chung, góp phần phục vụ cho các nghiên cứu và ứng dụng liên quan đến sâm Ngọc Linh ở Việt Nam và trên thế giới.

2. Mục tiêu nghiên cứu của đề tài luận án

Đánh giá mức độ đa dạng quần xã vi sinh vật trong đất trồng Sâm Ngọc Linh ở Quảng Nam. Trên cơ sở đó phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn có hoạt tính sinh học quý từ đất trồng sâm Ngọc Linh ở Quảng Nam như: phân giải phosphate khó tan, sinh chất kích thích sinh trưởng IAA để định hướng trong sản xuất chế phẩm phân bón vi sinh; chuyển hóa ginsenoside ứng dụng trong chế biến dược, mỹ phẩm. Và phát hiện loài mới phân lập từ đất trồng sâm Ngọc Linh ở Quảng Nam.

3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Là nghiên cứu mới đánh giá về mức độ đa dạng của quần xã vi sinh vật đất trồng loài sâm Ngọc Linh đặc hữu của Việt Nam - nguồn cơ sở

dữ liệu đóng góp cho khoa học trong nghiên cứu di thực cũng như trong thực tiễn sản xuất phát triển vùng trồng sâm.

Phát hiện và công bố 01 loài vi khuẩn mới trên thế giới, góp phần gia tăng danh mục loài vi khuẩn nuôi cấy phát hiện được có ý nghĩa cho khoa học.

Tuyển chọn được 07 chủng vi khuẩn có hoạt tính phân giải phosphate; 07 chủng vi khuẩn có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng IAA có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất phân bón vi sinh; và 01 chủng vi khuẩn có hoạt tính chuyển hóa ginsenoside Rb1 có khả năng ứng dụng trong chế biến và sản xuất sâm.

4. Những điểm mới của luận án

Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam đánh giá mức độ đa dạng của quần xã vi sinh vật trong đất trồng sâm Ngọc Linh và phân lập nhận diện được 07 chủng vi khuẩn có hoạt tính phân giải phosphate; 07 chủng vi khuẩn có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng IAA; 01 chủng vi khuẩn có hoạt tính chuyển hóa ginsenoside Rb1.

Đã công bố 01 loài vi khuẩn mới *Paracoccus panacisoli* sp. nov. DCY94^T trên tạp chí IJSEM (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology).

5. Bố cục của luận án

Toàn bộ luận án bao gồm 160 trang, 16 hình, 25 bảng gồm các phần:

- Mở đầu: 4 trang
- Chương 1: Tổng quan tài liệu: 55 trang
- Chương 2: Vật liệu và phương pháp nghiên cứu: 16 trang
- Chương 3: Kết quả nghiên cứu và thảo luận: 53 trang
- Kết luận và kiến nghị: 2 trang.
- Tài liệu tham khảo: 31 trang

CHƯƠNG 1 – TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1 GIỚI THIỆU ĐẤT TRỒNG SÂM

Các dãy núi trong vùng Ngọc Linh thường là núi đá Granit và diệp thạch. Đất chủ yếu là đất sét xám tro hoặc xám vàng nhạt trộn với lớp mùn hữu cơ màu đen trên bề mặt khá dày, pH thấp (3,8 - 4,4). Theo hệ phân loại Việt Nam, đây là đất mùn vàng đỏ trên núi cao, còn theo phân loại của của FAO-UNESCO-WRB thì đây là đất xám giàu mùn (humic acrisol).

Sâm Ngọc Linh là loại cây thân thảo đặc biệt ưa ẩm và ưa bóng, thường mọc rải rác hoặc tập trung thành từng đám nhỏ dưới tán rừng kín thường xanh lá rộng, đôi khi xen cả cây lá kim. Trong vùng phân bố gặp sâm mọc chủ yếu ở hai bên sườn suối, nơi có độ mùn dày. Bộ rễ phát triển tập trung trong tầng mùn lớp đất màu giàu dinh dưỡng. Hệ thực vật vùng núi Ngọc Linh là sự phân bố hoàn hảo của các họ thực vật hỗ trợ cho cây Sâm Ngọc Linh sinh trưởng và phát triển - nhờ có tán rừng mà Sâm Ngọc Linh được bảo vệ khỏi mưa bão, ánh sáng trực xạ... Với sự đa dạng về thành phần thực vật đã phát hiện cho thấy vùng núi Ngọc Linh có thể là điểm hội tụ của nhiều luồng di trú khác nhau, ngoài ra đây cũng là vùng mà họ nhân sâm phát triển mạnh với số loài và số cá thể phong phú.

1.2 HỆ VI SINH VẬT TRONG ĐẤT TRỒNG SÂM

- Trong đất có rất nhiều loài vi sinh vật có những chức năng khác nhau, sự phân bố của chúng phụ thuộc vào điều kiện dinh dưỡng, nước, pH, độ sâu, mức độ thoáng khí, chế độ canh tác, địa hình của đất và thảm thực vật... Vi sinh vật đất, đặc biệt đất vùng rễ là nơi thực vật và vi sinh vật tương tác với nhau, quần xã vi khuẩn vùng rễ được cho là hoạt động mạnh và có vai trò quan trọng

- Hàn Quốc là một trong những nhà sản xuất Nhân sâm hàng đầu thế giới, hiện nay các nghiên cứu hệ vi sinh vật trong đất trồng sâm chủ yếu được thực hiện bởi các nhà nghiên cứu Hàn Quốc. Nghiên cứu cho thấy các mẫu đất trồng Nhân sâm có các quần thể vi sinh vật rất đa dạng, tùy thuộc vào thổ nhưỡng từng vùng, mẫu đất trồng Nhân sâm tại miền bắc Hàn Quốc cho thấy các quần thể vi khuẩn chủ yếu được tìm thấy thuộc các nhóm *Acidobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* và *Sphingobacteria*. Trong khi đó quần xã vi khuẩn của đất vùng rễ Nhân sâm trồng tại Okcheon cho thấy ngành *Actinobacteria* chiếm ưu thế nhất, tiếp đó là các ngành *Proteobacteria*, *Spingomonadales*, *Rhizobiales*

1.3 PHÂN TÍCH ĐA DẠNG QUẦN XÃ VI SINH VẬT TRONG ĐẤT TRỒNG SÂM

- Các phương pháp truyền thống và sinh hóa: Đây là những phương pháp có ý nghĩa cao trong nghiên cứu đa dạng vi sinh vật. Để phân biệt các loại vi sinh vật khác nhau người ta có thể dựa vào đặc điểm trao đổi chất của chúng như khả năng sử dụng các nguồn cacbon, nitơ và năng lượng khác nhau trong sinh trưởng.

- Các phương pháp sinh học phân tử sử dụng trong nghiên cứu đa dạng vi sinh vật: . Nghiên cứu gần đây về tính đa dạng của vi sinh vật tập trung vào việc sử dụng các phương pháp không nuôi cấy, tách chiết DNA trực tiếp từ mẫu đất và nhân dòng các đoạn trình tự gen đặc hiệu hoặc các đoạn gen 16S rRNA để xây dựng dữ liệu về đa dạng sinh học của các mẫu môi trường

- Phân tích di truyền đa dạng quần xã vi khuẩn bằng kỹ thuật metagenomic: Thông qua việc giải trình tự toàn bộ genome, là một phương pháp hiệu quả cho phép nghiên cứu độ đa dạng loài cũng như khai thác các enzym với hoạt tính xúc tác sinh học mới của các vi khuẩn không nuôi cấy được từ hệ sinh thái trong các môi trường tự nhiên

1.4 PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH LOÀI MỚI

Kết quả thống kê tính đến tháng 10/2018 đã có 184 loài vi khuẩn mới phân lập từ đất trồng Nhân sâm (chi *Panax*), trong số 184 loài mới đã công bố có tới 173 loài được phân lập từ đất trồng sâm ở Hàn Quốc, 9 loài được phân lập từ đất trồng sâm ở Trung Quốc và 2 loài được phân lập từ đất trồng sâm ở Việt Nam. Các loài vi khuẩn mới phân lập được từ đất trồng sâm đã công bố được phân loại và xếp nhóm vào 5 ngành lớn, bao gồm: *Proteobacteria* (68 loài – 36,96%), *Bacteroidetes* (52 loài – 28,26%), *Actinobacteria* (39 loài – 21,2%), *Firmicutes* (24 loài – 13,04%) và *Armatimonadetes* (01 loài - 0,54%). Trong đó, các ngành *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* và *Actinobacteria* có số loài được phát hiện nhiều nhất và đa dạng nhất, thể hiện rõ ràng ở khả năng có thể nuôi cấy trên nhiều loại môi trường khác nhau.

Để xác định được loài vi khuẩn mới từ đất trồng sâm, các nghiên cứu đã sử dụng phương pháp tiếp cận nhiều pha (polyphasic approach) để phân loại chính xác chủng phân lập. Sự kết hợp các kết quả nghiên cứu về đặc điểm hình thái khuẩn lạc/tế bào, đặc điểm sinh hóa, chuyển hóa, giải mã trình tự gen 16S rRNA... là cơ sở xác định loài mới phân lập được.

CHƯƠNG II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 VẬT LIỆU

Mẫu đất thu tại Khu vực trồng sâm Ngọc Linh dưới tán rừng tự nhiên tại Trạm thực vật Trà linh thuộc xã Trà Linh, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam. Ở độ cao: 1.835m, tọa độ: 15° 01' 54'' N, 107° 58' 45'' E.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phương pháp phân tích thành phần hóa lý của đất theo TCVN

- Xác định độ ẩm theo TCVN 6648:2000
- Xác định pH_{KCl} theo TCVN 5979: 2007
- Xác định cacbon hữu cơ tổng số theo TCVN 4050:1985
- Xác định axit humic theo phương pháp Cononove- Bebricov
- Xác định nitơ tổng số theo TCVN 6498:1999
- Xác định P tổng số theo TCVN 4052:1985
- Xác định phospho dễ tiêu theo TCVN 5256:1990
- Xác định kali tổng số theo TCVN 4053:1985
- Xác định kali dễ tiêu theo TCVN 8569:2010
- Xác định thành phần cơ giới theo TCVN 8567-2010

2.2.2 Phương pháp phân tích đa dạng vi sinh vật:

- Xác định thành phần, số lượng các nhóm VSV nuôi cấy: vi khuẩn trên môi trường MPA, xạ khuẩn trên môi trường Gause, nấm mốc trên môi trường Czapek, vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose trên môi trường Hutchinson, vi sinh vật có khả năng phân giải phosphate khó tan trên môi trường NBRIP, khả năng cố định nitơ trên môi trường Thompson-Skerman,

- Xác định đa dạng quần xã vi sinh vật bằng phương pháp metagenomics: Phương pháp giải trình tự thể hệ mới (metagenomics) được thực hiện theo kỹ thuật xác định trình tự đoạn nhỏ (shotgun sequencing).

2.2.3 Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có hoạt tính sinh học:

- Phân giải phosphate khó tan: Các chủng vi khuẩn phân lập được nuôi trong bình chứa 50 ml môi trường NBRIP ở 30 °C, trong 5 ngày, chế độ lắc 150 vòng/phút. Tiến hành định lượng phosphate hòa tan: ly tâm dịch nuôi cấy với tốc độ 5000 vòng/phút trong 5 phút, hút 1 ml dịch làm phản ứng xanh molipdat và đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 690 nm, xác định hàm lượng P_2O_5 dựa vào đường chuẩn KH_2PO_4 .

- Sinh tổng hợp IAA: Hàm lượng IAA được tạo ra trong dịch lên men vi khuẩn được xác định bằng phương pháp so màu sử dụng thuốc thử Van Urk Salkowski:

- Chuyển hóa ginsenoside: Phân lập vi khuẩn sinh β -glucosidase trên môi trường thạch Esculin-R2A, định tính bằng TLC, nghiên cứu ảnh hưởng nhiệt độ, pH, thời gian phản ứng đến hoạt tính enzyme β -glucosidase.

2.2.4 Phương pháp xác định loài mới:

- Dựa vào đặc điểm khuẩn lạc, tế bào: quan sát bằng mắt thường, dưới kính hiển vi
- Đặc điểm sinh hóa: Sử dụng Kit API 20NE, ID 32GN, API ZYM và API 50CH strip (bioMe'rieux).
- Đặc điểm nuôi cấy: sinh trưởng, ảnh hưởng nhiệt độ, pH, môi trường, nồng độ muối đến khả năng phát triển của vi khuẩn
- Định danh: Gen ARN ribosome 16S được khuếch đại và giải trình tự từ ADN của chủng phân lập bằng cặp mồi dùng cho vi khuẩn 27F, 518F, 800R và 1492R
- *Xác định thành phần G+C của ADN*: Các nucleosides được phát hiện bởi hệ thống HPLC (NS-4000; Futecs) sử dụng cột YMC-Triart C18
- Đánh giá loài mới: Sử dụng thí nghiệm lai ADN-ADN. Thí nghiệm lai được tiến hành bằng việc sử dụng đầu dò ADN được đánh dấu với photobiotin và các giếng hệ số pha loãng nhỏ

2.2.5 Phương pháp xử lý số liệu

- *Xử lý số liệu phân tích thổ nhưỡng, đếm số lượng tế bào (khuẩn lạc)*: Số liệu thu được trong đề tài được phân tích thống kê ANOVA (Analysis of Variance) dưới bố trí thí nghiệm hoàn toàn ngẫu nhiên CRD (Completely Randomized Design). Tất cả thí nghiệm được tiến hành 3 lần độc lập.

- *Xử lý số liệu phân tích đa dạng quần xã vi sinh vật*: Sử dụng phần mềm CLcommunity (Chunlab, Inc., Seoul, Hàn Quốc), phần mềm SeqMan và BioEdit

CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 ĐÁNH GIÁ ĐẶC ĐIỂM THỔ NHƯỞNG VÙNG TRỒNG SÂM NGỌC LINH Ở QUẢNG NAM

Kết quả phân tích một số tính chất vật lý, cơ giới và hóa học của các mẫu đất thu được tại vùng trồng Sâm Ngọc Linh ở Quảng Nam thu được như sau:

Bảng 3.1 Kết quả phân tích đặc điểm thổ nhưỡng vùng trồng Sâm Ngọc
Linh ở Quảng Nam

TT	Chỉ tiêu phân tích	Đơn vị đo	Hàm lượng
1	Màu sắc, trạng thái	-	Nâu đen, tơi xốp
2	Độ ẩm	%	55,08 ± 1,2
3	Độ xốp	%	49,06 ± 2,11
4	Thành phần cơ giới		
	<i>Cát thô</i>	%	23,32 ± 1,31
	<i>Cát mịn</i>	%	51,35 ± 1,12
	<i>Limon</i>	%	9,0 ± 0,63
	<i>Sét</i>	%	16,08 ± 1,08
5	pH _{KCl}	-	4,3 ± 0,3
6	Cacbon hữu cơ tổng số (OM)	%	19,04 ± 1,34
7	Axit humic	%	1,4 ± 0,13
8	Nitơ tổng	% N	0,65 ± 0,03
9	Photpho tổng số	% P ₂ O ₅	0,52 ± 0,02
10	Photpho dễ tiêu	mgP ₂ O ₅ /100g	6,09 ± 0,92
11	Kali tổng số	% K ₂ O	0,23 ± 0,03
12	Kali dễ tiêu	mgK ₂ O/100g	15,97 ± 1,23

Kết quả phân tích (Bảng 3.1) cho thấy đất ở khu vực này thuộc loại đất giàu mùn, chất hữu cơ; hàm lượng đạm tổng số, lân và kali dễ tiêu tương đối cao. Hàm lượng mùn và axit humic trong đất trồng sâm khá cao, cao hơn so với vùng phân bố các loài khác trong chi Nhân sâm trên thế giới: C-6,16%, N-0,44% (Kim *et al.*, 2015), thành phần lân dễ tiêu đạt 6,09 mg/100g, cao hơn nhiều so với chất lượng đất rừng tự nhiên trồng Sâm ở Hàn Quốc (28 mg/kg) và đạt mức giàu kali (> 15mg K₂O/100 g).

3.2 PHÂN TÍCH ĐA DẠNG QUẦN XÃ VI SINH VẬT ĐẤT TRỒNG SÂM NGỌC LINH Ở QUẢNG NAM

3.2.1 Phân tích đa dạng các nhóm vi sinh vật bằng phương pháp nuôi cấy

Sự phân bố và biến động mật độ của các nhóm vi sinh vật trong đất phụ thuộc vào không gian, bề mặt và chiều sâu của tầng đất, mùa và loại/vùng đất. Do vậy trong nghiên cứu này đã tiến hành xác định thành phần và số lượng vi sinh vật nuôi cấy trong tầng đất mặt ở độ sâu khác nhau cũng như theo dõi sự biến động mật độ vi sinh vật theo mùa, kết quả thu được như ở Bảng 3.2.

Bảng 3.2 Số lượng các nhóm vi sinh vật trong đất trồng Sâm Ngọc Linh
ĐVT: CFU/g

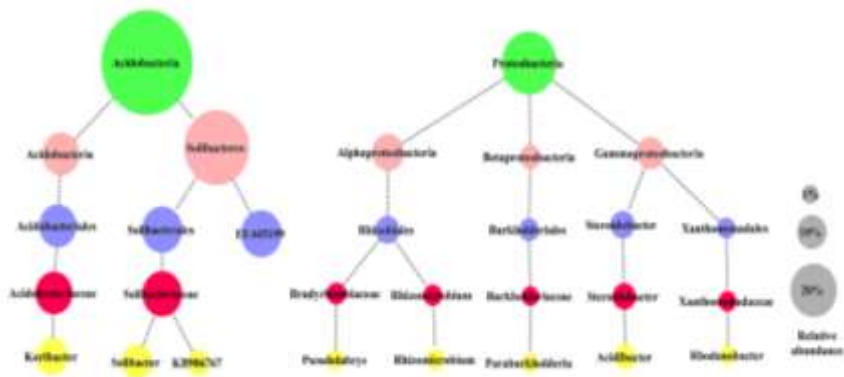
Mùa	Độ sâu lấy mẫu (cm)	Vi khuẩn	Xạ khuẩn	Nấm mốc
Khô	0-15	$(5,4 \pm 0,6) \times 10^6$	$(4,8 \pm 0,6) \times 10^5$	$(6,2 \pm 0,5) \times 10^4$
	15-30	$(1,7 \pm 0,5) \times 10^5$	$(8,9 \pm 0,4) \times 10^3$	$(7,4 \pm 0,2) \times 10^2$
Mưa	0-15	$(6,0 \pm 0,2) \times 10^6$	$(5,5 \pm 0,6) \times 10^5$	$(6,1 \pm 0,5) \times 10^4$
	15-30	$(3,5 \pm 0,4) \times 10^5$	$(4,6 \pm 0,5) \times 10^3$	$(4,4 \pm 0,2) \times 10^2$

Kết quả cho thấy với mẫu đất thu vào thời điểm mùa mưa và mùa khô đều có số lượng vi sinh vật trong từng nhóm ở độ sâu 0-15cm cao hơn so với ở độ sâu 15-30cm, kết quả này hoàn toàn phù hợp về mặt lí thuyết vì ở lớp đất trên có độ thoáng khí tốt, độ ẩm và pH thích hợp, các chất dinh dưỡng tích lũy nhiều và các quá trình chuyển hóa quan trọng của rễ cây chủ yếu xảy ra ở đây.

Kết quả phân tích đất trồng Sâm Ngọc Linh cho thấy số lượng vi khuẩn chiếm trên 90% tổng số lượng các vi sinh vật (10^5 - 10^6 CFU/g), xạ khuẩn chiếm khoảng 6-8% và nấm dưới 1%.

3.2.2 Phân tích đa dạng di truyền quần xã vi khuẩn

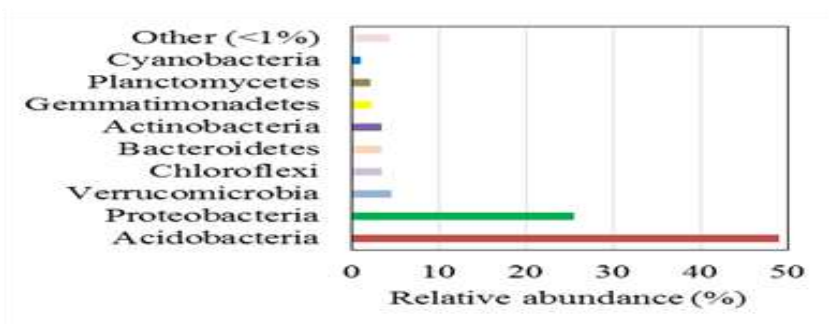
Dữ liệu giải trình tự Miseq cho biết sự đa dạng vi khuẩn trong mẫu đất bao gồm 32 ngành, 81 lớp, 151 bộ, 310 họ, 652 chi, và 1833 loài. Hình 3.2 chỉ ra các ngành vi khuẩn chiếm chủ yếu là ngành Acidobacteria (độ giàu tương đối, 49,07%) và Proteobacteria (25,57%), tiếp theo là ngành Verrucomicrobia 4,64%); Chloroflexi (3,54%), Bacteroidetes (3,51%), Actinobacteria (3,44%); Gemmatimonadetes (2,41%); Planctomycetes (2,22%); Cyanobacteria (1,15%). Tất cả các ngành còn lại đều được tìm thấy ở mức <1% trong mẫu.



Hình 3.2 Mức độ đa dạng tương đối của vi khuẩn trong đất trồng Sâm Ngọc Linh.

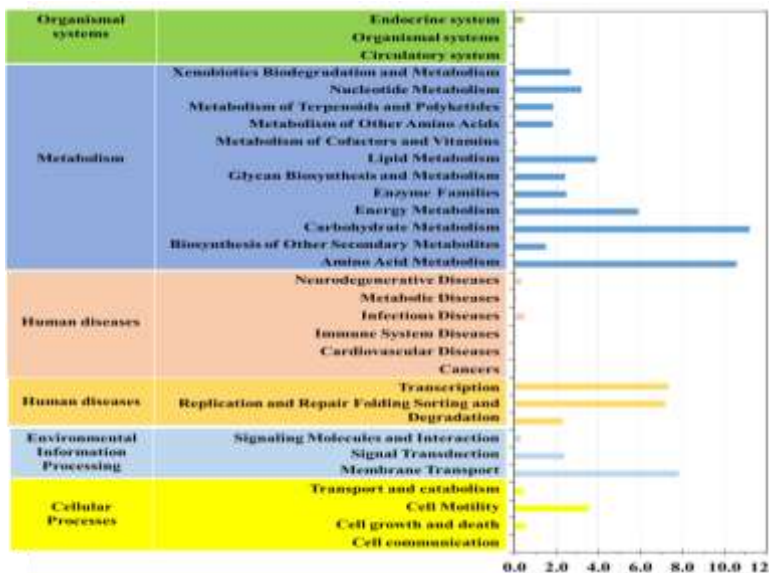
(Sự đa dạng tương đối được tính là phần trăm của tổng số các loài vi khuẩn quan sát trên mỗi mẫu. Một số loại khác chiếm tỷ lệ độ đọc <1% trên tổng số các độ đọc)

Kết quả nghiên cứu cho thấy, các ngành vi khuẩn *Acidobacteria* và *Proteobacteria* chiếm phần lớn trong mẫu đất, tương tự như nghiên cứu trước đây về đất trồng nhân sâm của Hàn Quốc.



Hình 3.3 Các thành phần chính của ngành *Acidobacteria* và *Proteobacteria* (Các vòng tròn màu xanh lá, hồng nhạt, xanh cobal nhạt, đỏ và hồng cho biết sự phân loại ở các cấp độ ngành, lớp, bộ, họ, chi tương ứng. Kích thước các vòng tròn đại diện cho sự phong phú tương đối của taxon)

- Dự đoán hệ gen quần xã



Hình 3.4 Mức độ đa dạng tương đối của các con đường KEGG ở cấp độ 2 được mã hóa trong quần xã vi khuẩn có trong đất trồng nhân sâm Việt Nam

Mức độ đa dạng tương đối của các con đường KEGG ở cấp độ 2 được mã hóa trong vi sinh vật có trong đất trồng nhân sâm Việt Nam cho thấy sự chuyển hóa carbohydrate, sự chuyển hóa axit amin, vận chuyển qua màng tế bào; sao chép và sửa chữa, chuyển hóa năng lượng là những hoạt động phổ biến nhất trong hệ vi sinh vật (Hình 3.4).

3.3 PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC NHÓM VI KHUẨN CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC TỪ ĐẤT TRỒNG SÂM NGỌC LINH Ở QUẢNG NAM

3.3.1 Phân tích đa dạng các nhóm vi khuẩn có hoạt tính sinh học bằng phương pháp nuôi cấy

Vi sinh vật đất đóng vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa các chất hữu cơ và vô cơ trong đất, tạo ra hàng loạt các sản phẩm của hoạt động sống, trong đó có các hoạt chất sinh học quan trọng như enzyme, vitamin, kháng sinh... Kết quả xác định thành phần và số lượng vi các nhóm vi khuẩn chuyển hóa theo mùa như ở Bảng 3.5.

Bảng 3.5 Thành phần và số lượng các nhóm vi sinh vật chuyển hóa trong đất trồng Sâm Ngọc Linh

DVT: CFU/g

Mùa	Độ sâu lấy mẫu (cm)	VSV phân giải cellulose	VSV phân giải phosphat khó tan	VSV cố định nito
Khô	0-15	$(4,3 \pm 0,3) \times 10^5$	$(6,2 \pm 0,6) \times 10^3$	$(8 \pm 0,5) \times 10^2$
	15-30	$(9,7 \pm 0,5) \times 10^2$	$(1,2 \pm 0,2) \times 10$	$(4,4 \pm 0,2) \times 10$
Mưa	0-15	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^5$	$(1,5 \pm 0,4) \times 10^2$	$(6,1 \pm 0,5) \times 10$
	15-30	$(2,5 \pm 0,4) \times 10^2$	$(1,6 \pm 0,5) \times 10$	$(1,8 \pm 0,2) \times 10$

Kết quả phân tích chung cho thấy biến động thành phần và số lượng các nhóm vi sinh vật trong đất trồng Sâm Ngọc Linh theo mùa không có sự khác biệt rõ rệt

3.3.2 Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có hoạt tính phân giải phosphate khó tan

Từ nguồn mẫu đất trồng Sâm Ngọc Linh ở Quảng Nam đã sàng lọc được 40 chủng vi khuẩn có hoạt tính phân giải P trên môi trường thạch NBRIP như trong Bảng 3.6

Bảng 3.6 Kết quả sàng lọc các chủng vi khuẩn phân lập có hoạt tính phân giải P

SI	Số chủng	Tỷ lệ chủng có khả năng phân giải phosphate khó tan (%)
< 1,0	18	45
1,1 < P < 1,9	15	37,5
1,9 < P < 3,0	3	7,5
3,1 < P < 3,5	2	5
P > 3,5	2	5
Tổng số	40	100

Kết quả đánh giá khả năng hòa tan P khó tan của 07 chủng tuyển chọn bằng phản ứng xanh molipdat với cơ chất $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ thu được kết quả như Bảng 3.7.

Bảng 3.7 Đánh giá khả năng phân giải phosphate khó tan của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

TT	Chủng	Hàm lượng P_2O_5 hòa tan ($\mu\text{g/ml}$)
1	P1	103,17 $\pm$ 2,32
2	P6	50,12 $\pm$ 2,78
3	P19	92,5 $\pm$ 3,09
4	P29	70,5 $\pm$ 2,61
5	P31	60,53 $\pm$ 3,72
6	P35	65,65 $\pm$ 2,11
7	P36	56,21 $\pm$ 2,09

Định danh các chủng vi khuẩn tuyển chọn

So sánh mức độ tương đồng về trình tự gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn với một số chủng trong ngân hàng GenBank thu được kết quả như trong Bảng 3.9.

Bảng 3.9 Kết quả định danh các chủng vi khuẩn có hoạt tính phân giải phosphate phân lập từ đất trồng Sâm Ngọc Linh

Chủng phân lập	Mã số trên GenBank	Chủng tương đồng	Mã số trên GenBank	Mức độ tương đồng
P1	MK208980	<i>Acinetobacter soli</i>	NR044454.1	99,72%
P6	MK208981	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	NR028803.1	99,93%
P19	MK208982	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	NR114043.1	99,86%
P29	MK208983	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	NR028803.1	99,63%
P31	MK208984	<i>Enterobacter asburiae</i>	NR024640.1	99,25%
P35	MK208985	<i>Raoultella planticola</i>	NR113701.1	99,85%
P36	MK208986	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	NR114043.1	99,85%

3.3.3 Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có hoạt tính sinh tổng hợp IAA

Từ mẫu đất thu tại Quảng Nam đã sàng lọc được 15 chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp IAA (có phản ứng với thuốc thử Salkowski), tiến hành đánh giá khả năng sinh tổng hợp IAA trên môi trường có bổ sung L-tryptophan của các chủng vi khuẩn, kết quả thu được trong Bảng 3.10

Bảng 3.10 Kết quả sàng lọc các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp IAA

Hàm lượng IAA ($\mu\text{g/ml}$)	Số chủng	Tỷ lệ chủng có khả năng sinh IAA (%)
5 - 20	8	53,33
20 - 30	5	33,33
> 30	2	13,33
<i>Tổng số</i>	<i>15</i>	<i>100</i>

Định danh các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Đánh giá mức độ tương đồng về trình tự gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn có khả năng sinh IAA với một số chủng trong ngân hàng GenBank thu được kết quả như trong Bảng 3.12.

Bảng 3.12 Kết quả định danh các chủng vi khuẩn có hoạt tính sinh IAA phân lập từ đất trồng Sâm Ngọc Linh

Chủng phân lập	Mã số trên GenBank	Chủng tương đồng	Mã số trên GenBank	Mức độ tương đồng
VGS17-B38	MK208974	<i>Leifsonia soli</i>	NR 116501.1	99,72%
VGS6-B18	MK164267	<i>Bacillus luciferencis</i>	NR 025511.1	98,76%
VGS1-B14	MK208975	<i>B. subtilis</i>	NR 1027832	99,86%
P6	MK208981	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	NR 028803.1	99,93%
P19	MK208972	<i>Serratia marcescens</i>	NR 114043.1	99,86%
E7	MK358412	<i>B. bataviensis</i>	NR 114093.1	99,31%
B23		<i>Paracoccus sp.</i>		97,5%

Đánh giá khả năng tăng trưởng thực vật của chủng tuyển chọn

Trong số 07 chủng được tuyển chọn, chủng B23 (*Paracoccus sp.*) có hoạt tính sinh IAA cao nhất (134,4 $\mu\text{g/ml}$) được sử dụng để đánh giá hiệu quả thực tế khi ứng dụng làm chất tăng trưởng thực vật trên đối tượng cây sâm Ngọc Linh.

Bảng 3.13 Ảnh hưởng của IAA đến sinh trưởng cây Sâm Ngọc
Linh

Chi tiêu \ Lô	Đối chứng (Không xử lý IAA)	Thí nghiệm (Xử lý IAA)
Chiều dài thân (cm)	7,2±1,29	9,8±1,23
Chiều dài rễ (cm)	6,8±1,11	8,5±1,45
Trọng lượng tươi cây (g)	0,73±0,17	1,13±0,11

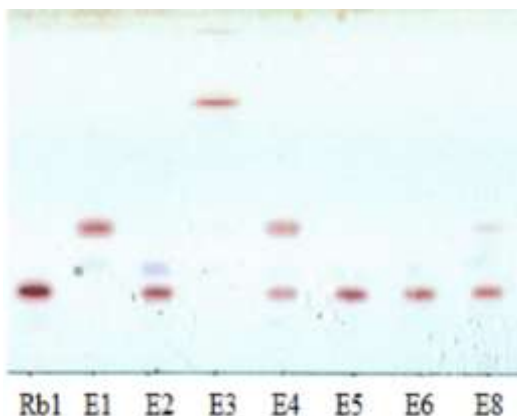


Hình 3.6 Ảnh hưởng dịch chiết IAA đến sinh trưởng cây Sâm Ngọc Linh
(A) Đối chứng; (B) Thí nghiệm

Kết quả sau 3 tháng từ khi cây nảy mầm trong trồng Sâm ngọc linh cho thấy mẫu thí nghiệm dùng dịch chiết IAA giúp kích thích sinh trưởng cây Sâm phát triển tốt hơn.

3.3.4 Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có hoạt tính chuyển hóa ginsenoside

Kết quả sàng lọc cho thấy có 07 chủng vi khuẩn có khả năng sinh β -glucosidase – tạo ra vùng màu nâu đỏ/nâu đậm trên môi trường thạch R2A có chứa esculine. Trong những chủng phân lập được thì chủng E3 cho thấy khả năng chuyển đổi ginsenoside Rb1 trong LB lỏng mạnh nhất (Hình 3.9). Vì vậy, chủng E3 được sử dụng cho các phân tích tiếp theo.



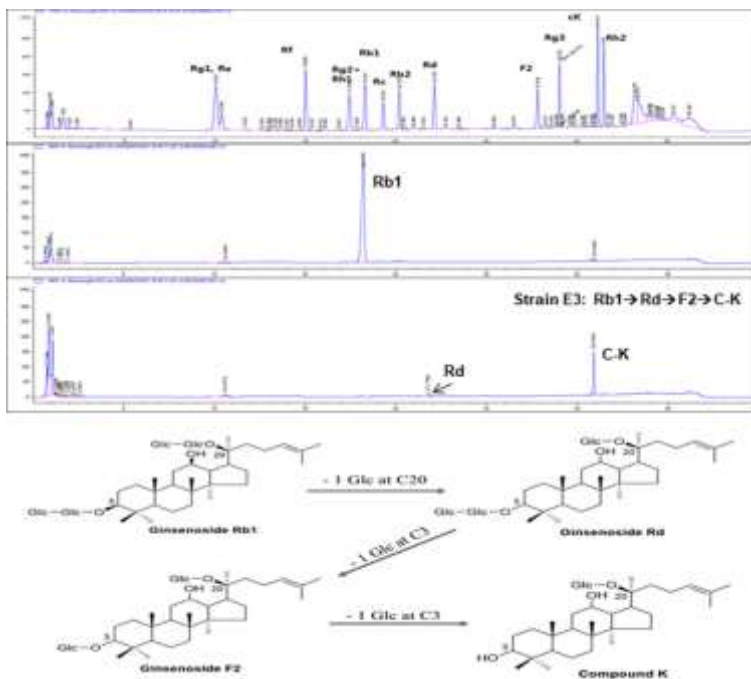
Hình 3.7 Chuyển hóa ginsenoside Rb1 của 07 chủng vi khuẩn phân lập
(Rb1: ginsenoside Rb1, E1→E8: các chủng vi khuẩn tuyển chọn)

Định danh các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Bảng 3.14 Kết quả định danh các chủng vi khuẩn sinh β -glucosidase phân lập từ đất trồng Sâm Ngọc Linh

Chủng phân lập	Mã số trên GenBank	Chủng tương đồng	Mã số trên GenBank	Mức độ tương đồng
E1	MK134680	<i>Bacillus mycoides</i>	NR 113990.1	96,64%
E2	KY000527	<i>B. bataviensis</i>	NR 114093.1	99,30%
E3	KY000528	<i>Paenibacillus terrigena</i>	NR 041398.1	99,86%
E4	MK208976	<i>B. methylotrophicus</i>	KP 698949.1	100,00%
E5	MK208977	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	NR 116698.1	99,93%
E6	MK208978	<i>B. luciferensis</i>	NR 025511.1	99,16%
E8	MK208979	<i>Paenibacillus terrae</i>	NR 025170.1	99,17%

Con đường chuyển hóa ginsenoside

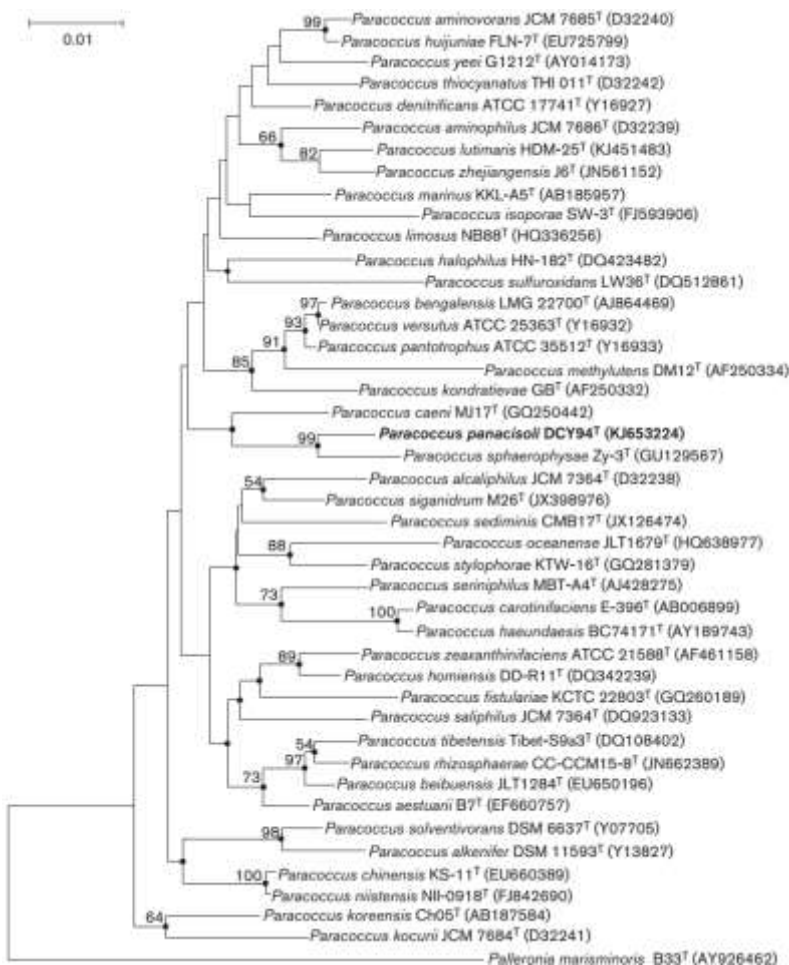


Hình 3.9 Phân tích HPLC và con đường (giả thuyết) chuyển hóa ginsenoside Rb1 bằng enzyme thô trong dịch nuôi cấy chủng E3. (Chất chuẩn ginsenoside (A); đối chứng ginsenoside Rb1 (B); ginsenoside chuyển hóa thành C-K do enzyme thô của chủng E3 (C); con đường chuyển hóa giả thuyết Rb1 → Rd → F2 → C-K (D))

Nghiên cứu này bước đầu đã xác định chủng E3 có khả năng chuyển hóa Rb1 thành C-K nhờ sử dụng các enzyme thô.

3.4 NGHIÊN CỨU PHÁT HIỆN LOÀI MỚI PARACOCCLUS PANACISOLI SP. NOV. DCY94^T PHÂN LẬP TỪ ĐẤT TRỒNG SÂM NGỌC LINH Ở QUẢNG NAM

Chủng B23 (*Paracoccus* sp) với độ tương đồng thấp 97,5%, kết hợp các kết quả nghiên cứu về đặc điểm hình thái khuẩn lạc/tế bào, đặc điểm sinh hóa, chuyển hóa, giải mã trình tự gen 16S rRNA... và hàm lượng sinh tổng hợp IAA cao giúp cây Sâm sinh trưởng tốt là cơ sở xác định loài mới.



Hình 3.10 Cây phát sinh loài của chủng DCY94^T

Chủng DCY94^T có giá trị bootstrap cao hơn so với chủng *P. sphaerophysae* Zy-3^T và thấp hơn so với chủng *P. caeni* MJ17^T.

3.4.1 Đánh giá các đặc điểm sinh lý, sinh hóa

Đặc điểm về sinh lý và sinh hoá của chủng DCY94^T và 2 chủng tham chiếu (*P. sphaerophysae* HAMBI 3106^T (Đại học Helsinki - Phần Lan) và chủng *P. caeni* KCTC 22480T (Bộ sưu tập giống chuẩn Hàn Quốc KCTC) được tóm tắt trong Bảng 3.15.

Bảng 3.15 Đặc điểm phân biệt giữa chủng phân lập (1) DCY94^T và 2 chủng tham chiếu (2) *P. sphaerophsae* HAMBI 3160^T và (3) *P.caeni* KCTC 22480^T

Đặc điểm \ Chủng	1	2	3
<i>Thủy phân:</i>			
Tween 20	-	+	-
Tyrosine	+	-	+
<i>Hoạt tính enzyme:</i>			
α -Chymotrypsin	-	-	+
α -Glucosidase	-	-	+
<i>Khả năng đồng hóa:</i>			
N-Acetylglucosamine	-	-	+
Inositol	-	-	+
Sucrose	-	-	+
Maltose	-	+	+
Axit itaconic	+	+	-
Axit suberic	+	-	-
Sodium malonate	+	+	-
Sodium acetate	+	+	-
Axit lactic	+	+	-
L-Alanine	+	-	+
Potassium 5-ketogluconate	+	-	+
Glycogen	-	+	-
Axit 3-Hydroxybenzoic	+	+	-
L-Serine	+	-	+
Salicin	+	+	-
Potassium 2-ketogluconate	-	-	+
D-Mannose	+	-	+
Axit phenylacetic	+	-	+
<i>Tạo thành axit từ:</i>			
Erythritol	-	-	+
D-Galactose	-	-	+
L-Sorbose	-	-	+
L-Rhamnose	-	-	+
Dulcitol	+	+	-
Amygdalin	+	+	-
Arbutin	+	-	-
Salicin	+	+	-

Maltose	-	+	+
Sucrose	-	+	+
Melezitose	-	-	+
Raffinose	-	+	-
Turanose	-	-	+
D-Arabitol	+	+	-
L-Arabitol	+	+	-
Sinh IAA ($\mu\text{g/ml}$)	134,4 $\pm$ 0.58	40,7 $\pm$ 0.20	11,4 $\pm$ 0.10
Hàm lượng DNA G+C (%mol)	68,3	67,1 ^{a*}	58,7 ^b

Ghi chú: Dữ liệu tham khảo (a) (Deng et al., 2011); (b) (Lee et al., 2011)

Kết quả phân tích cho thấy chủng DCY94^T sản xuất ra một lượng lớn IAA hơn 2 chủng tham chiếu. Các kết quả thu được cho thấy có sự khác nhau đáng kể giữa chủng DCY94^T và *P.caeni* KCTC 22480^T

3.4.2 Phân tích axit béo

Thành phần axit béo nói chung của chủng DCY94^T và hai chủng tham chiếu là tương tự nhau (Bảng 3.16).

Bảng 3.16 Thành phần các axit béo (hàm lượng > 0,5%) của chủng phân lập

(1) DCY94^T và 2 chủng tham chiếu (2) *P. sphaerophysae* HAMBI 3160^T,

(3) *P.caeni* KCTC 22480^T

Thành phần (%)	Chủng	1	2	3
C _{8:0} 3-OH		1,0	0,5	0,5
C _{10:0} 3-OH		2,8	3,2	2,5
C _{14:0} ω5c		0,5	< 0,5	< 0,5
C _{16:0}		-	< 0,5	0,7
C _{18:0}		5,2	5,7	6,0
C _{19:0} cyclo ω5c		-	-	0,5
Cả 2 loại 2 (ante-C _{18:0} và/hoặc C _{18:2} ω6,9c)		-	< 0,5	2,7
Cả 2 loại 8 (C _{18:1} ω7c và/hoặc C _{18:1} ω6c)		88,4	87,5	85,4

3.4.3 Phân tích hàm lượng G+C

Thành phần ADN G+C của chủng DCY94^T là 68,3% mol, nằm trong khoảng đã được công bố của chi *Paracoccus*, từ 58,7% mol (*P. caeni* MJ17^T; Lee et al., 2011) tới 70% mol (*Paracoccus soventivorans* L1^T; Siller et al., 1996). Mức độ không tương đồng giữa ADN của chủng DCY94^T và *P. sphaerophysae* HAMBI 3160^T và *P. caeni* KCTC 22480^T lần lượt là 52% và 50%. Những giá trị này đủ để chứng minh chủng DCY94^T như là một loài khác trong chi *Paracoccus* (Wayne et al., 1987).

Dựa trên các phân tích cây phát sinh loài và kiểu hình, phân loại theo thành phần hoá học và dữ liệu gene, chủng DCY94^T được xếp vào chi *Paracoccus* như là một loài mới, và mang tên đề xuất là *Paracoccus panacisoli* sp. nov.

3.4.4 Mô tả *Paracoccus panacisoli* sp.nov

Bảng 3.17. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào và đặc điểm nuôi cấy chủng *Paracoccus panacisoli* DCY94^T

Chủng	Chủng DCY94 ^T
Đặc điểm	
<i>Khuẩn lạc</i>	Khuẩn lạc có màu kem, tròn, lồi và đường kính từ 0,5 đến 1,0 mm sau 2 ngày ủ trên môi trường NA
<i>Tế bào</i>	Gram âm, hình que, không di động, đường kính xấp xỉ 0,57 µm và chiều dài 1,35 µm
<i>Đặc điểm nuôi cấy</i>	
Nhiệt độ	15-37 °C
pH	5,5 - 9,0
Độ mặn (NaCl) (w/v)	0 - 6
Môi trường phát triển	NA, R2A, LB, TSA
<i>Hoạt tính sinh học</i>	
Sinh tổng hợp IAA	+
Siderophores	+
Phân giải phosphate	-
Catalase	+
Oxidase	+



Hình 3.12 Đặc điểm hình thái khuẩn lạc (A), tế bào (B) chủng DCY94^T

Bảng 3.18 Đặc điểm sinh hóa chủng DCY94^T (Kit 20NE và 32GN)

Đặc điểm	Chủng DCY94^T
<i>Khả năng thủy phân:</i>	
Tween 20	-
L- Tyrosine	+
Tinh bột	-
Gelatin	-
Casein	-
<i>Khả năng đông hóa:</i>	
3-hydroxybenzoic acid	+
3-hydroxybutyric acid	+
4-hydroxybenzoic acid	+
Adipic acid	-
Aesculin hydrolysis	-
Arginine dihydrolase	-
Beta-galactosidase	-
Capric acid	-
D-Glucose	+
D-mannitol	+
D-mannose	+
D-ribose	+
D-sorbitol	+
Glucose	-
Itaconic acid	+
Kali 2-ketogluconate	-
Kali 5-ketogluconate	+
Kali gluconate	+
Lactic acid	+
L-alanine	+
L-Arabinose	+
L-fucose	-
L-histidine	+
L-proline	+
L-rhamnose	+
L-serine	+
Malic acid	+
Maltose	+
Melibiose	-
N-acetylglucosamine	-

Natri malonate	+
Nitrates	-
Phenylacetic acid	+
Propionic acid	+
Salicin	+
Suberic acid	+
Sucrose	-
Urease	-
Valeric acid	+

Bảng 3.19 Đặc điểm sinh hóa chủng DCY94^T (API ZYM)

Chủng Đặc điểm	Chủng DCY94 ^T
Alkaline Phosphatase	+
Esterase (C4)	+
Esterase lipase (C8)	+
Leucine arylamidase	+
Valine arylamidase	+
Cystine arylamidase	+
Acid phosphatase	+
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+
Lipase	-
Trypsin	-
Alpha-glucosidase	-
Beta-glucuronidase	-
Beta-glucosidase	-
N-acetyl-beta-glucosaminidase	-
Alpha-mannosidase	-
Alpha-fucosidase	-
Glycerol	+
D- và L-arabinose	+
D-ribose	+
D và L-xylose	+
D-adonitol	+
D-glucose	+
D-fructose	+
D-mannose	+
D-mannitol	+

D-sorbitol	+
Amygdalin	+
Arbutin	+
Salicin	+
Cellobiose	+
Lactose	+
Trehalose	+
Xylitol	+
Gentiobiose	+
D-lyxose	+
D-fucose	+
D - arabitol	+
L - arabitol	+
Erythritol	-
Methyl beta-D-xylopyranoside	-
D-galactose	-
L-sorbose	-
L-rhamnose	-
Methyl alpha-D-mannopyranoside	-
Methyl alpha-D-glucopyranoside	-
N-acetylglucosamine	-
Aesculin	-
Maltose	-
Melibiose	-
Sucrose	-
Inulin	-
Melezitose	-
Raffinose	-
Tinh bột	-
Glycogen	-
Turanose	-
D-tagatose	-
Kali gluconate	-
Kali 5-ketogluconate	-

Chủng DCY94^T này (=KCTC 42086^T=JCM 30337^T) được công nhận là loài mới phân lập từ đất trồng Sâm Ngọc Linh ở tỉnh Quảng Nam, Việt Nam.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Bằng kỹ thuật giải trình tự thế mới (Illumina Miseq-base sequencing) đã đánh giá mức độ đa dạng quần xã vi sinh vật trong đất trồng Sâm Ngọc Linh ở Quảng Nam gồm 32 ngành, 81 lớp, 151 bộ, 310 họ, 652 chi, và 1833 loài. Hình 3.1 chỉ ra các ngành vi khuẩn chiếm chủ yếu là ngành Acidobacteria (độ giàu tương đối, 49,07%) và Proteobacteria (25,57%), tiếp theo là ngành Verrucomicrobia 4,64%; Chloroflexi (3,54%), Bacteroidetes (3,51%), Actinobacteria (3,44%); Gemmatimonadetes (2,41%); Planctomycetes (2,22%); Cyanobacteria (1,15%). Tất cả các ngành còn lại đều được tìm thấy ở mức <1% trong mẫu.

2. Đã phân lập và tuyển chọn được một số chủng vi khuẩn có hoạt tính sinh học:

+ 07 chủng có hoạt tính phân giải phosphate khó tan cao (Hàm lượng P_2O_5 hòa tan đạt từ 50,12 - 103,17 $\mu\text{g/ml}$), thuộc họ *Enterobacteriaceae*;

+ 07 chủng có khả năng sinh IAA trên 20 $\mu\text{g/ml}$ bao gồm 3 chủng (kí hiệu VGS6-B18, VGS16-B17 và E7) thuộc chi *Bacillus*, 02 chủng (P6 và P19) thuộc họ *Enterobacteriaceae*, trong đó chủng P6 được xác định là loài *Kluyvera cryocrescens* có khả năng sinh tổng hợp chất kích thích sinh trưởng IAA và phân giải photphat khó tan; chủng B23 thuộc chi *Paracoccus* có tác dụng kích thích sinh trưởng của cây Sâm sau giai đoạn nảy mầm.

+ Chủng *Paenibacillus terrigena* strain E3 có hoạt tính sinh enzyme β -glucosidase chuyển hóa ginsenoside Rb1 $\rightarrow$ CK.

3. Công bố 01 loài mới *Paracoccus panacisoli* sp. nov. DCY94^T phân lập từ đất trồng sâm Ngọc Linh ở Quảng Nam trên Tạp chí IJSEM.

KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục nghiên cứu, ứng dụng chủng *Paracoccus panacisoli* sp. nov. DCY94^T đến sự phát triển của cây sâm
- Nghiên cứu ứng dụng sản xuất phân bón vi sinh từ các chủng phân lập có hoạt tính cao làm phân bón cho cây Sâm.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ

1. Trần Bảo Trâm, Phạm Hương Sơn, Nguyễn Thị Thanh Mai, Nguyễn Thị Hiền (2014), “Khảo sát sự biến động của các quần thể vi sinh vật trong đất trồng Sâm Ngọc Linh”, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam* 24/2014, tr 47-50.
2. Ngoc-Lan Nguyen, Yeon-Ju Kim, Van-An Hoang, Bao-Tram Tran, Huong-Son Pham and Deok-Chun Yang (2015), “*Paracoccus panacisolis* sp. nov., isolated from a forest soil cultivated with Vietnamese ginseng”, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, pp 1491–1497.
3. Trần Bảo Trâm, Nguyễn Thị Thanh Mai, Trương Thị Chiên, Phạm Hương Sơn (2016), “Nghiên cứu đặc tính lý hóa đất rừng trồng Sâm Ngọc Linh ở Quảng Nam”, *Tạp chí Khoa học đất* 49/2016, tr 22-25.
4. Ngoc-Lan Nguyen, Bao-Tram Tran, Huong-Son Pham and The-Hai Pham (2017), “Illumina miseq-based sequencing analysis of bacteria community in Vietnamese ginseng cultivated soil in the Ngoc Linh mountain, Vietnam”, *Tuyển tập báo cáo Hội nghị khoa học toàn quốc lần thứ 7 về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật*, tr 1274-1282.
5. Trần Bảo Trâm, Nguyễn Thị Hiền, Phạm Hương Sơn, Nguyễn Thị Thanh Mai, Võ Thu Giang, Phạm Thế Hải (2017), “Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn sinh tổng hợp IAA (Indole Acetic Acid) từ đất trồng sâm Việt Nam ở Quảng Nam”, *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 33(1S), tr 219-226.
6. Trần Bảo Trâm, Nguyễn Thị Hiền, Nguyễn Thị Thanh Mai, Phạm Hương Sơn, Phạm Thế Hải (2017), “Phân lập và nhận diện vi khuẩn phân giải lân từ đất trồng Sâm Ngọc Linh ở Quảng Nam”, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam* 2(75), tr 80-86.
7. Trần Bảo Trâm, Nguyễn Ngọc Lan, Phạm Hương Sơn, Phạm Thế Hải, Lê Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Hiền, Nguyễn Thị Thanh Mai, Trương Thị Chiên (2017), “Tình hình nghiên cứu phát hiện các loài vi khuẩn mới trong đất trồng nhân sâm (*Panax* L.) trên thế giới”, *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 15(3), tr 403-422.
8. Tran Bao Tram, Nguyen Ngoc Lan, Pham Huong Son, Pham The Hai (2018), “Biotransformation of ginsenosides Rb1 by bacterial crude enzyme of *Paenibacillus* spp. strain E3 isolated from Vietnamese ginseng soil”, *Tạp chí Sinh học* 40(3).