

ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY ĐẾN KHẢ NĂNG TỔNG HỢP IAA CỦA CHỦNG VI KHUẨN NỘI SINH HY9 VÀ TT3

Phạm Hồng Hiền¹, Trần Thị Đào², Tạ Hà Trang², Hoàng Thị Liễu², Nguyễn Văn Giang^{2*}

¹*Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*

²*Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

*Tác giả liên hệ: nvgiang@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 24.06.2022

Ngày chấp nhận đăng: 22.11.2022

TÓM TẮT

Vi khuẩn nội sinh là nhóm vi khuẩn sinh trưởng và phát triển bên trong mô thực vật, không gây hại cho cây chủ. Chúng góp phần cải thiện sự phát triển của cây thông qua tổng hợp IAA, siderophore, hoà tan phosphate và tăng cường tính kháng bệnh của cây. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích đánh giá ảnh hưởng của pH, nhiệt độ, nguồn carbon, nitơ và thời gian nuôi cấy đến nồng độ IAA được tổng hợp bởi hai chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3 được phân lập từ rễ cây kim ngân (*Lonicera japonica*). Trong các điều kiện nuôi cấy khác nhau, nồng độ IAA cao nhất của hai chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3 đạt được tại pH = 7 (lần lượt là 42,9 µg/ml và 49,07 µg/ml), 35°C (53,49 µg/ml và 56,73 µg/ml), 4 ngày nuôi (51,47 µg/ml và 53,76 µg/ml). Nguồn carbon thích hợp là saccharose và nguồn nitơ là NH₄Cl. So sánh trình tự nucleotide 16S rRNA của chủng vi khuẩn nội sinh TT3 với các trình tự nucleotide 16S rRNA của các chủng vi khuẩn trên ngân hàng gen (GenBank) cho phép kết luận chủng TT3 có quan hệ rất gần với chủng *Klebsiella variicola* strain 1, do đó chủng TT3 được đặt tên là *Klebsiella variicola* TT3.

Từ khoá: Cây kim ngân, vi khuẩn nội sinh, IAA, *Klebsiella* spp.

Effects of Culture Conditions on IAA Synthetic Ability of Endophytic Bacterial Strains HY9 and TT3

ABSTRACT

Endophytic bacteria living in the plant tissues support plant growth by synthesizing IAA and siderophore, inorganic soluble phosphate, and increasing disease resistance of the host plants. This study aimed to evaluate the effects of carbon and nitrogen sources, pH, temperature, and time of incubation on the concentration of IAA synthesized by two endophytic bacterial strains, HY9 and TT3, isolated from *Lonicera japonica*. Under various suitable culture conditions, maximum IAA of HY9 and TT3 strains was produced at pH = 7 (42.9 µg/ml and 49.07 µg/ml, respectively), 35°C (53.49 µg/ml and 56.73 µg/ml), and 4 days of incubation (51.47 µg/ml and 53.76 µg/ml). The suitable carbon and nitrogen sources were saccharose and NH₄Cl. Comparing the nucleotide sequence of 16S rRNA of TT3 strain with nucleotide sequences of 16S rRNA of other bacterial strains on GenBank revealed that TT3 strain had a very closed relationship with *Klebsiella variicola* strain 1, thus, strain TT3 was named *Klebsiella variicola* TT3.

Keywords: *Lonicera japonica*, Endophytes, IAA, *Klebsiella* spp.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn nội sinh (endophytic bacteria) là những vi khuẩn sống bên trong mô thực vật và không gây ra triệu chứng bệnh hoặc ảnh hưởng xấu đến cây chủ của chúng (Schulz & Boyle,

2006). Những vi khuẩn này có lợi đối với sự tồn tại của thực vật khi gặp điều kiện bất lợi tác động trực tiếp đến cây chủ. Bên cạnh đó, các chủng vi sinh vật nội sinh tăng cường khả năng sinh trưởng và đối kháng của cây chủ với các tác nhân gây bệnh hại cây trồng do chúng tổng hợp

các hợp chất kháng khuẩn, kháng nấm (Sessitsch & cs., 2002), các hormone sinh trưởng thực vật như IAA, hoà tan phosphate khó tan, tổng hợp siderophore (hợp chất vận chuyển sắt).

Cây kim ngân (*Lonicera japonica*) từ lâu đã được khai thác và sử dụng để điều trị các vấn đề về sức khỏe, gần đây cây kim ngân được sử dụng để phòng ngừa và điều trị một số bệnh do virus gây ra trên người và động vật. Một số nghiên cứu cho thấy cây kim ngân có hoạt tính kháng khuẩn, khử trùng rõ rệt và có thể được ứng dụng rộng rãi trong mỹ phẩm. Vì vậy, cây kim ngân sẽ mang lại những giá trị cho xã hội và cho kinh tế (Xiaofei & cs., 2011). Hiện nay, cây kim ngân chủ yếu được trồng ở các tỉnh phía Bắc nước ta (Đỗ Tất Lợi, 2001), nhiều biện pháp canh tác đã được áp dụng để tăng sinh khối cây kim ngân. Tuy nhiên tiềm năng của các chủng vi sinh vật nội sinh trong cây kim ngân còn chưa được nghiên cứu nhiều. Vì vậy, nghiên cứu này nhằm khảo sát, đánh giá ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng tổng hợp IAA của hai chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3 phân lập từ rễ cây kim ngân. Các kết quả thu được sẽ là cơ sở khoa học để ứng dụng hai chủng vi khuẩn này trong sản xuất chế phẩm phân bón sinh học phục vụ sản xuất.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Hai chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3 được phân lập từ các mẫu rễ cây kim ngân thu thập tại Hưng Yên và Ninh Bình và bảo quản tại Phòng Thí nghiệm, Bộ môn Công nghệ vi sinh, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Định lượng IAA

Để xác định nồng độ IAA tổng hợp được bởi vi khuẩn trong điều kiện *in vitro*, cần dựng đường chuẩn biểu hiện mối tương quan giữa chỉ số OD₅₃₀ và nồng độ IAA trong môi trường chuẩn độ. Theo phương pháp được mô tả bởi Glickmann & Dessaux (1995), mối quan hệ giữa nồng độ IAA

trong môi trường chuẩn độ và giá trị OD tại $\lambda = 530\text{nm}$ được biểu diễn bằng phương trình đường chuẩn: $y = ax + b$, trong đó y là giá trị OD tại $\lambda = 530\text{nm}$, x là hàm lượng IAA.

Các chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3 được nuôi tại nhiệt độ 30°C, 72 giờ trong môi trường Nutrient agar (NA) lỏng (thành phần gồm: Peptone: 6,0 g/l; cao nấm men: 2,0 g/l; NaCl: 5,0 g/l, agar: 14 g/l, pH: 7,0) có bổ sung 0,1% L-tryptophan. Sau 72 giờ, dịch nuôi vi khuẩn được ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút, trong 15 phút. Hút cẩn thận 1ml phần dịch trong sau khi ly tâm dịch nuôi vi khuẩn, chuyển vào các ống nghiệm và bổ sung 2ml thuốc thử Salkowski (300ml H₂SO₄ 98%, 15ml FeCl₃ 0,5M). Ủ hỗn hợp trên trong tối 30 phút để phản ứng xảy ra hoàn toàn, sau đó đo OD ở bước sóng $\lambda = 530\text{nm}$ (TCVN 10784:2015, được Bộ KH-CN ban hành). Các giá trị OD thu được được thay vào phương trình đường chuẩn đã dựng ở trên, từ đó tính được nồng độ IAA được tổng hợp bởi các chủng vi khuẩn thí nghiệm.

2.2.2 Ảnh hưởng của pH đến khả năng tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3

Các chủng vi khuẩn được tuyển chọn nuôi cấy riêng trong môi trường NA lỏng có bổ sung 0,1% L-tryptophan trong điều kiện tối, lắc 200 vòng/phút ở 30°C trong 72 giờ, ở các giá trị pH: 4, 5, 6, 7 và 8.

2.2.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3

Nuôi các chủng vi khuẩn thí nghiệm trong môi trường NA lỏng có bổ sung 0,1% L-tryptophan, pH thích hợp ở thí nghiệm trên tại các giá trị nhiệt độ khác nhau (30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C), lắc 200 vòng/phút trong điều kiện tối, nuôi 72 giờ.

2.2.4. Ảnh hưởng của nguồn carbon và nitơ đến khả năng tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3

Tiến hành nuôi lỏng chủng vi khuẩn thí nghiệm trong môi trường muối khoáng cơ bản

$[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l; NaH_2PO_4 1,5 g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/l; K_2HPO_4 0,5 g/l]. Các nguồn carbon gồm: D-glucose, lactose, dextrin, saccharose, D-sorbitol, mantose, fructose, xylose. Các nguồn nitơ được bổ sung thêm là peptone, cao nấm men, NH_4Cl , KNO_3 , NH_4NO_3 , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Nuôi lắc 200 vòng/phút, nhiệt độ nuôi cấy 30°C ở điều kiện tối, nuôi 72 giờ.

2.2.5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3

Hai chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3 được nuôi trong môi trường NA lỏng có bổ sung 0,1% L-tryptophan tại pH và nhiệt độ thích hợp, lắc 200 vòng/phút. Hàm lượng IAA được xác định sau các khoảng thời gian nuôi tương ứng 1, 2, 3, 4 và 5 ngày.

Các thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của điều kiện môi trường nuôi cấy đến khả năng tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp được mô tả bởi Tahsina & Sharmin (2021). Thí nghiệm lặp lại ba lần, kết quả được xử lý bằng phần mềm Excel (2016).

2.2.6. Định danh phân tử chủng vi khuẩn nội sinh

Trình tự nucleotide 16S rRNA của chủng vi

khuẩn nghiên cứu được khuếch đại bởi phản ứng PCR với cặp mồi 27F và 1495R có trình tự 27F: 5' GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3'; 1495R: 5'CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA 3'. Sản phẩm PCR được xác định trình tự trên máy xác định trình tự nucleotide tự động. Trình tự nucleotide của đoạn gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn thí nghiệm được so sánh với trình tự nucleotide 16S rRNA bằng công cụ BLAST trên NCBI để so sánh kết quả trong GenBank. Cây phát sinh loài dựa trên so sánh trình tự nucleotide 16S rRNA được thiết kế trên phần mềm MegaX và BioEdit.

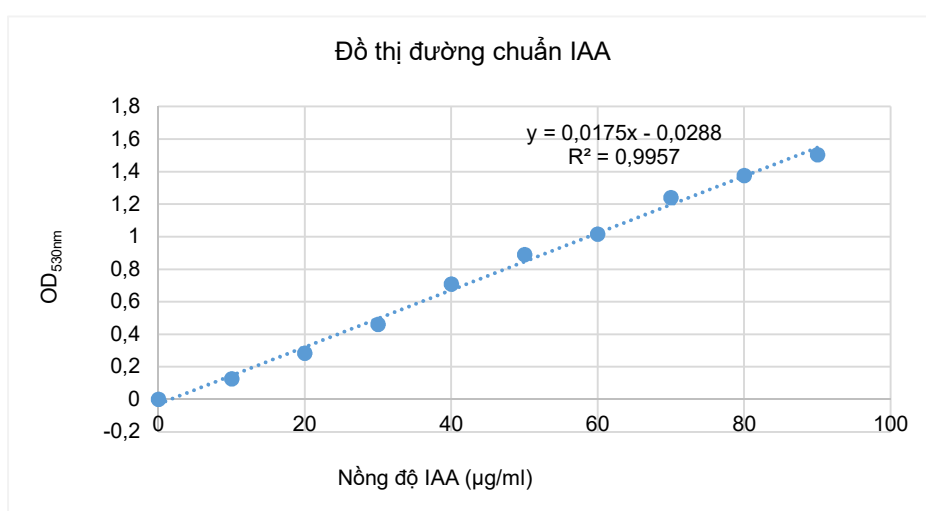
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đường chuẩn biểu hiện mối tương quan giữa giá trị OD_{530} và nồng độ IAA

Trong điều kiện thí nghiệm *in vitro*, mối quan hệ giữa nồng độ IAA trong môi trường chuẩn độ và giá trị OD tại $\lambda = 530\text{nm}$ được biểu diễn bằng phương trình đường chuẩn theo phương pháp được mô tả bởi Glickmann & Dessaux (1995). Kết quả dựng đường chuẩn cho thấy, tương quan giữa nồng độ IAA và giá trị OD_{530} được biểu diễn thông qua phương trình (Hình 1):

$$y = 0,0175x - 0,0288 \text{ với } R^2 = 0,9957$$

Trong đó: y là giá trị OD tại $\lambda = 530\text{nm}$, x là nồng độ IAA.



Hình 1. Đồ thị đường chuẩn thể hiện tương quan giữa giá trị $\text{OD}_{530\text{nm}}$ với nồng độ IAA (µg/ml)

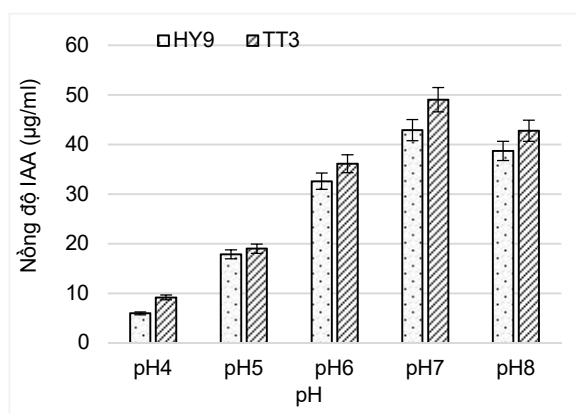
3.2. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến khả năng tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3

Hai chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3 có thể sinh trưởng và tổng hợp IAA trong dải pH từ 4 đến 8, tuy nhiên nồng độ IAA tương đối thấp ở pH = 4 đối với chủng HY9 (5,98 µg/ml) và TT3 (9,18 µg/ml) (Hình 2A) và tăng dần khi pH tăng. pH trong khoảng từ 5 đến 7, nồng độ IAA của các chủng vi khuẩn tăng dần và đạt cao nhất ở pH = 7 với chủng HY9 (42,9 µg/ml) và TT3 (49,07 µg/ml), khi pH đạt giá trị 8, nồng độ IAA của hai chủng vi khuẩn nội sinh này có xu hướng giảm.

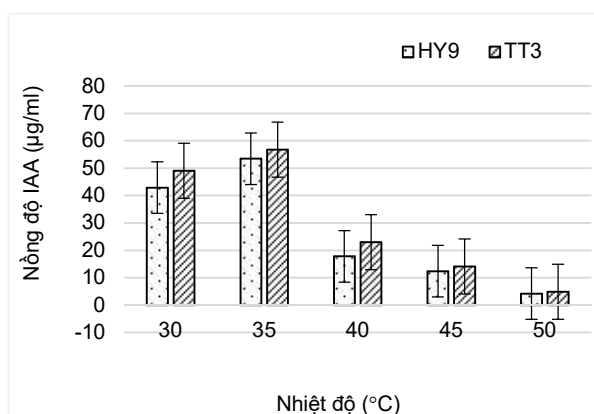
Các chủng vi sinh vật nội sinh trong nghiên cứu của Nguyễn Hải Vân & Nguyễn Thị Minh (2017) đã tổng hợp IAA nhiều nhất tại pH = 7 (100,2 µg/ml). Panigrahi & cs. (2020) thông báo các chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ cây hương nhu tổng hợp IAA nhiều nhất ở pH = 7 (17,807 µg/ml). Công bố của Khamna & cs. (2010) cũng đã kết luận các chủng *Streptomyces* spp. tổng hợp được nhiều IAA nhất khi môi trường nuôi các chủng này có pH = 7. Emami & cs. (2019) chỉ rõ hai chủng vi khuẩn *Pseudomonas mosselii* và *Bacillus toyonensis* tổng hợp IAA nhiều nhất tại pH 7-8 và pH thấp hơn 6 không thích hợp cho quá trình tổng hợp IAA của hai chủng này. Môi trường nuôi các chủng vi sinh vật có tính axit (pH < 6) ảnh hưởng tới quá trình tổng hợp IAA do pH ảnh

hưởng tới hoạt động của các enzyme cần thiết cho quá trình tổng hợp IAA và khả năng hoà tan của nhiều cơ chất quan trọng đối với sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn.

Hai chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3 phân lập từ rễ cây kim ngân biểu hiện khả năng tổng hợp được nhiều IAA khi được nuôi ở nhiệt độ 30°C và 35°C. Lượng IAA được tổng hợp bởi hai chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3 đạt giá trị cao nhất tại 35°C, lần lượt là 53,49 µg/ml và 56,73 µg/ml. Khi tăng nhiệt độ nuôi hai chủng này từ 40°C đến 50°C, nồng độ IAA được tổng hợp giảm dần và đạt giá trị thấp nhất tại nhiệt độ 50°C, chỉ còn khoảng 4-5 µg/ml (Hình 2B). Nguyễn Văn Giang & cs. (2016) đã báo cáo chủng vi khuẩn nội sinh từ rễ cây nha đam tổng hợp IAA cao nhất tại nhiệt độ 35°C, trong nghiên cứu của Sudha & cs. (2012) nồng độ IAA được các chủng vi sinh vật tổng hợp cao nhất tại 35°C. Một số nhà nghiên cứu báo cáo rằng các chủng vi khuẩn tổng hợp IAA nhiều nhất tại ngưỡng nhiệt độ 30-37°C (Mohite, 2013; Emami & cs., 2019). Sinh trưởng của vi sinh vật chịu ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường, nhiệt độ tác động tới các phản ứng sinh học được xúc tác bởi các enzyme. IAA trong thí nghiệm này được tổng hợp thông qua con đường chuyển hoá L-tryptophan và được điều khiển bởi các enzyme khác nhau. Nhiệt độ cao đã ảnh hưởng tới hoạt động của các enzyme cần thiết để tổng hợp IAA của vi khuẩn do đó tác động hiệu quả tổng hợp IAA (Duca & cs., 2014).



(A)



(B)

Hình 2. Ảnh hưởng của pH (A) và nhiệt độ (B) đến khả năng tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3

3.3. Ảnh hưởng nguồn carbon và nitơ đến khả năng tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3

Hai chủng vi khuẩn thí nghiệm được nuôi trong môi trường khoáng cơ bản với các nguồn carbon và nitơ khác nhau (như đã trình bày trong mục 2.2.4). Kết quả (Hình 3A) cho thấy chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3 có thể sử dụng nhiều nguồn carbon khác nhau để sinh tổng hợp IAA. Saccharose là một trong những nguồn carbon thích hợp nhất với chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3 vì IAA được các chủng này tổng hợp nhiều nhất, lần lượt đạt 39,30 µg/ml và 39,81 µg/ml, so với khi các chủng được nuôi trong môi trường có các nguồn carbon khác. Nghiên cứu gần đây về vi khuẩn nội sinh của Panigrahi & cs. (2020) và Apine & cs. (2011) cũng cho thấy khả năng sinh IAA tăng lên khi môi trường được bổ sung saccharose. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của Emami & cs. (2019) glucose là nguồn carbon thích hợp để các chủng vi khuẩn nội sinh tổng hợp được nhiều IAA nhất, tiếp theo là sucrose và fructose. Chandra & cs. (2018) thông báo rằng chủng CA2003, CA2004 tổng hợp IAA nhiều nhất khi sử dụng dextrose là nguồn carbon. Chủng vi khuẩn *Bacillus sonorensis* LD18 trong nghiên cứu của Nguyễn Văn Giang & cs. (2018) tổng hợp IAA nhiều nhất khi nuôi trong môi trường có sorbitol. Nguồn carbon được sử dụng như nguồn năng lượng và tăng cường tuần hoàn các cofactor trong tế bào trong quá trình tổng hợp các hợp chất trao đổi thứ cấp (Chandra & cs., 2018). Do đó hiệu quả tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn thay đổi phụ thuộc vào nguồn carbon trong môi trường. Kết quả của nghiên cứu này và của các tác giả khác đã cho thấy nguồn carbon trong môi trường ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn có thể do thay đổi tốc độ sinh trưởng gây nên bởi khả năng sử dụng các nguồn carbon trong môi trường.

Khả năng sử dụng các nguồn nitơ khác nhau cho thấy phản ứng khác nhau của chủng vi khuẩn đến quá trình tổng hợp IAA. Ảnh hưởng của nguồn nitơ trong môi trường nuôi đến khả

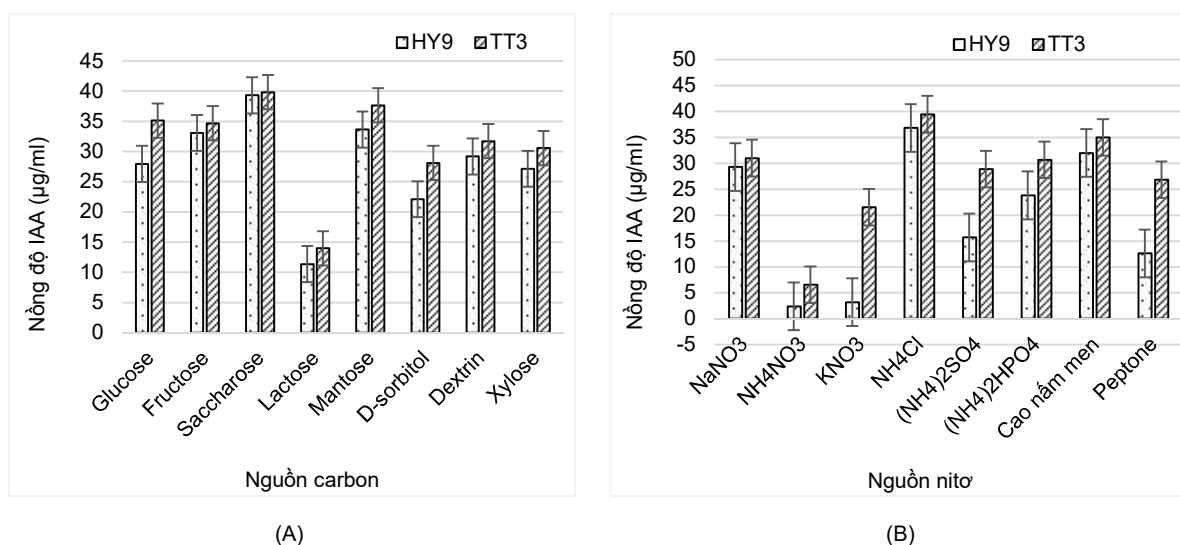
năng sinh IAA đối với chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3 khác nhau (Hình 3B). Chủng HY9 và TT3 tổng hợp IAA cao nhất khi môi trường có NH_4Cl , nồng độ IAA lần lượt là 36,84 µg/ml và 39,47 µg/ml. Nồng độ IAA thấp nhất trong môi trường có NH_4NO_3 chỉ đạt 2,38 µg/ml và 6,56 µg/ml lần lượt đối với chủng HY9 và TT3. Do đó, NH_4Cl là nguồn nitơ thích hợp nhất cho sinh tổng hợp IAA của chủng HY9 và TT3 phân lập từ cây kim ngân. Kết quả thí nghiệm này giống như kết quả thí nghiệm của các tác giả khác (Kumari & cs., 2018) đã khẳng định rằng nguồn nitơ trong môi trường nuôi vi sinh vật ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp IAA. Các nguồn nitơ khác nhau đã được các sinh vật khác nhau khai thác để tối ưu hóa quá trình tổng hợp IAA. Patil & cs. (2011) khi khảo sát khả năng sinh IAA của vi khuẩn nội sinh từ cây mía đã cho thấy, nồng độ IAA cao vượt trội khi thêm NH_4Cl và thấp nhất với $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Chandra & cs. (2018) thông báo rằng nguồn nitơ thích hợp để chủng vi khuẩn CA 2004 tổng hợp nhiều nhất IAA là NH_4NO_3 và cao thịt bò (beef extract), trong khi Emami & cs. (2019) kết luận nguồn nitơ thích hợp để các chủng vi khuẩn tổng hợp IAA là cao nấm men (yeast extract). Tuy nhiên kết quả thí nghiệm của Sridevi & cs. (2008) cho thấy các nguồn nitơ vô cơ trong môi trường nuôi đã làm tăng hàm lượng IAA được tổng hợp bởi chủng vi khuẩn *Rhizobium* spp., các nguồn nitơ hữu cơ làm giảm nồng độ IAA được tổng hợp bởi chủng này do ức chế quá trình chuyển hoá L-tryptophan trong môi trường.

3.4. Ảnh hưởng thời gian nuôi cấy đến khả năng tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3

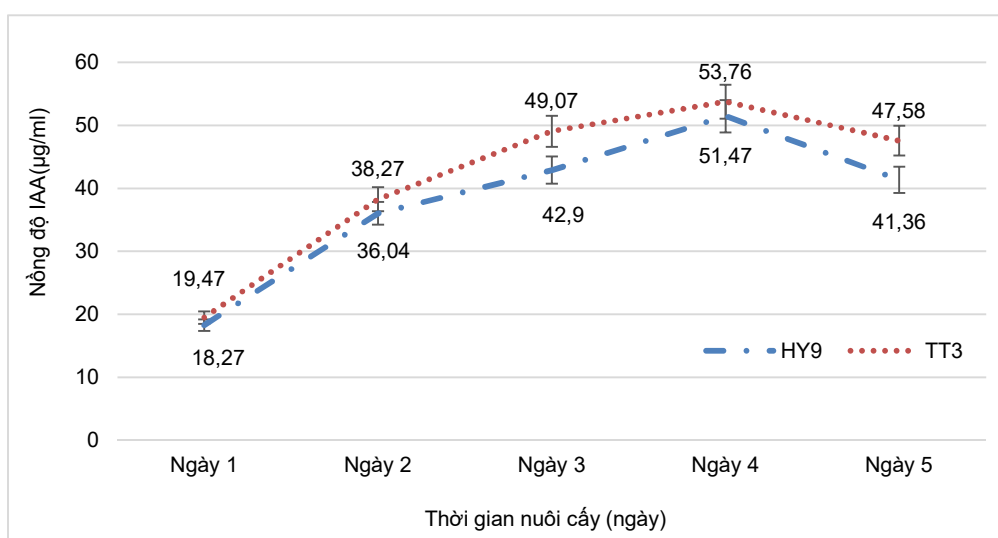
Hai chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3 được nuôi trong môi trường NA lỏng, bổ sung 0,1% L-tryptophan, nồng độ IAA trong môi trường nuôi được xác định sau mỗi ngày nuôi. Nồng độ IAA được tổng hợp trong ngày nuôi cấy thứ nhất là thấp nhất và tăng dần đối với các ngày tiếp theo (Hình 4). Nồng độ IAA được tổng hợp bởi hai chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3 đạt giá trị cao nhất, tương ứng là 51,47 µg/ml và 53,76 µg/ml vào ngày nuôi cấy thứ 4 (tăng gấp 3

lần so với ngày thứ nhất) và giảm dần ở ngày nuôi thứ 5. Trần Trọng Hiếu & Nguyễn Hữu Hiệp (2016) khi nghiên cứu các dòng vi khuẩn nội sinh phân lập từ cây trinh nữ đã chỉ rõ các chủng vi khuẩn tổng hợp IAA cao nhất ở ngày nuôi thứ 4. Các chủng vi khuẩn trong nghiên cứu của Emami & cs. (2019) tổng hợp IAA nhiều nhất sau 96 giờ nuôi trong môi trường có bổ sung L-tryptophan. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của Monita & cs. (2014) và Fouda & cs. (2021) đã công bố nồng độ IAA cao nhất được tổng hợp bởi các chủng vi khuẩn nội sinh sau 7 và 10 ngày.

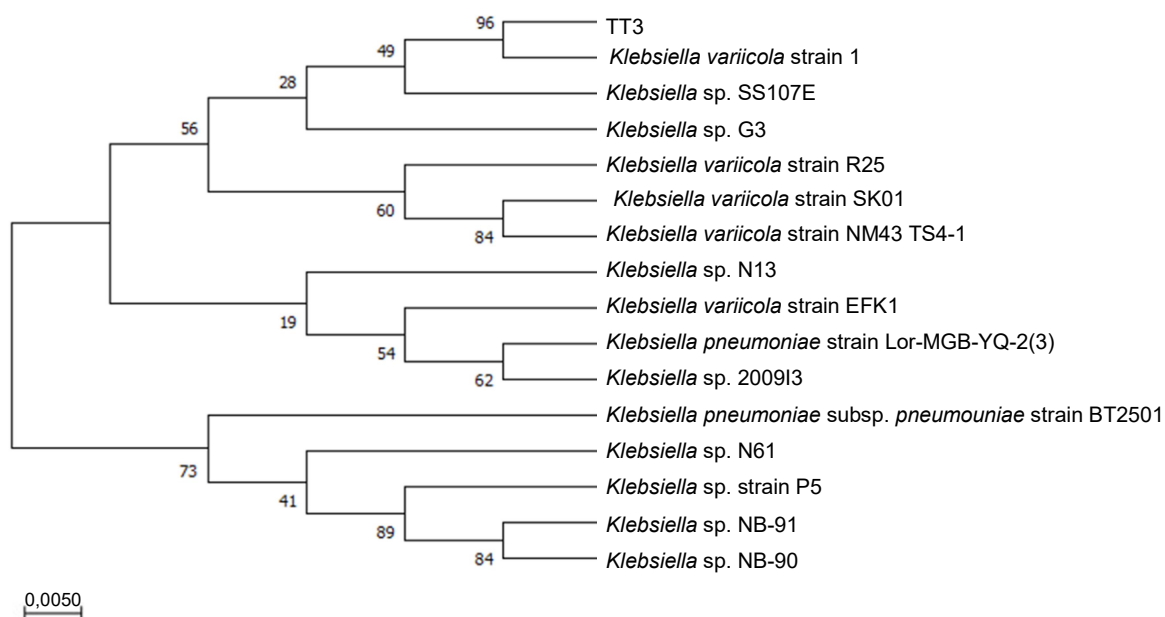
IAA được tổng hợp từ tiền chất là L-tryptophan, các chủng vi sinh vật khác nhau cần có khoảng thời gian khác nhau để chuyển hoá L-tryptophan thành các chất trung gian trong con đường chuyển hoá L-tryptophan trước khi chuyển hoá các chất này thành IAA. Lượng IAA được tổng hợp có liên quan tới tốc độ sinh trưởng hoặc pha sinh trưởng ổn định của vi khuẩn (Duca & cs., 2014). Nồng độ IAA được tổng hợp giảm sau 96 giờ nuôi cấy có thể do tế bào vi khuẩn đã giải phóng enzyme oxy hoá IAA như IAA oxidase và peroxidase vào môi trường (Khamna & cs., 2010).



Hình 3. Ảnh hưởng của nguồn carbon (A) và nitơ (B) đến khả năng sinh IAA của các chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3



Hình 5. Cây phân loại dựa trên trình tự 16S rRNA của chủng vi khuẩn nội sinh TT3

3.5. Kết quả định danh chủng vi khuẩn nghiên cứu

Trong mục này, trình tự nucleotide 16S rRNA của chủng vi khuẩn thí nghiệm TT3 được so sánh với trình tự nucleotide của các chủng vi khuẩn trên GenBank vì không thu được kết quả giải trình tự nucleotide 16S rRNA của chủng vi khuẩn HY9. Đoạn gene 16S rRNA của chủng vi khuẩn TT3 được giải trình tự gồm 1.260 nucleotide. Kết quả so sánh trình tự nucleotide 16S rRNA cho thấy chủng TT3 có quan hệ gần gũi với chủng *Klebsiella variicola* strain 1 (Hình 5). Do đó chủng TT3 được đặt tên là *Klebsiella variicola* TT3. Vi khuẩn *Klebsiella variicola* có tế bào hình que và bắt màu Gram âm.

Vi khuẩn *Klebsiella variicola* đã được nhiều nhà khoa học nghiên cứu và ứng dụng. Lin & cs. (2015) đã tuyển chọn được chủng *Klebsiella variicola* DX120E có khả năng cố định nitơ từ rễ cây mía. Chủng *K. variicola* RBEB3 được phân lập từ lá cây chuối đỏ có khả năng tổng hợp IAA và làm tăng khả năng nảy mầm của hạt cà chua, tăng sinh khối và chiều dài rễ cây cà chua so với hạt cà chua không được xử lý với chủng này (Karthik & cs., 2017). Chủng *K. variicola* IARI-PC4-59 được phân lập từ ngô biểu hiện khả năng cố định nitơ, hoà tan Zn, tổng hợp IAA

và siderophore (Marag & Suman, 2018). Các chủng vi khuẩn thuộc chi *Klebsiella* có khả năng gây bệnh cho động vật và thực vật (Lin & cs., 2015) do đó trước khi sử dụng các chủng thuộc chi này làm chế phẩm phân bón sinh học cần đánh giá tiềm năng gây bệnh hại cây trồng của chúng.

4. KẾT LUẬN

Trong các điều kiện nuôi cấy khác nhau, nồng độ IAA cao nhất của hai chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3 đạt được tại pH = 7 (lần lượt là 42,9 µg/ml và 49,07 µg/ml), 35°C (53,49 µg/ml và 56,73 µg/ml), 4 ngày nuôi (51,47 µg/ml và 53,76 µg/ml).

Nồng độ IAA được tổng hợp bởi chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3 khi nuôi trong môi trường khoáng cơ bản được bổ sung nguồn carbon là saccharose đạt tương ứng là 39,30 µg/ml và 39,81 µg/ml, khi bổ sung nguồn nitơ là NH₄Cl, hàm lượng IAA được tổng hợp bởi hai chủng này đạt 36,84 µg/ml và 39,47 µg/ml.

Chủng vi khuẩn TT3 có tế bào dạng trực khuẩn, Gram âm và được xác định có quan hệ gần với loài *Klebsiella variicola* strain 1 dựa trên phân tích và so sánh trình tự nucleotide 16S rRNA, do đó được đặt tên là *Klebsiella*

variicola TT3. Các chủng vi khuẩn thuộc chi *Klebsiella* có tiềm năng gây bệnh cho cây trồng, nên trước khi sử dụng chúng như phân bón sinh học có thể cần dự đoán khả năng gây bệnh hai cây trồng của chúng.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự tài trợ kinh phí từ đề tài cấp Học viện Nông nghiệp Việt Nam mã số T2022-12-51.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Apine O.A. & Jadhav J.P. (2011). Optimization of medium for indole-3-acetic acid production using *Pantoea agglomerans* strain PVM. *Journal of Applied Microbiology*. 110(5): 1235-1244.
- Bộ Khoa học và Công nghệ (2015). TCVN 10784:2015. Vi sinh vật - Xác định khả năng sinh tổng hợp axit 3-indol-acetic (IAA).
- Chandra S., Askari K. & Kumari M. (2018). Optimization of indole acetic acid production by isolated bacteria from *Stevia rebaudiana* rhizosphere and its effects on plant growth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 16(2): 581-586.
- Duca D., Lorv J., Patten C.L., Rose D. & Glick B.R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 106(1): 85-125.
- Đỗ Tất Lợi (2001). Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học.
- Emami E., Alikhani H.A., Pourbabaei A.A., Etesami H., Sarmadian F. & Motessharezadeh B. (2019). Assessment of the Potential of Indole-3-Acetic Acid Producing Bacteria to manage Chemical Fertilizers Application. *International Journal of Environmental Research*. 13: 603-611.
- Fouda A., Eid A.M., Elsaied A., El-Belely E.F., Barghoth M.G., Azab E., Gobouri A.A. & Hassan S.E.D. (2021). Plant Growth-Promoting Endophytic Bacterial Community Inhabiting the Leaves of *Pulicaria incisa* (Lam.) DC Inherent to Arid Regions. *Plants*. 10(1): 76.
- Glickmann E. & Dessaux Y. (1995). A critical examination of the e specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(2): 793-796.
- Karthik M., Pushpakanth P., Krishnamoorthy R. & Senthilkumar M. (2017). Endophytic bacteria associated with banana cultivars and their inoculation effect on plant growth. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 92(6): 1-9.
- Khamna S., Yokota A., Peberdy J.F. & Lumyong S. (2010). Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. Isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *Eurasian Journal of Biosciences*. 4(4): 23-32.
- Kumari S., Prabha C., Singh A., Kumari S. & Kiran S. (2018). Optimization of Indole-3-Acetic Acid Production by Diazotrophic *B. subtilis* DR2 (KP455653), Isolated from Rhizosphere of *Eragrostis cynosuroides*. *Int. J. Pharm. Med. Biol. Sci.* 7(2): 20-27.
- Lin L., Wei C., Chen M., Wang H., Li Y., Li Y., Yang L. & An Q. (2015). Complete genome sequence of endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E. *Standards in Genomic Sciences*. pp. 10-22.
- Longfei Z., Yajun X., Xin-He L., Changjuan S., Zhenshan D. & Yuliang J. (2015). Screening and characterization of endophytic *Bacillus* and *Paenibacillus* strains from medicinal plant *Lonicera japonica* for use as potential plant growth promoters. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46(4): 977-989.
- Marag P.S. & Suman A. (2018). Growth stage and tissue specific colonization of endophytic bacteria having plant growth promoting traits in hybrid and composite maize (*Zea mays* L.). *Microbiological Research*. 214: 101-113.
- Mohite B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 13(3): 638-649.
- Monita V.P. & Rajesh K.P. (2014). Indole-3-acetic acid (IAA) production by endophytic bacteria isolated from saline dessert, the little runn of kutch. *CIBTech Journal of Microbiology*. 3(2): 17-28.
- Nguyễn Văn Giang, Trần Thị Đào & Trịnh Thị Thúy An (2016). Phân lập và đánh giá đặc điểm sinh học của một số chủng vi khuẩn nội sinh rễ cây nha đam (*Aloe vera*). *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 14(5): 772-778.
- Nguyễn Văn Giang, Trần Thị Đào, Trần Thị Thúy Hà & Nguyễn Thu Trang (2018). Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy tới khả năng sinh tổng hợp indole-3-acetic acid của vi khuẩn *Bacillus sonorensis* LĐ18. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*. 11(96): 90-95.
- Nguyễn Hải Vân & Nguyễn Thị Minh (2017). Nghiên cứu sử dụng vi khuẩn nội sinh phân lập từ các vùng sinh thái khác nhau. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 15(5): 605-618.

- Panigrahi S., Mohanty S. & Chandi C.R. (2020). Characterization of endophytic bacteria *Enterobacter cloacae* MG00145 isolated from *Ocimum sanctum* with Indole Acetic Acid (IAA) production and plant growth promoting capabilities against selected crops. South African Journal of Botany. 134: 17-26.
- Patil N.B., Gajbhiye M., Ahiwale S.S., Gunjal A.B. & Kapadnis B.P. (2011). Optimization of Indole 3-acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus* L1 isolated from Sugarcane. Int.J.of Environmental Sciences. 2(1): 295-302.
- Schulz B.J. & Boyle C. (2006). Soil Biology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. (9): 1-13.
- Sessitsch A., Howieson J.G., Perret X., Antoun H. & Martínez-Romero E. (2002). Advances in Rhizobium research. Critical Reviews in Plant Sciences. 21(4): 323-378.
- Sridevi M., Yadav N.C.S. and Mallaiah K.V. (2008). Production of Indole-acetic-acid by *Rhizobium* Isolates from Crotalaria Species. Research Journal of Microbiology. 3: 276-281.
- Sudha M., Shyamala Gowri R., Prbhavati P., Astapritya P., Yamuna Devi Y. & Saranya A. (2012). Production and optimization of Indole acetic acid by indigenous microflora using agro waste as substrate. Pakistan Journal of Biological Sciences. 15: 39-43.
- Tahsina Jainab, Sharmin Sultana (2021). Effects of Cultural Conditions on the Production of Extracellular Protease by *Bacillus circulans* Isolated from Dried Fish. Journal of Microbiology Research. 11(2): 33-39.
- Trần Trọng Hiếu & Nguyễn Hữu Hiệp (2016). Phân lập và khảo sát đặc tính của vi khuẩn nội sinh ở cây trinh nữ (*Mimosa pudica* L.) tại tỉnh Trà Vinh. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 46: 23.
- Trần Thị Tuyết & Nguyễn Văn Giang (2017). Phân lập và đánh giá một số đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn nội sinh từ rễ cây nghệ (*Curcuma longa* L.). Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam. 9(82): 76-81.
- Xiaofei S., Hu P., Maoxing L., Xiaolou M. & Hong D. (2011). *Lonicera japonica* Thunb: Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine. Journal of ethnopharmacology. 138(1): 1-21.