

SELECTION AND DETERMINATION OF BIOLOGICAL CHARACTERISTICS BACTERIA STRAINS CAPABLE OF PRODUCING INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA)

Do Tat Thinh^{1*}, Le Xuan Son¹, Tran Thi Nhan¹, Nguyen Thi Kim Oanh¹, Nguyen Van Hieu²

¹Institute of Tropical Ecology - Vietnam-Russian Tropical Centre, ²Institute of Biotechnology - VAST

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 09/6/2023	Indole-3-acetic acids (IAA) are phytohormones belonging to the auxins. IAA is produced by groups of microorganisms living in the rhizosphere, such as <i>Pseudomonas</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Bacillus</i> , and <i>Serratia</i> . Among 132 bacterial strains isolated from soil samples collected at nature reserves of Bat Xat, Kon Chu Rang and national parks Phia Oac - Phia Den of Vietnam capable of producing IAA, 14 strains are capable of producing IAA >20 ug/ml. A study on the biological characteristics of those two strains showed that they could grow well on carbon sources such as D-glucose, D-mannitol, D-fructose, D-raffinose and Saccharose, and nitrogen sources such as L-tryptophan, L-tyrosine, meat extract, peptone and NH ₄ NO ₃ . Favorable temperature and pH for their growth were established, i.e. temperatures of 15-37°C, and pH of 5 to 9. All two strains can produce extracellular enzymes such as amylase, cellulase and protease. Classification based on 16S rRNA gene sequences revealed high similarity (>99%) between our strains and the GenBank reference, i.e. strain PPM4.11(OQ134060) is homologous to <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC13047(NR118568) and strain PPM4.5 (OQ149978) is homologous to <i>Priestia megaterium</i> strain NBRC15308 (NR112636). The PPM4.5 and PPM4.11 strains increased the mean germination of green mustard seeds by 10% and 10.67% and water spinach seeds by 7.67% and 5.33%.
Revised: 04/8/2023	
Published: 04/8/2023	
KEYWORDS	
Indole-3-acetic acid (IAA)	
Auxin	
Bacillus	
Biological characteristics	
Root zone bacteria	

TUYỂN CHỌN VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG SINH INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA)

Đỗ Tất Thịnh^{1*}, Lê Xuân Sơn¹, Trần Thị Nhân¹, Nguyễn Thị Kim Oanh¹, Nguyễn Văn Hiếu²

¹Viện Sinh thái Nhiệt đới - Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

²Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 09/6/2023	Indole-3-acetic acid (IAA) là một loại phytohormone tăng trưởng thực vật thuộc họ auxin. IAA có thể sinh ra bởi một số nhóm vi sinh vật sống ở vùng rễ như: <i>Pseudomonas</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Bacillus</i> và <i>Serratia</i> . Kết quả kiểm tra khả năng sinh IAA của 132 chủng vi khuẩn có nguồn gốc phân lập từ các mẫu đất thuộc khu bảo tồn thiên nhiên Bát Xát, Kon Chu Răng và vườn quốc gia Phia Oắc – Phia Đén của Việt Nam đã thu được 14 chủng có khả năng sinh IAA > 20 mg/L. Hai chủng vi khuẩn PPM4.11 và PPM4.5 có khả năng sinh IAA được lựa chọn để nghiên cứu đặc điểm sinh lý, sinh hoá và định danh dựa trên trình tự gen 16S rRNA. Kết quả cho thấy cả 2 chủng đều đồng hóa được đa dạng các nguồn đường D-glucose, D-mannitol, D- fructose, D-raffinose và saccharose, với nguồn nitơ là L-tryptophan, L- tyrosine, cao thịt, peptone, NH ₄ NO ₃ ; phát triển tốt ở 15-37°C, pH từ 5 đến 9 và cả 2 chủng có khả năng sinh một số enzyme ngoại bào như: amylase, cellulase và protease. Trình tự gen 16S rRNA của 2 chủng cho thấy có độ tương đồng cao (>99%) với các gen 16S rRNA của các chủng bao gồm: chủng PPM4.11 (OQ134060) tương đồng với chủng <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC13047 (NR118568) và chủng PPM4.5 (OQ149978) tương đồng với chủng <i>Priestia megaterium</i> NBRC15308 (NR112636). Chủng PPM4.5 và PPM4.11 đã làm tăng mức độ nảy mầm trung bình của hạt rau cải 10% và 10,67% và rau muống là 7,67% và 5,33%.
Ngày hoàn thiện: 04/8/2023	
Ngày đăng: 04/8/2023	
TỪ KHÓA	
Indole-3-acetic acid (IAA)	
Auxin	
Bacillus	
Đặc điểm sinh học	
Vi khuẩn vùng rễ	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.8098>

* Corresponding author. Email: dotatthinh16@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Vi khuẩn Rhizobacteria là những vi sinh vật có khả năng thúc đẩy tăng trưởng thực vật (PGPR), chúng có khả năng xâm chiếm rễ hoặc vùng rễ của cây sau khi được nhiễm hoặc tiếp xúc vào rễ của cây con. Một số nghiên cứu đã chỉ ra, sự có mặt của nhóm vi sinh vật này có tác dụng làm tăng cường sự phát triển của cây. PGPR có thể thúc đẩy tăng trưởng thực vật theo cơ chế trực tiếp và gián tiếp. Một trong những cơ chế thúc đẩy tăng trưởng thực vật là tổng hợp các phytohormone như axit indole-3-acetic (IAA), gibberellin... [1], [2]. IAA được biết đến là một phytohormone thuộc họ auxin có ảnh hưởng đến các chức năng của thực vật bao gồm sự phân chia, mở rộng và biệt hóa tế bào thực vật, kích thích sự nảy mầm của hạt và củ, tăng tốc độ phát triển của bộ rễ, kiểm soát các quá trình sinh trưởng, hình thành rễ bên và rễ ngẫu nhiên làm trung gian phản ứng với ánh sáng, trọng lực và huỳnh quang, ảnh hưởng đến quang hợp, hình thành sắc tố, sinh tổng hợp của nhiều chất chuyển hóa và khả năng chống lại các điều kiện căng thẳng [3]-[5].

Trong quá trình sinh trưởng của thực vật, ngoài lượng IAA nội sinh, thực vật còn nhận được một lượng IAA ngoại sinh từ các nhóm vi sinh vật sống ở vùng rễ như: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Bacillus* và *Serratia*.... Các vi sinh vật từ vùng rễ và rễ cây có khả năng sản xuất axit indole axetic (IAA) dưới dạng chất chuyển hóa thứ cấp từ nguồn cung cấp là các tiền chất có sẵn trong các chất dinh dưỡng như cao thịt, pepton hoặc do rễ cây tiết ra [6]-[8]. Việt Nam là nước nhiệt đới gió mùa, khí hậu nóng ẩm nên hệ sinh thái rừng tự nhiên chứa đa dạng sinh học rất phong phú về động, thực vật và vi sinh vật. Trong đó, khu hệ vi sinh vật đất, bao gồm cả vi sinh vật vùng rễ, là nguồn gene quý có tiềm năng ứng dụng cao trong nhiều lĩnh vực kinh tế. Tuy nhiên, cho đến nay mới chỉ có một số công bố ở trong nước về khảo sát khả năng sinh IAA của vi sinh vật phân lập từ vùng rễ của các cây trồng như cà phê, sắn, lúa, chuối, phong lan và môi trường đặc thù khác như thủy vực, mà chưa có công bố về kết quả nghiên cứu vi sinh vật của rừng tự nhiên có khả năng sinh IAA. Do đó, bài báo này trình bày một số kết quả nghiên cứu tuyển chọn, xác định đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn có khả năng sinh IAA được phân lập từ các mẫu đất thu thập tại các khu bảo tồn thiên nhiên Bát Xát, Kon Chư Răng và vườn Quốc gia Phia Oắc – Phia Đén của Việt Nam.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Các chủng vi khuẩn nhận từ bộ sưu tập chủng giống phòng Sinh thái môi trường Quân sự, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga được phân lập từ mẫu đất vùng rễ cây trong các chuyên công tác thuộc đề tài E-1.2 và E-1.5 tại các khu bảo tồn thiên nhiên và vườn quốc gia Bát Xát, Phia Oắc – Phia Đén, Kon Chư Răng. Hạt giống rau cải và rau muống thái lá tre VN.77 nhận từ công ty TNHH giống cây trồng Lucky.

2.2. Môi trường

- Môi trường Luria-Bertani (LB) (g/L): Cao nấm men 5; trypton 10; NaCl 10; nước cất 1000 ml, pH 7.
- Môi trường khoáng cơ bản (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1; K_2HPO_4 0,5; nước cất 1000 ml.
- King B (g/L): Peptone 20; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5; K_2HPO_4 1,5; Glycerol 10 ml; Agar 20; nước cất 1000 ml, pH 7.
- Môi trường ISP9 (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,46; KH_2PO_4 2,38; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5,65; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1; Vi lượng B 1 ml; Agar 20; nước cất 1000 ml; pH 7,0.
- Môi trường MT2 (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,64; KH_2PO_4 2,38; K_2HPO_4 5,65; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1; Vi lượng 1 ml; Agar 20; nước cất 1000 ml; pH 6,8.
- Ashby-Manitol (g/L): Manitol 20; K_2HPO_4 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2; NaCl 0,2; K_2SO_4 0,1; CaCO_3 5; tryptophan 0,5; nước cất 1000 ml; pH 6,8.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Xác định hàm lượng indole-3 acetic acid (IAA)

Lên men vi khuẩn trong môi trường LB có bổ sung tryptophan nồng độ 1 g/l ở 30°C trong 24 giờ, ly tâm thu dịch nổi loại sinh khối tế bào, dịch nổi sử dụng xác định nồng độ IAA theo phương pháp của Brick và cộng sự (1991) [9] và định tính IAA trên bản silicagel theo tỉ lệ dịch lên men: etyl axetat (1:2, v/v). Dịch sau khi bổ sung etyl axetat được lắc mạnh, để yên trong 10 phút, IAA có trong môi trường được chiết sang dịch etyl axetat, tách phần etyl axetat có chứa IAA được chạy sắc kí trên bản silicagel có kích thước 6 cm x 12 cm, cùng với chất chuẩn IAA (100µg/ml) với hệ đệm 200 ml bao gồm etyl axetat: chloroform: axit formic (55:35:10, v:v:v) sử dụng dung môi chạy và thuốc thử Salkowski làm chất hiện.

2.3.2. Xác định khả năng phân giải các hợp chất hữu cơ

Các chủng vi khuẩn cấy chấm điểm trên môi trường khoáng cơ bản có bổ sung các cơ chất 1% (w/v) như: tinh bột tan, casein và carboxymethyl cellulose (CMC). Sau 72 giờ ở nhiệt độ 30°C, xác định hoạt tính enzym ngoại bào bằng các dung dịch thuốc thử tương ứng: Lugol 1% (w/v) với môi trường chứa tinh bột; Trichloroacetic acid 5% (w/v) với môi trường chứa casein; Congo đỏ 1% (w/v) đối với môi trường chứa CMC [10].

2.3.3. Nghiên cứu đặc điểm hình thái và phân loại

Nghiên cứu đặc điểm sinh học dựa theo khóa phân loại Stanley và cộng sự (1989) [11]. DNA tổng số của các chủng được tách theo phương pháp của Sambrook [12]. Gen 16S rRNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR, sử dụng cặp mồi GR1: 5'-GGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3' và GF1: 5'-TAACACATGCAAGTCGAACG-3'. Sản phẩm sau phản ứng PCR được kiểm tra trên gel agarose 1% (w/v) và gửi đọc trình tự tại công ty Macrogen (Hàn Quốc). Trình tự gen 16S rRNA được so sánh với trình tự gen tương ứng trên cơ sở dữ liệu GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Sơ đồ phân loại của các chủng vi khuẩn được xây dựng dựa trên phần mềm CLC DNA Workbench 8.0.

2.3.4. Đánh giá ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn đến sự nảy mầm của hạt rau cải và rau muống

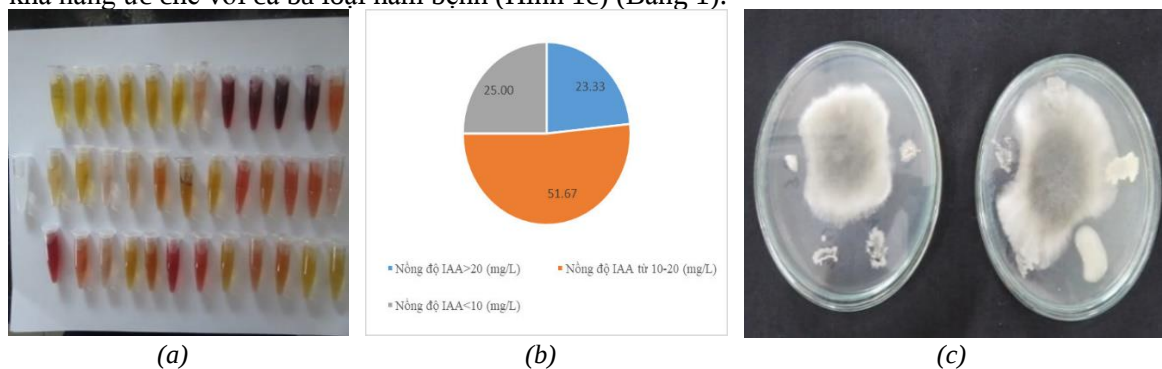
Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được nuôi tăng sinh riêng biệt trong các bình tam giác 250 mL chứa 50 ml dịch môi trường LB ở 30°C trong 72 giờ. Chuyển 50 ml dịch nuôi vào ống Falcon, ly tâm 6.000 vòng/phút trong 5 phút, loại bỏ phần nước bên trên thu sinh khối. Tiếp tục cho nước muối sinh lý đã khử trùng vào, tiến hành ly tâm loại bỏ phần nước bên trên, lặp lại 3 lần để loại bỏ hoàn toàn môi trường nuôi cấy thu sinh khối vi khuẩn. Xác định mật độ tế bào và hiệu chỉnh dung dịch vi khuẩn về nồng độ 10^5 CFU/ml. Tiếp theo bổ sung CMC vào dung dịch vi khuẩn với tỉ lệ 0,5% (w/v). Ngâm hạt rau vào trong dung dịch huyền phù các chủng vi khuẩn và CMC đã chuẩn bị trong 4 giờ, sau đó chuyển 100 hạt rau vào đĩa Petri chứa sẵn giấy lọc đã tiệt trùng và được làm ướt sẵn với nước cất tiệt trùng. Nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự nhưng hạt rau chỉ được ngâm với nước cất tiệt trùng thay cho dịch huyền phù vi khuẩn. Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Các đĩa petri chứa hạt được để yên ở điều kiện tối của phòng thí nghiệm. Quan sát và ghi nhận số hạt nảy mầm trong tổng số 100 hạt thử nghiệm sau 6 ngày thí nghiệm, phương pháp được mô tả bởi Phi và cộng sự (2008) [13].

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Khả năng sinh IAA của các chủng vi khuẩn

Từ bộ sưu tập vi sinh vật của phòng Sinh thái môi trường Quân sự, được bảo quản ở -80°C, 132 chủng vi khuẩn đã được hoạt hóa và đánh giá khả năng sinh IAA. Kết quả thể hiện qua hình 1 (a) cho thấy, trong số 132 chủng vi khuẩn, đã tuyển chọn được 60 chủng có khả năng sinh IAA, trong đó có được 14 chủng có khả năng sinh IAA > 20 mg/L, chiếm 23,33%; có 15 chủng vi khuẩn sinh IAA có nồng độ từ 10-20 mg/L, chiếm 25%; và 15 chủng có sinh IAA < 10 mg/L, chiếm 51,67% (Hình 1b).

Trong số 14 chủng có khả năng sinh IAA cao đã chọn ra 10 chủng có hoạt tính sinh IAA cao nhất và kiểm tra khả năng cố định nitơ, kết quả nhận được có 03 chủng có khả năng cố định nitơ cao với nồng độ NH_4^+ có trong môi trường >3 mg/L, trong số đó chủng PPM4.5 có khả năng cố định nồng độ NH_4^+ 3,92 mg/L cao nhất (Bảng 1). Kết quả kiểm tra khả năng đối kháng của 10 chủng vi khuẩn với 3 chủng nấm *Fusarium* sp.; *Colletotrichum* sp. và *Rhizoctonia* sp. cho thấy, có 5/10 chủng có khả năng kháng với ít nhất 1 chủng nấm kiểm định. Đặc biệt chủng PPM4.7 có khả năng ức chế với cả ba loại nấm bệnh (Hình 1c) (Bảng 1).



Hình 1. Hoạt tính sinh học của một số chủng vi khuẩn (a) Khả năng sinh IAA trên môi trường Ashby- Manitol có bổ sung tryptophan 0,5 g/L; (b) Biểu đồ khả năng sinh IAA của các chủng vi khuẩn và (c) khả năng kháng nấm *Rhizoctonia* sp.

Bảng 1. Khả năng sinh hoạt chất sinh học của 10 chủng vi khuẩn

Kí hiệu chủng	Nồng độ IAA (mg/L)	Nồng độ NH_4^+ (mg/L)	Khả năng kháng nấm của 10 chủng vi khuẩn		
			<i>Fusarium</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Rhizoctonia</i> sp.
KCRM2.2	23,40	1,59	+	-	+
KCRM3.8	20,76	0,00	-	-	-
BXM1.5	22,68	2,84	+	-	+
PPM4.11	20,18	3,18	-	-	-
PPM4.12	26,45	0,00	-	-	-
PPM4.2	24,78	0,00	-	-	-
PPM3.6	27,78	0,59	+	-	-
PPM4.5	30,05	3,92	+	-	+
PPM4.7	27,61	2,00	+	+	+
PPM4.6	22,52	3,12	-	+	+

Ghi chú: +: có khả năng đối kháng; -: không có khả năng đối kháng

3.2. Ảnh hưởng sinh khối của 10 chủng vi khuẩn đến khả năng nảy mầm của hạt

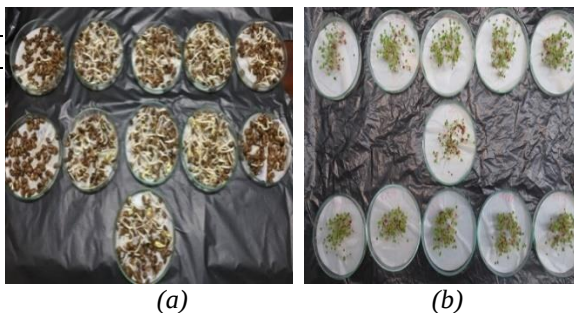
Xử lý hạt rau cải và rau muống với 10 chủng vi khuẩn ở mật độ tế bào đạt $4-6.10^5$ CFU/g hạt rau cải và hạt rau muống. Qua bảng 2 và hình 2 (a và b) cho thấy, khi cho các chủng vi khuẩn tiếp xúc với các hạt rau cải và rau muống đã có sự khác biệt về tỉ lệ nảy mầm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với đối chứng không có vi khuẩn. Đối với thí nghiệm trên hạt rau muống, có 04 chủng vi khuẩn là PPM4.12, PPM4.11, PPM 4.5 và PPM4.7 đã kích thích tăng tỉ lệ nảy mầm hạt rau muống trung bình 4 đến 10% có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với không bổ sung vi khuẩn. Ngoài ra, có 05 chủng gồm PPM4.6, PPM3.6, BXM1.5, KCRM2.2 và KCRM 3.8 đã làm giảm tỉ lệ nảy mầm trung bình của hạt rau muống từ 6,33 đến 22,67%. Đối với thí nghiệm trên hạt rau cải, các chủng PPM4.7, PPM4.5 và PPM4.11 đã kích thích tăng khả năng nảy mầm của hạt rau cải trung bình 8 đến 10,67% có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với mẫu đối chứng. Các chủng vi khuẩn khi tiếp xúc với hạt đã xâm nhập lên bề mặt rễ, nội sinh vào bên trong hoặc tiết các hormone thực vật (IAA) làm tăng số rễ bên, số lông hút và chiều dài rễ dẫn đến tăng khả năng hấp thu nước [1, 14]. Đối với các mẫu thí nghiệm, các hạt rau muống và rau cải khi tiếp xúc với chủng vi khuẩn, tỉ lệ nảy mầm thấp hơn so với thí nghiệm không có vi khuẩn, nguyên nhân do

nồng độ vi khuẩn chưa thích hợp, kết quả này cũng tương tự như trong nghiên cứu của Xa và cộng sự (2020) [15]. Theo Kapilan và cộng sự (2015) mức độ kích thích hay ức chế sự nảy mầm của hạt sau khi hạt được tiếp xúc với vi khuẩn sẽ phụ thuộc vào các yếu tố loại hạt, chủng vi khuẩn, mật độ vi khuẩn, các yếu tố vật lý và hóa học ở bên trong và bên ngoài hạt [4]. Trong số 10 chủng, chúng tôi đã chọn hai chủng PPM4.5 và PPM4.11 để tiếp tục nghiên cứu, bởi 02 chủng cho thấy khả năng kích thích nảy mầm hạt rau cải và rau muống đều tăng so với mẫu đối chứng ở nồng độ $4-6.10^5$ CFU/g hạt.

Bảng 2. Ảnh hưởng sinh khối của 10 chủng vi khuẩn đến khả năng nảy mầm của hạt

Kí hiệu	Hạt rau cải (%)	Hạt rau muống (%)
Đối chứng	87,00 ^c	81,00 ^e
KCRM2.2	81,67 ^b	68 ^c
KCRM3.8	80,33 ^{a,b}	74,67 ^d
BXM1.5	87,33 ^c	62,67 ^b
PPM4.11	97,67 ^e	86,33 ^f
PPM4.12	90,67 ^d	85,00 ^{e,f}
PPM4.2	88,67 ^{c,d}	81,67 ^e
PPM3.6	77,67 ^a	59,33 ^{a,b}
PPM4.5	97,00 ^e	88,67 ^f
PPM4.7	95,00 ^e	91,00 ^f
PPM4.6	81,00 ^b	58,33 ^a
F	*	*
CV (%)	7,77	10,51

*Lưu ý: Trong cùng một cột các số có phần chữ theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) theo phương pháp kiểm định Tukey



Hình 2. Ảnh hưởng của sinh khối 10 chủng vi khuẩn đến khả năng nảy mầm của (a) hạt rau muống và (b) hạt rau cải

3.3. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của 2 chủng vi khuẩn

Đặc điểm sinh học giúp phân biệt giữa các chủng vi khuẩn, theo dõi và đánh giá khi sử dụng. Theo phương pháp mô tả trong khóa phân loại Stanley và cộng sự (1989) [11], đã xác định một số đặc điểm sinh học của 2 chủng vi khuẩn, kết quả được thể hiện ở bảng 3 và 4, hình 3.

Bảng 3. Một số đặc điểm sinh học của 02 chủng vi khuẩn

Đặc điểm	PPM4.5	PPM4.11
Hình thái khuẩn lạc	Tròn, bóng bề mặt lồi và mép răng cưa	Tròn, bóng, nhầy và mép răng cưa
Màu sắc khuẩn lạc	Màu trắng đến vàng	Màu trắng đến vàng
Hình thái tế bào	Que dài	Que ngắn
Nhiệt độ sinh trưởng(°C)	15 – 37	15 – 45
pH sinh trưởng	5-9	4 – 9
Sinh trưởng ở nồng độ muối (%)	≤5	≤3
Khả năng thủy phân		
Casein	+	+
Tinh bột	+	+
CMC	±	+
Nhuộm Gram	+	-

Ghi chú: + Có hoạt tính, ± Có hoạt tính yếu; + Gram (+), - Gram (-)

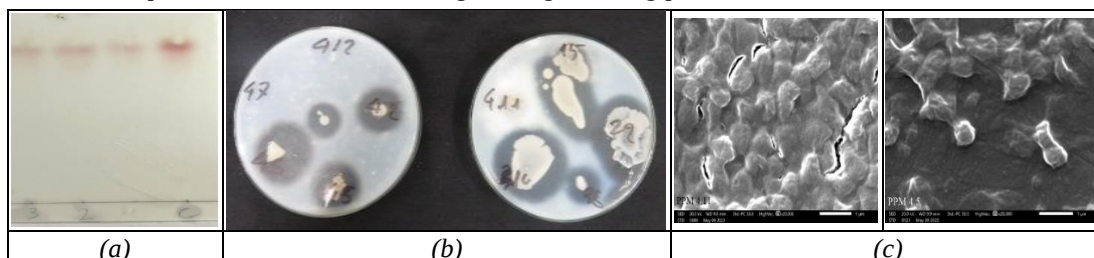
Khả năng đồng hóa các nguồn cacbon của 2 chủng vi khuẩn PPM4.11 và PPM4.5 thể hiện trong Bảng 3 cho thấy, cả 2 chủng đều đồng hóa được D-glucose, D-manitol, D- fuctose, D-raffinose và saccharose. Chủng vi khuẩn PPM4.11 không có khả năng sử dụng được D-xylose. Hai chủng PPM4.11 và PPM4.5 đều có thể sử dụng các nguồn axit amin L-tryptophan và L-tyrosine, nguồn nitơ hữu cơ (cao thịt và peptone) và nguồn nitơ vô cơ (ure, NH_4NO_3) sử dụng trong nghiên cứu (Bảng 4). Ngoài ra, 2 chủng vi khuẩn đều có khả năng sinh trưởng ở nhiệt độ từ

15-37°C, pH môi trường ban đầu từ 5 đến 9, trừ chủng có kí hiệu PPM4.11 cho thấy khả năng phát triển ở pH 4. Từ kết quả Bảng 3 và hình 3b cho thấy các chủng tuyển chọn đều có khả năng cảm ứng sinh các enzym ngoại bào amylase, cellulase và protease để thủy phân các nguồn cơ chất tương ứng, CMC, cellulose và tinh bột. Cùng với khả năng sinh tổng hợp IAA, đặc tính sinh enzym thủy phân ngoại bào cho thấy tiềm năng ứng dụng hai chủng vi khuẩn trong sản xuất phân bón vi sinh sử dụng cho cây trồng.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nguồn cacbon và nitơ đến sự sinh trưởng của 2 chủng vi khuẩn

Nguồn dinh dưỡng	Khả năng phát triển của 2 chủng vi khuẩn	
	PPM4.11	PPM 4.5
Nguồn cacbon		
Đối chứng	-	-
D-raffinose	+	±
D-manitol	+	+
Saccharose	+	+
D-fructose	+	+
D-xylose	-	+
D-glucose	+	+
Nguồn nitơ		
Đối chứng	-	-
L-tryptophan	+	+
L-Tyrosine	+	+
Cao thịt	+	+
Pepton	+	+
(NH ₄) ₂ SO ₄	+	+
NH ₄ NO ₃	+	+
Ure	+	+

Ghi chú: + Có phát triển; ± Phát triển không rõ ràng; - Không phát triển.



Hình 3. Đặc điểm sinh học của 2 chủng vi khuẩn (a) Định tính IAA có trong dịch lên men bằng sắc ký bản mỏng TLC; (b) Hoạt tính protease thủy phân casein và (c) Hình thái tế bào của 2 chủng vi khuẩn.

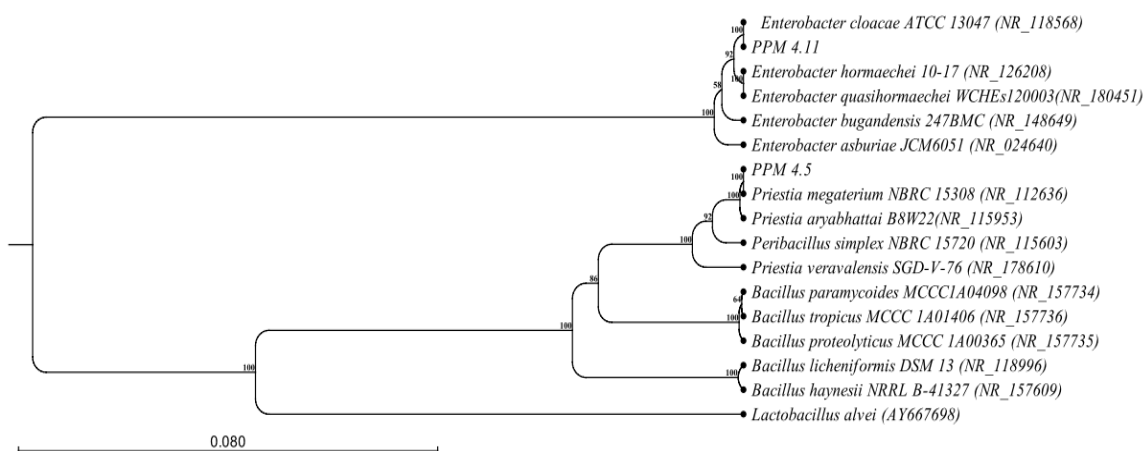
3.4. Phân loại 2 chủng vi khuẩn dựa trên trình tự gen 16S rRNA

Sử dụng phương pháp phân loại dựa trên trình tự gen 16S rRNA cho 02 chủng vi khuẩn PPM4.11 và PPM4.5 cùng với các đặc điểm sinh học đã nghiên cứu trên sẽ giúp quá trình phân loại nhanh và chính xác. Kết quả sau khi giải trình tự gen 16S rRNA và đối chiếu với các gen tương ứng trên cơ sở dữ liệu GenBank, dựng cây di truyền sử dụng gen 16S rRNA của hai chủng PPM4.11 và PPM4.5 thu được với kết quả được thể hiện ở hình 4.

Kết quả sau khi giải trình tự gen 16S rRNA và phân tích, so sánh với các gen tương ứng trên cơ sở dữ liệu GenBank, dựng cây di truyền của hai chủng thu được với kết quả có độ tương đồng cao (>99%) với các gen 16S rRNA của các chủng: chủng PPM4.11 (OQ134060) tương đồng với chủng vi khuẩn *Enterobacter cloacae* ATCC13047 (NR118568) và chủng PPM4.5 (OQ149978) tương đồng với chủng vi khuẩn *Priestia megaterium* NBRC15308 (NR112636) (Hình 4).

Kết quả thu được khá tương đồng với một số nghiên cứu khi cho rằng nhóm vi khuẩn Rhizobacteria xuất hiện nhiều trong vùng rễ của nhiều loại cây trồng như lúa, ớt, cà chua, khoai tây, thuốc lá, sâm, quế... với một số nhóm vi khuẩn điển hình như *Pseudomonas*, *Azotobacter*,

Enterobacter, *Alcaligenes* và *Bacillus* [2, 6, 16, 17]. Khả năng sinh IAA của các loài vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* được biết đến nhiều như *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis* và *B. megaterium* (*Priestia megaterium*) bằng cách sử dụng axit amin tryptophan có trong dịch tiết ra từ rễ cây để tạo ra IAA. Sau đó, IAA do vi khuẩn tạo ra lại được tế bào thực vật hấp thụ và cùng với IAA vốn có của thực vật, tạo ra các con đường truyền tín hiệu khác nhau hỗ trợ cho sự phát triển và tăng sinh của tế bào thực vật. Ngoài ra, các chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus* có nhiều đặc tính sinh học quý như sinh nhiều loại enzyme amylase, protease, cellulase... giúp phân hủy các cơ chất ở dạng khó hòa tan thành dạng hòa tan, cung cấp dinh dưỡng và hỗ trợ hệ thống kháng bệnh trên cây trồng; các chủng *Bacillus* hình thành bào tử, giúp tăng cường khả năng kháng lại một loạt các điều kiện bất lợi [1, 9]. Tuy nhiên, với mục tiêu ứng dụng 02 chủng vi khuẩn PPM4.11 và PPM4.5 để tạo sản phẩm chăm sóc và bảo vệ cây trồng, các nghiên cứu đánh giá tác động trực tiếp của vi khuẩn đối với sự sinh trưởng và phát triển của cây là cần thiết.



Hình 4. Sơ đồ phá hệ của 02 chủng vi khuẩn dựa trên trình tự gen 16S rRNA với các chủng vi khuẩn có họ hàng gần

4. Kết luận

Nghiên cứu đã tiến hành sàng lọc được 60 chủng vi khuẩn có khả năng sinh IAA từ bộ sưu tập 132 chủng vi khuẩn thuộc phòng Sinh thái môi trường Quân sự, Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga. Kết quả khảo sát khả năng sinh IAA cho thấy, có 14/60 chủng có khả năng sinh IAA nồng độ lớn hơn 20 mg/L, chiếm 23,33%; có 15 chủng vi khuẩn sinh IAA có nồng độ từ 10-20 mg/L, chiếm 25%; và 31 chủng có sinh IAA <10 mg/L. Đặc biệt, hai chủng vi khuẩn PPM4.5 và PPM4.11 cho thấy tiềm năng ứng dụng làm tăng mức độ nảy mầm lần lượt của hạt rau cải là 10 và 10,67% và hạt rau muống là 7,67 và 5,33%.

Hai chủng vi khuẩn PPM4.11 và PPM4.5 cho thấy khả năng sinh trưởng tốt trên các nguồn cacbon là D-glucose và D-manitol, nguồn nitơ là cao thịt, peptone và tryptophan, phát triển tốt ở 15-37°C và pH từ 5 đến 9, cả 02 chủng có khả năng sinh một số enzyme ngoại bào như: amylase, cellulase và protease. Được định danh lần lượt là *Enterobacter cloacae* PPM4.11 và *Priestia megaterium* PPM4.5.

Lời cảm ơn

Công trình được sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu tuyển chọn các nhóm vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp hoạt chất auxin indole-3-acetic acid (IAA)”, theo QĐ số 738/QĐ-TTNDVN của Trung tâm Nhiệt đới Việt Nga giao Viện Sinh thái Nhiệt đới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] S. Spaepen, J. Vanderleyden, and R. Remans, “Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling,” *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 31, no. 4, pp. 425–448, 2007.

-
- [2] J. L. Bucio, J. C. Campos-Cuevas, E. H. Calderon, C. V. Becerra, R. F. Rodriguez, L. I. M. Rodriguez, and E. V. Cantero, "Bacillus megaterium rhizobacteria promote growth and alter root system architecture through an auxin and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*," *Molecular Plant-Microbe Interactions - APS Journals*, vol. 20, no. 2, pp. 207-217, 2007.
- [3] E. E. Mike-Anosike, W. Braide, and S. A. Adeleye, "Studies on Indole Acetic Acid (IAA) Production by rhizobacteria and growth promoting potentials," *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, vol. 5, no. 2, pp. 133-140, 2018.
- [4] R. Kapilan and A. C. Thavaranjit, "Promotion of vegetable seed germination by soil borne bacteria," *Archives of Applied Science Research*, vol. 7, no. 8, pp. 17-20, 2015.
- [5] P. J. Gupta, M. J. Trivedi, and H. P. Soni, "Enterobacter cloacae PNE2 As Promising Plant Growth Promoting Bacterium, "Isolated from the Kadi Vegetable Market Waste, Gujarat," *Biosciences Biotechnology Research Asia*, vol. 19, no. 3, pp. 773-786, 2022.
- [6] K. C. Hoang, D. T. Nguyen, H. Q. Tran, T. L. Nguyen, H. C. Le, T. H. H. Tran, M. H. Le, and T. N. H. Tran, "Screening and characterisation of plant growth promoting rhizobacteria isolated from turmeric plant (*Curcuma longa* L.) in Vietnam," *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, vol. 62, no. 5, pp. 54-59, 2020.
- [7] Q. K. Nguyen, N. H. Tran, V. U. Le, M. Le, H. H. Nguyen, C. N. Tran, D. T. Pham, and N. A. X. Ly, "Isolation, selection and identification of phosphate solubilizing, nitrogen xing and IAA synthetizing bacteria from rhizosphere of Ming aralia (*Polyscias fruticosa*)," *Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology*, vol. 5, p. 126, 2021.
- [8] J. E. Perley and B. B. Stowe, "On the ability of *Taphrina deformans* to produce indole acetic acid from tryptophan by way of tryptamine," *Journal of Plant Physiology*, vol. 41, no. 2, pp. 234-237, 1966.
- [9] J. M. Bric, R. M. Bostock, and S. E. Silverstone, "Rapid in situ assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 57, no. 2, pp. 535-538, 1991.
- [10] N. X. Egorov, *Some research methods microbiology* (Nguyen Lan Dung Translate), Science and Technics Publishing House, 1976.
- [11] T. Stanley, M. G. Williams, and J. G. Sharpe, "Bergey's manual of systematic bacteriology," *Williams and Wilkins*, vol. 4, pp. 2452-2492, 1989.
- [12] J. Sambrook and D. W. Russell, *Molecular cloning. A laboratory manual*, 3rd ed, Cold spring harbor laboratory press, NewYork, 2001.
- [13] Q. T. Phi, S.-H. Oh, Y.-M. Park, S.- H. Park, C.-M. Ryu, and S.-Y. Ghim, "Isolation and characterization of transposon-insertional mutants from *Paenibacillus polymyxa* E681 altering the biosynthesis of indole-3-acetic acid," *Journal of Current Microbiology*, vol. 56, no. 5, pp. 524-530, 2008.
- [14] S. Mahalakshmi and D. Reetha, "Assessment of plant growth promoting activities of bacterial isolates from the rhizosphere of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.)," *Recent Research in Science and Technology*, vol. 1, no. 1, pp. 26-29, 2009.
- [15] T. X. Le, T. L. Do, and K. N. Nguyen, "Investigating the seed germination and plant growth promoting capacity on water spinach of some bacterial strains capable in nitrogen fixation and IAA synthesis," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 56, no. 5, pp. 37-46, 2020.
- [16] R. M. dos Santos and E. C. Rigobelo, "Growth-Promoting Potential of Rhizobacteria Isolated from Sugarcane," *Frontiers in Sustainable Food Systems*, vol. 5, pp. 1-12, 2021, Art. no. 596269, doi: 10.3389/fsufs.2021.596269.
- [17] P. Nutaratat, A. Monprasit, and N. Srisuk, "High-yield production of indole-3-acetic acid by *Enterobacter* sp. DMKU-RP206, a rice phyllosphere bacterium that possesses plant growth-promoting traits," *Springer Biotech*, vol. 7, no. 305, pp. 1-15, 2017.