

ĐÁNH GIÁ TIỀM NĂNG KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG THỰC VẬT CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN NỘI SINH PHÂN LẬP TỪ RỄ CÂY HƯƠNG NHU TÍM (*Ocimum sanctum* L.)

Phạm Hồng Hiến¹, Ngô Thị Lan², Nguyễn Văn Giang^{2,*}

¹ Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

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

* Email: nvgiang@vnua.edu.vn

TÓM TẮT

Vi khuẩn nội sinh là những vi khuẩn sống bên trong cây chủ, không gây hại cây chủ. Ngược lại chúng có thể mang lại một số lợi ích cho cây chủ thông qua quá trình tổng hợp các phytohormone, phân giải phosphate khó tan và sinh siderophore, tăng cường hấp thụ dinh dưỡng và tính kháng bệnh của cây chủ. Trong nghiên cứu này, 4 chủng vi khuẩn nội sinh (RH2.1, RH2.2, RH5.1 và RH5.2) đã được phân lập từ rễ cây hương nhu tím và đánh giá các đặc tính kích thích sinh trưởng thực vật. Các chủng vi khuẩn nội sinh này có khả năng phân giải phosphate khó tan, sinh siderophore và tổng hợp IAA với nồng độ từ 36,0; 73,9; 49,95; 8,16 µg/ml. Chủng RH2.2 có khả năng sinh IAA cao nhất sau 72 giờ nuôi cấy tại điều kiện nhiệt độ 30 - 35°C trong môi trường có pH=7, nguồn các bon là glucose và lactose, nguồn nitrogen là peptone. Các chủng vi khuẩn nội sinh này là nguồn vật liệu tiềm năng trong sản xuất các chế phẩm sinh học phục vụ sản xuất nông nghiệp bền vững.

Từ khóa: Vi khuẩn nội sinh, hòa tan phosphate, tổng hợp siderophore, IAA, hương nhu tím.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây hương nhu tím hay hương nhu tía (*Ocimum sanctum* L.) là loại cây nhỏ, sống hàng năm hay lâu năm. Thân và cành có màu tím, có lông quặp. Hoa màu tím, mọc thành chùm, xếp thành vòng từ 6 - 8 hoa/chùm. Hương nhu tím được trồng rất phổ biến ở Việt Nam, từ các vùng đồng bằng đến vùng miền núi cao. Theo y học cổ truyền, hương nhu tím là một vị thuốc có tính ấm, vị cay. Các bộ phận khác nhau (lá, thân, hoa, rễ, hạt và thậm chí toàn bộ cây) của cây hương nhu tím cũng được sử dụng để chữa các bệnh như: Cảm mạo, đau bụng, viêm phế quản, sốt rét, tiêu chảy, kiết lỵ, bệnh ngoài da, viêm khớp, bệnh về mắt, côn trùng cắn, kháng khuẩn, bảo vệ tim mạch...[1]. Trong cây hương nhu tím, tinh dầu chiếm tỷ lệ khoảng 0,2 - 0,3% (khối lượng tươi), chứa các thành phần gồm: Ogenola (45 - 70%), khoảng 20% ete metylic của ogenola và 3%

carvacrol, o.xymen, p.xymen, camphen, limonene, α và β pinene. Ogenola là một vị thuốc rất cần thiết dùng trong nha khoa và trong việc tổng hợp chất vanillin [1].

Vi khuẩn nội sinh là những vi sinh vật sống bên trong cây nhưng không gây hại cho cây chủ, ngược lại còn cung cấp nhiều đặc tính có lợi cho quá trình sinh trưởng và phát triển của cây chủ [2]. Một trong những vai trò quan trọng của vi khuẩn nội sinh đối với sự sinh trưởng của thực vật là khả năng tổng hợp các phytohormone, ví dụ như Indole 3 acetic axit (IAA), một phytohormone thúc đẩy sự tăng trưởng của cây [2, 3]. Bên cạnh đó, vi khuẩn nội sinh còn có khả năng tăng hàm lượng các chất khoáng, tăng khả năng kháng bệnh, chống lại các điều kiện bất lợi của môi trường, tăng tính miễn dịch cho cây trồng. Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu ứng dụng vi sinh vật nội sinh để sản xuất phân bón, thuốc trừ sâu, chế phẩm sinh

học trong nông nghiệp hay dược phẩm ứng dụng trong lĩnh vực y tế và mỹ phẩm. Nghiên cứu này được tiến hành với mục đích tuyển chọn được một số chủng vi khuẩn nội sinh từ cây hương nhu tím có tiềm năng kích thích tăng trưởng cây trồng để ứng dụng trong canh tác cây hương nhu nói riêng, cây dược liệu nói chung theo hướng an toàn, đảm bảo chất lượng sản phẩm ứng dụng trong sản xuất dược liệu.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thu thập mẫu

Các mẫu rễ cây hương nhu tím khỏe mạnh, không có triệu chứng bệnh được thu thập từ Viện Dược liệu. Sau đó, các mẫu được chuyển về Phòng Thí nghiệm thuộc Bộ môn Công nghệ vi sinh, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam để tiến hành nghiên cứu và được bảo quản ở 4°C cho đến khi phân lập.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập vi khuẩn nội sinh

Mẫu rễ cây hương nhu tím sau thu thập được rửa nhiều lần bằng nước sạch để loại bỏ đất bám ở rễ và cắt thành các đoạn nhỏ dài 1 - 2 cm. Các đoạn rễ sau đó được ngâm trong ethanol 70% trong 3 phút, rửa lại bằng nước cất vô trùng, tiếp tục khử trùng bằng NaOCl trong 3 phút, ethanol 70% trong 30 giây và rửa lại bằng nước cất vô trùng để loại bỏ hóa chất bám trên bề mặt rễ. Để kiểm tra sự vô trùng bề mặt, sau khi khử trùng 0,1 ml nước rửa lần cuối cùng được cấy trang trên đĩa petri chứa môi trường Nutrient Agar (NA). Các đĩa này sau đó được đặt trong tủ nuôi ở điều kiện nhiệt độ 30°C trong 48 giờ và quan sát sự phát triển của vi khuẩn. Nếu không có sự phát triển của vi khuẩn thì việc khử trùng mẫu đã đạt yêu cầu. Mẫu rễ cây hương nhu tím sau khi xử trùng xong được cắt thành các đoạn 0,5 cm và đặt trên môi trường NA và ủ ở điều kiện nhiệt độ 30°C. Quan sát sự hình thành khuẩn lạc sau 2 - 4 ngày. Các khuẩn lạc thuần được cấy chuyển trên môi trường LB và được bảo quản trong ống thạch nghiêng ở 4°C để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo [4].

2.2.2. Đánh giá khả năng phân giải phosphate khó tan của các chủng vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn sau khi được làm thuần sẽ được tiến hành nuôi trong ống nghiệm chứa 5 ml môi trường NBRIP lỏng (10 g/l glucose, 5 g/l $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l KCl, 0,1 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ủ ở điều kiện nhiệt độ 30°C trong 4 ngày với tốc độ lắc 200 vòng/phút. Dịch nuôi được ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở điều kiện nhiệt độ 4°C. Phần dịch nổi được thu và xác định hàm lượng PO_4^{3-} bằng phương pháp xanh Molybdate [4], cụ thể như sau: Chuyển 50 μl dịch nổi vào ống nghiệm và bổ sung 3,45 ml nước cất sau đó thêm vào 1,5 ml dung dịch thuốc thử (tỷ lệ mẫu và thuốc thử là 7: 3) và ủ ở điều kiện nhiệt độ 37°C trong 1 giờ. Đo OD ở bước sóng 820 nm và thay giá trị OD vào đường chuẩn $y = 0,2878x + 0,0429$, $R^2 = 0,9919$ để tính nồng độ phosphate được giải phóng vào môi trường

2.2.3. Đánh giá khả năng sinh siderophore

Các chủng vi khuẩn nội sinh được cấy trên môi trường CAS đặc ở 30°C trong 48 giờ. Vi khuẩn sử dụng sắt trong môi trường sẽ tiết vào môi trường hợp chất siderophore làm xuất hiện vùng màu cam xung quanh khuẩn lạc. Môi trường CAS gồm 60,5 mg chrome azurol S (CAS), 72,9 mg hexadecyltrimethyl amoni bromua (HDTMA), 30,24 g Piperazin-1,4-bis (axit 2-ethanesulfonic) (PIPETS), 1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ trong 10 ml HCl 10 mM, agar (0,9% w/v) [5].

2.2.4. Xác định khả năng tổng hợp IAA

Các chủng vi khuẩn mới phân lập được nuôi trong môi trường Nutrient Broth (NB) có bổ sung 1 g/l tryptophan, nuôi ở điều kiện nhiệt độ 30°C và lắc ở điều kiện 200 vòng/phút. Nồng độ IAA trong dịch nuôi vi khuẩn được định lượng bằng thuốc thử Salkowski [6]. Sau 72 giờ nuôi, dịch vi khuẩn được ly tâm ở điều kiện 6.000 vòng/phút trong 10 phút và dịch trong được thu lại. Chuyển 1 ml dịch trong thu được vào các ống nghiệm và trộn với 2 ml thuốc thử Salkowski (300 ml H_2SO_4 98%, 15 ml FeCl_3 0,5 M) lắc đều, để trong bóng tối trong 20 phút ở nhiệt độ phòng để phản ứng tạo màu xảy ra hoàn toàn. Dung dịch được so màu ở bước sóng λ

= 530 nm. Kết quả đo OD của các chủng phân lập được thay vào phương trình đồ thị đường chuẩn $y = 0,0054x + 0,0096$, $R^2 = 0,994$, từ đó tính toán được nồng độ IAA được tổng hợp bởi các chủng vi khuẩn thí nghiệm.

2.2.5. Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp IAA

Ảnh hưởng của pH, nhiệt độ môi trường và thời gian nuôi cấy. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu một nhân tố. Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường NB có bổ sung L-tryptophan (1 g/l) với các giá trị pH môi trường ban đầu là 5, 6, 7, 8 và 9, hàm lượng IAA trong dịch được xác định sau 72 giờ nuôi cấy. Sau khi xác định được pH môi trường thích hợp, khả năng tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn được xác định sau 1, 2, 3, 4 và 5 ngày nuôi cấy.

Ảnh hưởng của nguồn các bon và nitrogen. Các chủng vi khuẩn chọn lọc được nuôi cấy trong môi trường thí nghiệm gồm muối khoáng cơ bản có bổ sung thêm 1% các nguồn các bon (lactose, sucrose, tinh bột, D-sorbitol và mannitol) để xác định ảnh hưởng của nguồn các bon. Để tìm được nguồn nitrogen phù hợp, các chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường có nguồn các bon phù hợp bổ sung 0,1% nguồn nitrogen (peptone, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl và KNO_3) trong 72 giờ ở điều kiện nhiệt độ 30°C. Hàm lượng IAA được xác định ở như đã mô tả tại mục 2.2.4.

2.3. Môi trường

Môi trường khoáng cơ bản để khảo sát ảnh hưởng của nguồn các bon: 2 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,1 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g/l KH_2PO_4 ; 1 lít nước cất. Môi trường khoáng cơ bản để khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitrogen: 1,36 g/l KH_2PO_4 ; 0,03 g/l CaCl_2 ; 2,13 g/l NaH_2PO_4 ; 0,2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10 g/l nguồn các bon (thích hợp với từng chủng vi sinh vật); 1 lít nước cất. Môi trường thạch nutrient agar (NA): 5 g/l peptone; 5 g/l NaCl; 2 g/l cao thịt; 2 g/l cao nấm men; 15 g/l agar. Môi trường nutrient broth (NB): 5 g/l peptone; 5 g/l NaCl; 2 g/l cao thịt; 2 g/l cao nấm men; 1 lít nước cất.

2.4. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu này được thực hiện từ tháng 10/2022 - 5/2023 tại Phòng Thí nghiệm Công nghệ vi sinh, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam và Phòng Thí nghiệm của Viện Bảo vệ thực vật, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập, tuyển chọn các chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng hòa tan phosphate

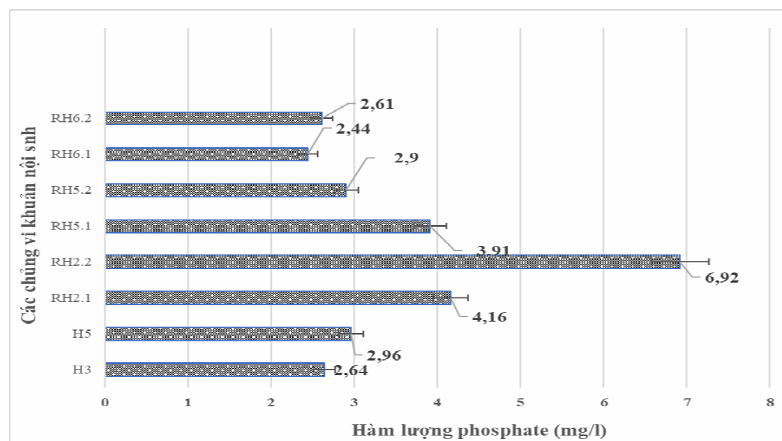
Từ mẫu cây hương nhu tím thu thập từ Viện Dược liệu, 18 chủng vi khuẩn nội sinh khác nhau đã được phân lập trên môi trường LB. Các chủng vi khuẩn nội sinh này được cấy chuyển vào môi trường NBRIP để đánh giá khả năng phân giải phosphate khó tan. Sau 48 giờ nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ 30°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút, tiến hành ly tâm dịch nuôi cấy và thu dịch nổi. Kết quả thu được trên cơ sở so màu theo phương pháp được mô tả tại mục 2.2.2 cho thấy, 10 chủng trong số 18 chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng phân giải được phosphate khó tan là: H1, H9, H3, H5, RH2.1, RH2.2, RH5.1, RH5.2, RH6.1 và RH6.2 (Hình 1). Nồng độ PO_4^{3-} được các chủng vi khuẩn nội sinh này giải phóng dao động 0,15 - 6,92 mg/l. Chủng RH2.2 biểu hiện hoạt tính phân giải phosphate khó tan trong dung dịch mạnh nhất, lượng PO_4^{3-} được giải phóng đạt 6,92 mg/l. Khả năng phân giải phosphate khó tan của chủng H1 là thấp nhất, chỉ giải phóng được 0,15 mg/l PO_4^{3-} , các chủng còn lại biểu hiện khả năng phân giải phosphate khó tan ở mức trung bình so với chủng RH2.2 (Hình 1).

Phospho là nguyên tố dinh dưỡng quan trọng, tham gia vào các quá trình trao đổi chất, hô hấp, quang hợp của cây trồng, cấu trúc của các axit nucleic, các phân tử cao năng lượng ATP, ADP, phospholipid. Phân bón chứa phospho giúp kích thích sự phát triển của rễ, làm cứng cây, cải thiện sự hình thành hoa, đậu hạt và cải thiện chất lượng sản phẩm. Thiếu phospho sẽ ảnh hưởng tới quá trình sinh trưởng và phát triển của cây trồng. Sự thiếu hụt phospho thường được người sản xuất khắc phục bằng cách bón phân lân hóa học. Tuy nhiên, một phần lượng phân lân bón vào đất sẽ bị cố định bởi các cation kim loại như Ca^{2+} , Fe^{3+} hay

Al^{3+} tạo thành các hợp chất phosphate khó tan, làm giảm hiệu quả sử dụng phân lân.

Vi sinh vật sử dụng nhiều phương thức khác nhau như tiết ra các axit hữu cơ hay tổng hợp siderophore. Các axit hữu cơ cùng với các nhóm carboxyl, hydroxyl sẽ chelate các cation kim loại gắn với PO_4^{3-} hay giảm pH môi trường xung quanh từ đó làm tăng lượng PO_4^{3-} được giải phóng. Các hợp chất phospho hữu cơ sẽ được khoáng hóa bởi các enzyme được vi sinh vật tiết ra [7]. Trong thí

nghiệm này, các hợp chất chứa phospho được sử dụng là chất vô cơ nên có thể kết luận các chủng vi sinh vật nội sinh mới được phân lập đã tiết vào môi trường các hợp chất siderophore hoặc tổng hợp các axit hữu cơ để tăng cường khả năng hòa tan phosphate trong môi trường nuôi cấy. Các chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng phân giải phosphate khó tan được đánh giá khả năng tổng hợp siderophore.

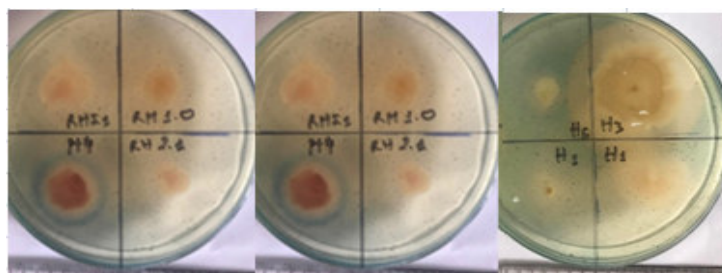


Hình 1. Khả năng phân giải phosphate khó tan của các chủng vi khuẩn nội sinh

3.2. Đánh giá khả năng tổng hợp siderophore

Siderophore là hợp chất do vi khuẩn tiết ra để thu nhận các ion sắt (Fe^{2+}) từ môi trường khi chúng sống trong điều kiện thiếu sắt, vì thế giúp cây trồng vượt qua khó khăn do thiếu sắt. Vi sinh vật gây bệnh cũng cần sắt để sinh trưởng, tuy

nhiên ái lực với sắt của cây trồng và vi sinh vật hữu ích mạnh hơn ái lực với sắt của các vi sinh vật gây bệnh. Điều này làm giảm khả năng sinh trưởng của mầm bệnh trong môi trường [8] và thúc đẩy sự sinh trưởng và phát triển của cây chủ [9].



Hình 2. Khả năng sinh siderophore của một số chủng vi khuẩn nội sinh trên môi trường CAS

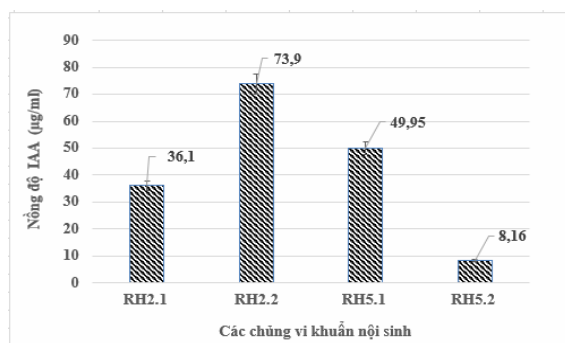
Màu vàng cam xuất hiện xung quanh khuẩn lạc của một số chủng vi khuẩn nội sinh mới được phân lập có khả năng phân giải phosphate khó tan gồm: RH2.1 và RH5.1 (Hình 2). Điều đó chứng tỏ chúng có khả năng sản xuất siderophore, vì theo như mô tả về đặc tính của các chủng vi sinh vật sinh siderophore [9], các vi sinh vật sinh

siderophore sẽ có màu vàng cam trên môi trường CAS.

3.3. Khả năng sinh tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

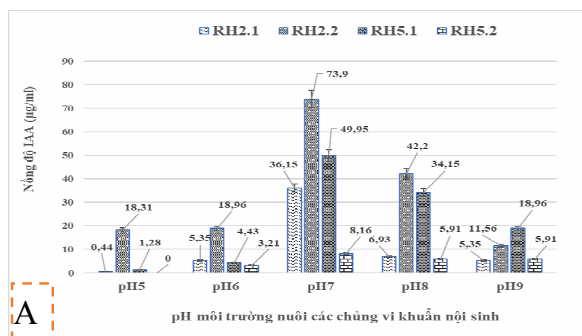
Các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải phosphate khó tan được nuôi trong môi trường NB có bổ sung 1 g/l tryptophan ở điều kiện nhiệt độ

30°C và lắc 200 vòng/phút. Sau 72 giờ nuôi cấy, dịch nuôi cấy các chủng vi khuẩn nội sinh được ly tâm và dịch nổi được thu để xác định nồng độ IAA có trong dịch. Các chủng RH2.1, RH2.2, RH5.1 và RH5.2 có khả năng tổng hợp IAA với nồng độ IAA đạt lần lượt là 36,0; 73,9; 49,95; 8,16 µg/ml. Các chủng vi khuẩn nội sinh này có tiềm năng phân giải phosphate khó tan và tổng hợp IAA được sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo (Hình 3).



Hình 3. Nồng độ IAA được tổng hợp bởi các vi khuẩn nội sinh được tuyển chọn

IAA là hormone kích thích sinh trưởng của cây trồng, được tổng hợp bởi cả cây trồng và vi sinh vật. Vi sinh vật sử dụng một số con đường sinh tổng hợp IAA khác nhau, một chủng vi khuẩn đôi khi cũng sử dụng nhiều hơn một con đường sinh tổng hợp IAA. Nồng độ IAA được tổng hợp phụ



Hình 4. Ảnh hưởng của pH (A) và nhiệt độ môi trường nuôi (B) đến khả năng tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn nội sinh được tuyển chọn

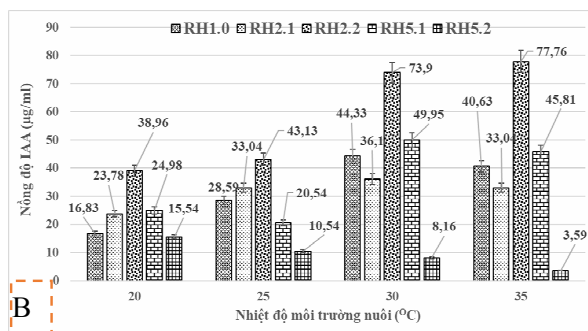
Khi được nuôi cấy trong môi trường có pH = 7, các chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng tổng hợp được hàm lượng IAA nhiều nhất, dao động 8,16 - 73,9 µg/ml (Hình 4A). Trong điều kiện pH của môi trường nuôi cấy các chủng vi khuẩn nội sinh thấp hoặc cao hơn 7, lượng IAA được tổng hợp bởi các chủng vi khuẩn nội sinh này bị giảm đáng kể,

thuộc vào con đường sinh tổng hợp mà chúng vi sinh vật sử dụng. Vị trí phân bố của các gen tham gia vào con đường sinh tổng hợp IAA có thể phân bố trên nhiễm sắc thể hoặc ADN plasmid. Cơ chế điều hòa sinh tổng hợp IAA cũng như các enzyme có thể chuyển IAA từ trạng thái hoạt động sang trạng thái nghỉ/bất hoạt [10]. Do đó, các chủng vi sinh vật nội sinh được phân lập từ các cây trồng khác nhau có khả năng tổng hợp lượng IAA không giống nhau. Vi khuẩn nội sinh được phân lập từ rễ cây nha đam tổng hợp IAA với hàm lượng từ 17,18 - 23,23 µg/ml [11]. Nghiên cứu của Phạm Hồng Hiền và cs (2021) [4] cho thấy, hàm lượng IAA được các chủng vi khuẩn nội sinh phân lập từ rễ cây sù tổng hợp đạt từ 4,34 - 47,02 µg/ml.

3.4. Ảnh hưởng của môi trường nuôi đến khả năng sinh tổng hợp IAA

3.4.1. Ảnh hưởng của pH, nhiệt độ môi trường và thời gian nuôi

Các chủng vi khuẩn nội sinh được tuyển chọn gồm RH2.1, RH2.2, RH5.1 và RH5.2 được nuôi cấy trong môi trường NB có bổ sung 1 g/l tryptophan ở điều kiện nhiệt độ 30°C, lắc 200 vòng/phút với các giá trị pH môi trường ban đầu tương ứng là 5, 6, 7, 8 và 9. Sau 72 giờ nuôi cấy, tiến hành ly tâm dịch nuôi cấy và định lượng IAA (Mục 2.2.4.)



đặc biệt trong điều kiện môi trường axit (Hình 4A).

Ảnh hưởng của điều kiện nhiệt độ môi trường nuôi cấy (20, 25, 30 và 35°C) đến nồng độ IAA được tổng hợp bởi các chủng RH2.1, RH2.2, RH5.1 và RH5.2 đã được đánh giá. Nhiệt độ thích hợp để các chủng vi khuẩn nội sinh tổng hợp IAA là trong

khoảng nhiệt độ 30 - 35°C (Hình 4B). Điều kiện nhiệt độ môi trường nuôi cấy từ 20 - 25°C đã làm giảm hàm lượng IAA được tổng hợp bởi các chủng vi khuẩn nội sinh thí nghiệm.

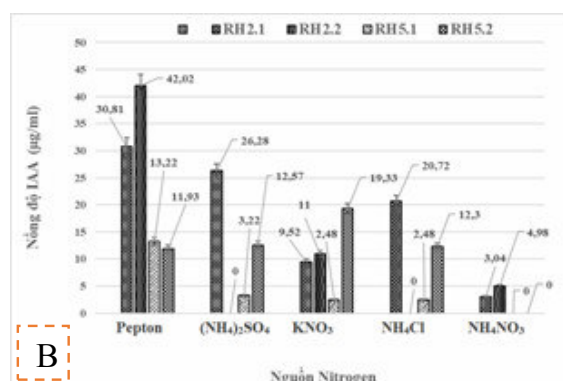
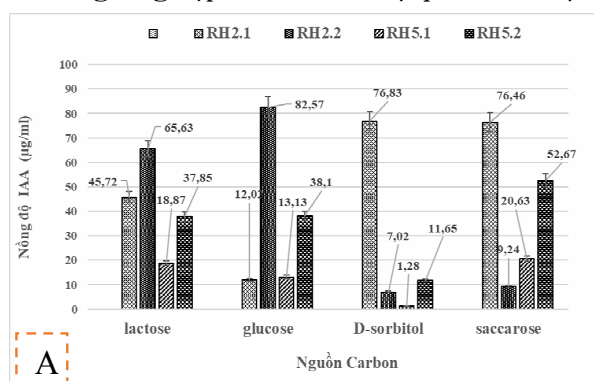
Điều kiện pH thấp đã hạn chế sự phát triển của thực vật, vì trong điều kiện pH thấp, đất dễ bị chua, làm nồng độ một số ion kim loại đạt đến mức độ độc hại cho đất và cây, làm ảnh hưởng tới quá trình sinh trưởng của vi sinh vật [3], [12]. Mohite (2013) [3] đã kết luận, các chủng vi khuẩn tổng hợp IAA cao nhất khi pH môi trường trong khoảng 7 - 9. Lượng IAA được tổng hợp nhiều nhất bởi hai chủng vi khuẩn HY9 và TT3 trong nghiên cứu của Phạm Hồng Hiển và cs (2022) [13], khi pH môi trường nuôi bằng 7. Các chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ rễ cây sù có khả năng tổng hợp IAA nhiều nhất khi được nuôi cấy trong môi trường có pH 7 - 8 [14]. Nghiên cứu của Chandra và cs (2018) [12] cho thấy, các chủng vi sinh vật có thể tổng hợp IAA khi pH môi trường trong khoảng 5 - 9. Adeleke và cs (2022) [2] cho rằng, chủng *Stenotrophomonas indicatrix* BOVIS40 tổng hợp nhiều nhất IAA trong điều kiện pH=7. Có thể khẳng định rằng, pH của đất tác động tới nhiều quá trình sinh học diễn ra trong vùng rễ cây.

Các chủng vi sinh vật sử dụng các con đường tổng hợp IAA được điều hòa bởi hoạt động của các gen và xúc tác bởi các enzyme khác nhau [10], do đó việc thay đổi nhiệt độ dẫn đến thay đổi hoạt động của các gen và enzyme xúc tác phản ứng tổng hợp IAA [15]. Các chủng vi khuẩn nội sinh trong nghiên cứu của Adeleke và cs (2022) [2] có khả năng tổng hợp IAA cao nhất tại pH=7 và nhiệt

độ 22 - 37°C. Nghiên cứu của Mohite (2013) [3] đã chỉ rõ, 30°C là nhiệt độ tối ưu để các chủng vi sinh vật tổng hợp IAA. *Rhizobium* spp. và *Bacillus* spp. có khả năng tổng hợp IAA nhiều nhất tại điều kiện nhiệt độ 37°C [16]. Chandra và cs (2018) [12] cho rằng, nhiệt độ tối ưu để chủng CA 1001 tổng hợp IAA là 37°C. Vi khuẩn nội sinh phân lập từ rễ cây sù tổng hợp IAA nhiều nhất khi được nuôi cấy trong môi trường có pH=7 và 30°C [14]. Chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3 được phân lập từ rễ cây kim ngân có khả năng tổng hợp IAA cao nhất tại điều kiện nhiệt độ 30 và 37°C [13]. Nghiên cứu của Nguyễn Văn Giang và cs (2016) [11] cho thấy, chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ rễ cây nha đam có khả năng tổng hợp IAA cao nhất tại điều kiện nhiệt độ 35°C.

3.4.2. Ảnh hưởng của nguồn các bon và nitrogen trong môi trường nuôi cấy

Các chủng vi khuẩn thí nghiệm (RH1.0, RH2.1, RH2.2, RH5.1 và RH5.2) được nuôi cấy trong môi trường chứa các nguồn các bon gồm: Lactose, glucose, sorbitol và saccharose. Lượng IAA được tổng hợp của các chủng này thay đổi tùy theo nguồn các bon có trong môi trường (Hình 5A). Glucose và lactose là nguồn các bon thích hợp nhất đối với chủng RH2.2, lượng IAA được tổng hợp tương ứng là 82,57 và 65,63 µg/ml và giảm xuống 7,02 và 9,24 µg/ml khi trong môi trường nuôi có sorbitol và saccharose. Ngược lại, sorbitol và saccharose là nguồn các bon tốt nhất đối với chủng RH2.1, hàm lượng IAA được chủng này tổng hợp đạt 76,83 và 76,46 µg/ml.



Hình 5. Ảnh hưởng của nguồn các bon (A) và nitrogen (B) đến hàm lượng IAA được tổng hợp bởi các chủng vi khuẩn nội sinh được tuyển chọn

Các chủng vi khuẩn nội sinh được tuyển chọn được nuôi cấy trong môi trường với các nguồn nitrogen: Peptone, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 và NH_4NO_3 . Sau 72 giờ nuôi cấy, hàm lượng IAA có trong môi trường được xác định. Các chủng vi khuẩn này tổng hợp IAA nhiều nhất khi peptone được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Khi môi trường nuôi cấy được bổ sung các nguồn nitrogen vô cơ, nồng độ IAA được các chủng vi khuẩn nội sinh tổng hợp giảm đáng kể. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và NH_4Cl là thích hợp nhất đối với chủng RH2.1, lượng IAA được tổng hợp cao nhất (26,28 và 20,72 $\mu\text{g/ml}$), KNO_3 là thích hợp nhất đối với chủng RH5.2, nồng độ IAA được chủng vi khuẩn nội sinh này tổng hợp đạt 19,23 $\mu\text{g/ml}$, cao hơn nồng độ IAA được tổng hợp bởi các chủng vi khuẩn nội sinh khác. Nồng độ IAA được các chủng vi khuẩn nội sinh tổng hợp thấp nhất trong môi trường có NH_4NO_3 (Hình 5B).

Nguồn các bon được vi sinh vật sử dụng để tổng hợp các thành phần cần thiết của tế bào và các sản phẩm trao đổi chất thứ cấp nên có ảnh hưởng tới các quá trình sinh tổng hợp của tế bào. Nguồn các bon ảnh hưởng đến hiệu quả tổng hợp IAA của chủng vi sinh vật do đã thay đổi tốc độ các phản ứng sinh hóa của tế bào, từ đó ảnh hưởng tới tốc độ sinh trưởng và tổng hợp các chất trao đổi của tế bào vi sinh vật. Trong nghiên cứu của Panigrahi và cs (2020) [17] lượng IAA được các chủng vi khuẩn nội sinh tổng hợp tăng lên khi saccharose được bổ sung vào môi trường nuôi. Emami và cs (2019) [18] cho rằng, các chủng vi khuẩn nội sinh tổng hợp IAA nhiều nhất khi môi trường được bổ sung glucose, tiếp theo là saccharose. Nồng độ IAA cao nhất được *Stenotrophomonas maltophilia* JVB5 và *Bacillus cereus* T4S tổng hợp khi môi trường có nguồn

saccharose và glucose [2]. Lactose và glucose được xem là nguồn các bon giúp chủng vi khuẩn *Enterobacter* sp. và *Rhizobium* spp. tổng hợp nhiều IAA nhất [19]; nguồn các bon cung cấp năng lượng cho các quá trình sinh học và tăng cường các hoạt động tổng hợp các chất trao đổi thứ cấp của tế bào [12].

Nguồn nitrogen trong môi trường nuôi là nhân tố quan trọng với sinh trưởng và tổng hợp các chất trao đổi của vi sinh vật. Nguồn nitrogen khác nhau đã ảnh hưởng tới quá trình tổng hợp IAA của chúng. Vi sinh vật khai thác nguồn nitrogen thích hợp để tối ưu hóa quá trình tổng hợp IAA. NH_4NO_3 và NH_4Cl là nguồn nitrogen thích hợp với các chủng vi sinh vật nội sinh phân lập từ rễ cây sù [14]. Hai chủng vi khuẩn HY9 và TT3 được phân lập từ rễ cây kim ngân tổng hợp IAA nhiều nhất khi được nuôi trong môi trường có NH_4Cl [13]. Nghiên cứu của Chandra và cs (2018) [12] cho thấy, nồng độ IAA cao nhất được chủng vi khuẩn CA 2004 tổng hợp khi trong môi trường có NH_4NO_3 và thịt bò, nồng độ IAA được tổng hợp bởi hai chủng vi khuẩn CA1001 và CA2003 giảm khi bổ sung nguồn nitrogen vào môi trường nuôi, hai chủng CA1001 và CA2003 sinh trưởng yếu nếu trong môi trường có nguồn nitrogen vô cơ và nồng độ IAA cao nhất khi chủng CA2004 được nuôi trong môi trường có KNO_3 và NH_4NO_3 . Nghiên cứu của Sridevi và cs (2008) [20] cho thấy, các nguồn nitrogen vô cơ trong môi trường nuôi làm tăng nồng độ IAA được chủng vi khuẩn *Rhizobium* spp. tổng hợp, trong khi các nguồn nitrogen hữu cơ là giảm nồng độ IAA được chủng này tổng hợp.

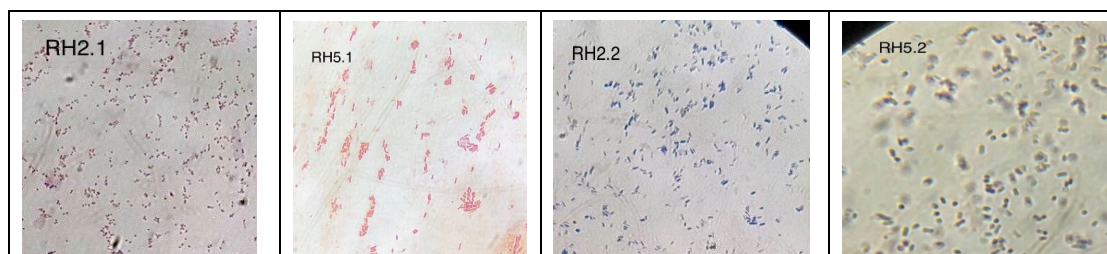
3.5. Đặc điểm hình thái, sinh học của các chủng vi khuẩn nội sinh được tuyển chọn

Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc, hình thái tế bào và một số đặc tính hóa sinh của các chủng vi khuẩn nội sinh tuyển chọn

Chủng Đặc điểm	RH2.1	RH2.2	RH5.1	RH5.2
Bề mặt khuẩn lạc	Trơn, tròn	Trơn, hơi lồi ở giữa khuẩn lạc	Trơn, nhầy	Trơn, hơi lồi ở giữa khuẩn lạc
Màu sắc khuẩn lạc	Trắng sữa	Trắng đục	Trắng đục	Vàng nhạt

Hình thái tế bào	Trực khuẩn	Trực khuẩn	Trực khuẩn	Trực khuẩn
Nhuộm gram	Hồng	Tím	Hồng	Tím
Catalase	+	+	+	+
Methyl Red (MR)	+	+	-	-
Citrate	+	+	+	+
Voges Proskauer (VP)	+	+	+	-

Chú thích: (+) có phản ứng; (-) không có phản ứng



Hình 6. Đặc điểm hình thái tế bào của các chủng vi khuẩn nội sinh được tuyển chọn

Năm chủng vi khuẩn đã được tuyển chọn có hình thái và màu sắc đa dạng (Bảng 1, hình 6). Khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn nội sinh đều có bề mặt trơn, tròn đều, màu trắng và trắng đục hoặc vàng nhạt. Tế bào của hai chủng RH2.2 và RH5.2 có dạng que, bắt màu tím khi nhuộm gram. Tế bào của chủng RH2.1 và RH5.1 có dạng que, bắt màu hồng khi nhuộm gram. Hai chủng RH2.1 và RH2.2 đều phản ứng dương tính với 4 phản ứng hóa sinh catalase, Methyl Red (MR), citrate và Voges Proskauer (VP). Chủng RH5.1 phản ứng dương tính với catalase, citrate và VP, không biểu hiện phản ứng với MR. Chủng RH5.2 phản ứng dương tính với catalase, citrate và không biểu hiện phản ứng MR và VP.

4. KẾT LUẬN

Các chủng RH2.1, RH2.2, RH5.1, và RH5.2 đã được phân lập và tuyển chọn từ rễ cây hương nhu tím đều biểu hiện khả năng phân giải phosphate khó tan, tổng hợp IAA với hàm lượng cao. Nồng độ phosphate và IAA được các chủng này tổng hợp tương ứng là 4,16; 6,92; 3,91; 2,9 và 36,0; 73,9; 49,95 và 8,16 µg/ml.

Trong các điều kiện nuôi cấy *in vitro*, các chủng này có thể sử dụng các nguồn các bon và nitrogen khác nhau để tổng hợp IAA. Sorbitol và saccharose trong môi trường nuôi cấy là nguồn các bon thích hợp nhất đối với chủng RH2.1, saccharose phù hợp nhất đối với chủng RH5.2, lactose và glucose tăng nồng độ IAA được tổng hợp bởi chủng RH2.2. Các chủng vi sinh vật nội sinh được tuyển chọn đều tổng hợp được lượng IAA nhiều nhất khi được nuôi cấy trong môi trường có peptone. Các chủng này cần được tiếp tục nghiên cứu trong điều kiện *in vivo* trên cây trồng để có thể được sử dụng như chế phẩm sinh học kích thích quá trình sinh trưởng thực vật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đỗ Tất Lợi (2001). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nxb Y học. Hà Nội.
- Adeleke B.S, Ayangbenro A.S and Babalola O. O. (2022). *In vitro* screening of sunflower associated endophytic bacteria with plant growth-promoting traits. *Front. Sustain. Food Syst*, 6: 903114.

3. 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.
4. Phạm Hồng Hiển, Vũ Thị Tươi, Vũ Thị Linh, Nguyễn Văn Giang (2021). Phân lập và khảo sát đặc tính kích thích sinh trưởng thực vật của một số chủng vi khuẩn nội sinh từ rễ cây sù. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, số 07(128), tr. 71 - 75.
5. Schwyn B. and Neilands J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160: 47 - 56.
6. Glickmann E. and Y. Dessaux (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(2): 793 - 796.
7. Oteino N., Lally R. D., Kiwanuka S., Lloyd A., Ryan D., Germaine K. J. and Dowling D. N (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Front. Microbiol.*, 6: 745. doi: 10.3389/fmicb.2015.00745
8. Chung H., Park M., Madhaiyan M., Seshadri S., Song J., Cho H., Sa T. (2005). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biology & Biochemistry*, 37(10): 1970 - 1974.
9. Loudon BC, Haarmann D, Lynne A. M (2011). Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *J Microbiol Biol Educ*;12(1): 51 - 3. doi: 10.1128/jmbe.v12i1.249. PMID: 23653742; PMCID: PMC3577196.
10. Patten Cheryl L., Glick Bernard R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid *Can. J. Microbiol.*, 42: 207 - 220, <https://doi.org/10.1139/m96-03>.
11. 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 từ rễ cây nha đam (*Aloe vera*). *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, tập 14, số 5, tr. 772 - 778.
12. 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. *J Genet Eng Biotechnol*, 16(2): 581 - 586. doi: 10.1016/j.jgeb.2018.09.001.
13. Phạm Hồng Hiển, Trần Thị Đào, Tạ Hà Trang, Hoàng Thị Liễu và Nguyễn Văn Giang (2022). Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng tổng hợp IAA của chủng vi khuẩn nội sinh HY9 và TT3. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 20(12): 1640 - 1648.
14. Nguyễn Văn Giang, Vũ Thị Tươi, Vũ Thị Linh, Phạm Hồng Hiển (2021). Ảnh hưởng của môi trường và điều kiện nuôi cấy đến khả năng tổng hợp IAA của một số chủng vi khuẩn nội sinh phân lập từ rễ cây sù (*Aegiceras corniculatum*). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, số 06(127), tr. 49 - 55.
15. Duca D, Lorv J, Patten CL, Rose D, Glick B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106(1): 85 - 125. doi: 10.1007/s10482-013-0095-y.
16. Sudha, M., Shyamala, G. R., Prbhavati, P., Astapriya, 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.
17. 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.
18. 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
19. Basu, P. and Ghosh, A. (2001). Production of indole acetic acid in culture by a *Rhizobium*

species from the root nodules of a monocotyledonous tree, *Roystonea regia*. *Acta Biotechnol.* 21, 65 - 72. doi: 10.1002/1521-3846 (200102)21:1

20. Sridevi M, N. C. S. Yadav and K. V. Mallaiah, (2008). Production of Indole-acetic-acid by *Rhizobium* Isolates from *Crotalaria* Species. *Research Journal of Microbiology*, 3: 276 - 281.

CHARACTERISATION OF POTENTIAL PLANT GROWTH PROPERTIES OF SOME BACTERIAL ENDOPHYTES ISOLATED FROM THE ROOT OF HOLY BASIL (*Ocimum sanctum* L.)

Pham Hong Hien¹, Ngo Thị Lan², Giang Van Nguyen²

¹Vietnam Academy of Agricultural Sciences.

²Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture,

Summary

Bacterial endophytes can offer several benefits to the host plant, particularly growth promotion as phytohormone biosynthesis, phosphate solubilization, siderophore production and stimulation of nutrient adsorption and increase of pathogen resistance of the host plant. In this study, 4 bacterial endophytic strains RH2.1, RH2.2, RH5.1 and RH5.2 isolated from roots of *Ocimum sanctum* L. and their plant growth-promoting properties were evaluated. All of them exhibited phosphate solubilizing ability, siderophore production and IAA-producing activity. At pH=7, the RH2.2 strain showed the highest ability in IAA production after 72 hours of the incubation period, at 30-35°C in a culture medium with carbon and nitrogen sources, respectively glucose, lactose and peptone. These selected endophytic bacteria are potential materials for the production of bioproducts used in agriculture sustainable.

Keywords: *Endophytic bacteria, phosphate solubilizing, siderophore, IAA production, Ocimum sanctum L.*

Ngày nhận bài: 20/11/2023

Ngày chuyển phản biện: 5/12/2023

Ngày thông qua phản biện: 19/12/2023

Ngày duyệt đăng: 10/6/2024