

PHÂN LẬP VÀ KHẢO SÁT ĐẶC TÍNH KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG THỰC VẬT CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN NỘI SINH TỪ RỄ CÂY SÚ

Phạm Hồng Hiền¹, Vũ Thị Tươi²,
Vũ Thị Linh², Nguyễn Văn Giang^{2*}

TÓM TẮT

Vi sinh vật nội sinh đóng vai trò quan trọng giúp cây lấy dinh dưỡng từ môi trường, cố định dinh dưỡng từ hoạt động cộng sinh và sản xuất các chất kích thích sinh trưởng thực vật. Nghiên cứu được tiến hành với mục đích tuyển chọn và đánh giá khả năng tổng hợp IAA, phân giải phosphate khó tan, và sinh siderophore của một số chủng vi khuẩn nội sinh phân lập từ rễ cây sù được thu thập tại cồn Lu, xã Nam Điền, huyện Nghĩa Hưng, tỉnh Nam Định. Kết quả đã phân lập được 10 chủng vi khuẩn nội sinh ký hiệu từ RS4 - RS10, có khả năng sinh IAA với hàm lượng từ 3,01 đến 47,20 µg/mL. Trong đó, 7 chủng (RS3 - RS10) có khả năng phân giải phosphate khó tan, nồng độ PO₄³⁻ được giải phóng vào môi trường nuôi đạt từ 4,65 - 9,24 mg/L. Tám chủng gồm RS2, RS4-RS10 biểu hiện khả năng tổng hợp hợp chất vận chuyển sắt - siderophore. Các chủng vi khuẩn này sẽ là nguồn vật liệu để sản xuất các chế phẩm sinh học.

Từ khoá: Cây sù (*Aegiceras corniculatum* (L.) Blanco), vi khuẩn nội sinh, phân lập và khảo sát, các chất kích thích sinh trưởng thực vật

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, nghiên cứu về vi khuẩn nội sinh được quan tâm trên toàn thế giới. Vi sinh vật nội sinh được xác định bởi khả năng xâm nhập vào các mô thực vật mà không gây ra các triệu chứng hoặc thay đổi hình thái (Strobel *et al.*, 2004). Các nghiên cứu về vi sinh vật nội sinh cho thấy chúng hỗ trợ thực vật trong quá trình sinh trưởng thông qua cung cấp các phytohormones sinh trưởng như auxin (Lee *et al.*, 2004), các hợp chất siderophore (Costa and Loper, 1994), nguồn dinh dưỡng phosphate và kali dễ tiêu do chúng có khả năng hoà tan các hợp chất phosphate và kali bị kết tủa trong đất. Bên cạnh đó, các chủng vi sinh vật nội sinh ngăn các tác nhân gây bệnh tấn công cây trồng do chúng có thể tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn, kháng nấm (Sessitsch *et al.*, 2002).

Rừng ngập mặn là loại rừng cây mọc ở cửa sông lớn ven biển, xuất hiện ở các hệ sinh thái tại các vùng biển có khí hậu nhiệt đới hoặc cận nhiệt đới. Các loài thực vật rừng ngập mặn, đặc biệt cây sù *Aegiceras corniculatum* (L.) Blanco đã được chứng minh là có hoạt tính chống oxy hóa mạnh (Banerjee *et al.*, 2008) và có nhiều công dụng y học như điều trị bệnh thấp khớp, viêm, hen suyễn (Gurudeeban *et al.*, 2012). Mặc dù có tiềm năng cao trong y học, mục đích chính của chúng vẫn là bảo vệ đường bờ biển khỏi bị xói mòn và là khu vực cư trú cho nhiều loài tại hệ sinh thái ven biển. Ở Việt Nam, nghiên cứu về vi

vi khuẩn nội sinh từ một số cây trồng như cây nha đam (Nguyễn Văn Giang và *ctv.*, 2016), cây mía (Đỗ Kim Nhung và Vũ Thành Công, 2011), cây khóm (dứa) (Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Thành Dũng, 2010) đã được triển khai. Tuy nhiên, nghiên cứu vi khuẩn nội sinh từ cây ngập mặn như cây sù (*Aegiceras corniculatum* (L.) Blanco) đang còn hạn chế. Vì thế, nghiên cứu này hướng đến tuyển chọn và khai thác các chủng vi khuẩn nội sinh từ cây sù để sản xuất các chế phẩm vi sinh góp phần kích thích sinh trưởng của cây trồng tại vùng đất nhiễm mặn.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các mẫu rễ cây sù khỏe mạnh, không có triệu chứng bệnh thu thập tại cồn Lu, huyện Giao Thủy và cồn Mỏ, xã Nam Điền, huyện Nghĩa Hưng, tỉnh Nam Định, được bảo quản trong túi zip và chuyển đến phòng thí nghiệm để phân lập vi khuẩn nội sinh theo phương pháp được mô tả bởi Kumar và cộng tác viên (2016).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập và tuyển chọn

Mẫu rễ được rửa nhiều lần dưới vòi nước để loại bỏ đất và được cắt thành những đoạn nhỏ từ 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

¹ Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam (VAAS)

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

* Tác giả chính

70% trong 30 giây và rửa lại bằng nước cất vô cùng để loại bỏ hóa chất bám trên bề mặt rễ. Kiểm tra độ sạch của bề mặt rễ, bằng cách nhỏ dịch rửa bề mặt rễ lần cuối cùng vào môi trường thạch LB và tiến hành cấy trang. Ủ đĩa này trong tủ nuôi trong 48 giờ, nếu không xuất hiện bất kỳ khuẩn lạc nào trên môi trường, chứng tỏ bề mặt mẫu đã được khử trùng sạch. Cắt rễ thành các đoạn 0,5 cm và chuyển vào đĩa môi trường thạch LB nuôi tại 30°C trong khoảng 2 đến 4 ngày (Kumar *et al.*, 2016). Các dòng vi khuẩn được làm thuần, bảo quản trong ống thạch nghiêng và giữ giống trong glycerol (Lương Đức Phẩm, 2004) ở nhiệt độ 4°C.

2.2.2. Khảo sát khả năng sinh IAA của các chủng đã phân lập

Các chủng vi khuẩn được nuôi từ 2 - 5 ngày trong môi trường LB lỏng được bổ sung 0,1% L-tryptophan. Nồng độ IAA trong dịch nuôi vi khuẩn được định lượng bằng thuốc thử Salkowski (Glickmann and Dessaux, 1995). Hút cẩn thận 1 mL phần dịch trong sau khi ly tâm dịch nuôi vi khuẩn cho vào các ống nghiệm và bổ sung 2 mL thuốc thử Salkowski (300 mL H₂SO₄ 98%, 15 mL 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 $\lambda = 530$ nm. Kết quả đo OD của các chủng phân lập được thay vào phương trình đồ thị đường chuẩn $y = 0,0292x + 0,0372$, $R^2 = 0,9976$, từ đó suy ra được nồng độ IAA của các chủng vi khuẩn.

2.2.3. Khảo sát khả năng phân giải phosphate khó tan

Các chủng vi sinh vật được nuôi trong môi trường NBRIP lỏng (g/L: glucose 10; Ca₃(PO₄)₂ 5; MgCl₂.6H₂O 5; MgSO₄.7H₂O 0,25; KCl 0,2; (NH₄)₂SO₄ 0,1; agar 18, pH 7,0) ở 30°C, 3 ngày, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Dịch nuôi được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút, ở 4°C, thu dịch nổi để kiểm tra hàm lượng PO₄³⁻ được giải phóng vào môi trường bằng phương pháp Xanh molipdate (Ames, 1966).

2.2.4. Khả năng tổng hợp siderophore

Nuôi các chủng vi khuẩn trên môi trường thạch CAS. Với chủng vi khuẩn tổng hợp siderophore, môi trường thạch xung quanh khuẩn lạc xuất hiện vòng màu vàng. Môi trường CAS gồm chrome azurol S (CAS) 60,5 mg, hexadecyltrimethyl amoni bromua (HDTMA) 72,9 mg, Piperazin-1,4-bis (acid 2-ethanesulfonic) (PIPETS) 30,24 g, 1 mM FeCl₃.6H₂O trong 10 mM HCl 10 mL, agar (0,9% w/v) (Schwyn and Neilands, 1987).

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

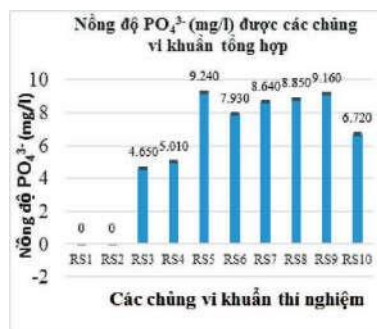
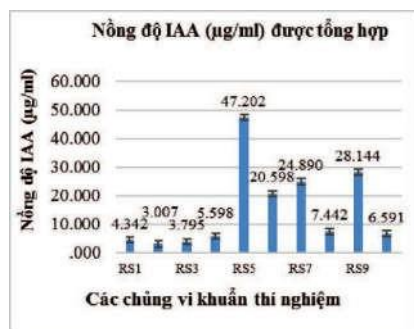
Nghiên cứu này được thực hiện từ tháng 6/2020 đến tháng 5/2021 tại phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam và phòng thí nghiệm của Viện Bảo vệ thực vật, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập, tuyển chọn và khảo sát khả năng sinh IAA các chủng vi khuẩn nội sinh từ rễ cây sù

Từ rễ cây sù thu thập được ở cồn Lu, huyện Giao Thủy và cồn Mỏ, xã Nam Điền, huyện Nghĩa Hưng, tỉnh Nam Định, 10 chủng vi khuẩn nội sinh khác nhau đã được phân lập trên môi trường thạch NA, được tiến hành làm thuần và ký hiệu từ RS1 đến RS10.

Tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng sinh IAA: Mười chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng có bổ sung 0,1 % L-tryptophan ở 30°C và lắc 200 vòng/phút. Sau 48 giờ nuôi tiến hành ly tâm, thu dịch nổi để xác định hàm lượng IAA có trong dịch nuôi. Tất cả 10 chủng thí nghiệm đều có khả năng tổng hợp IAA, trong đó, 5 chủng có khả năng sinh IAA cao nhất là RS5 (47,20 µg/mL), RS9 (28,14 µg/mL), RS8 (16,61 µg/mL), RS7 (24,89 µg/mL), RS6 (20,60 µg/mL) (Hình 1A).



Hình 1. Hàm lượng IAA (µg/mL) và PO₄³⁻ (mg/L) được tổng hợp bởi các chủng vi khuẩn nội sinh

IAA là một chất kích thích sinh trưởng đối với thực vật được tổng hợp bởi thực vật và vi sinh vật. Tuy nhiên các chủng vi sinh vật nội sinh được tuyển chọn từ các cây trồng khác nhau nên lượng IAA được tổng hợp cũng khác nhau. Nguyễn Thu Trang và cộng tác viên (2018) đã phân lập được 4 chủng vi khuẩn nội sinh từ rễ cây hồ tiêu có khả năng tổng hợp IAA từ 24 đến 68 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Trong báo cáo của Nguyễn Thị Thu Hà và cộng tác viên (2009), hàm lượng IAA được các chủng vi khuẩn tổng hợp dao động từ 5,84 - 39,64 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Hàm lượng IAA được tổng hợp bởi các chủng vi khuẩn nội sinh từ rễ cây nha đam đạt từ 17,18 đến 23,23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Nguyễn Văn Giang và *ctv.*, 2016). Herlina và cộng tác viên (2017) đã tuyển chọn được 16 chủng vi khuẩn nội sinh từ cây *Arachis hypogaea*, các chủng này tổng hợp IAA từ 8,50 đến 69,68 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

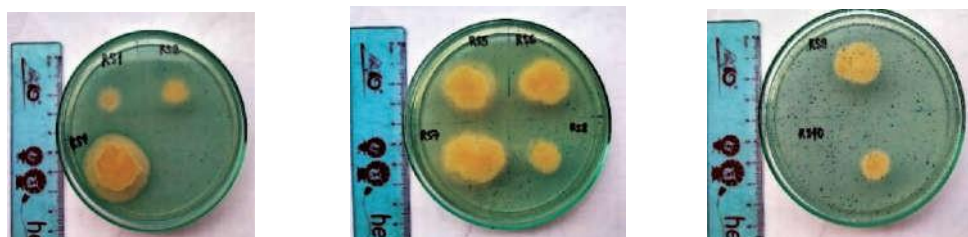
3.2. Khảo sát khả năng phân giải phosphate khó tan của các chủng được tuyển chọn

Cây trồng chỉ có thể hấp thụ và chuyển hoá được dạng phospho dễ tan trong đất. Tuy nhiên, phospho trong đất tồn tại chủ yếu dưới dạng các hợp chất phosphate khó tan, hàm lượng phospho dễ tiêu không cao. Một số loài vi sinh vật có khả năng chuyển hóa các hợp chất phosphate khó tan thành dạng dễ tan, dễ hấp thụ đối với cây trồng bằng cách giảm pH do acid hữu cơ được vi khuẩn tổng hợp (Oteino *et al.*, 2015). Kết quả thí nghiệm (Hình 1B) cho thấy, 8 chủng (RS3-RS10) giải phóng từ 4,60 đến 9,29 mg/L PO_4^{3-} vào môi trường nuôi. Nhiều tác giả khác đã công bố các kết quả khác nhau. Các chủng vi khuẩn nội sinh từ rễ cây hồ tiêu

trong nghiên cứu của Nguyễn Thu Trang và cộng tác viên (2018) giải phóng được ít PO_4^{3-} vào môi trường nuôi, chỉ từ 0,16 đến 3,59 mg/L . Cao Ngọc Điệp và Nguyễn Thành Dũng (2010) đã tuyển chọn được chủng vi khuẩn nội sinh có thể giải phóng 80,26 mg/L PO_4^{3-} vào môi trường nuôi. Oteino và cộng tác viên (2015) cho biết, chủng vi khuẩn nội sinh từ *Pisum sativum* L. có thể giải phóng từ 400 - 1.300 mg/L PO_4^{3-} . Như vậy, có thể nhận thấy các chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ các loại cây khác nhau biểu hiện khả năng phân giải phosphate khó tan khác nhau. Điều này có thể được giải thích bởi cơ chế hoà tan phosphate không giống nhau giữa các chủng vi khuẩn. Một số vi sinh vật hoà tan các hợp chất phosphate bằng cách tiết ra enzyme phosphatase, các chủng khác tổng hợp các acid hữu cơ có khối lượng phân tử thấp làm chua hoá môi trường xung quanh (Khan *et al.*, 2014). Các acid hữu cơ có thể chelate các cation gắn với phosphate bằng các nhóm hydroxyl và carboxyl (Kpombekou and Tabatabai, 1994).

3.3. Khả năng sinh 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 (Chung *et al.*, 2005) và thúc đẩy sự sinh trưởng, phát triển của cây chủ (Brian *et al.*, 2011).



Hình 2. Khảo sát khả năng sinh siderophore của các chủng vi khuẩn nội sinh

Mười chủng được nuôi trên môi trường CAS, màu sắc môi trường xung quanh khuẩn lạc của 8 chủng vi khuẩn gồm các chủng RS2, RS4, RS5, RS6, RS7, RS8, RS9 và RS10 đã chuyển sang màu vàng (Hình 2). Do đó, có thể khẳng định các chủng này đã tổng hợp và giải phóng siderophore vào môi trường vì Chung và cộng tác viên (2005) đã khẳng

định các vi sinh vật sinh siderophore sẽ có màu vàng cam xung quanh khuẩn lạc trên môi trường CAS.

IV. KẾT LUẬN

Từ các mẫu thu được tại tại cồn Lu, xã Nam Điền, huyện Nghĩa Hưng, tỉnh Nam Định, 10 chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập, làm thuần.

Mùiri chủng này đều có khả năng sinh IAA, hàm lượng IAA dao động trong khoảng 3,04 đến 47,20 µg/mL. Bảy chủng (RS3 - RS10) có khả năng phân giải phosphate khó tan, nồng độ PO_4^{3-} được giải phóng vào môi trường nuôi đạt từ 4,65 - 9,24 mg/L. Tám chủng gồm RS2, RS4-RS10 biểu hiện khả năng tổng hợp hợp chất vật chuyển sắt - siderophore.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cao Ngọc Diệp, Nguyễn Thành Dũng, 2010. Đặc tính vi khuẩn nội sinh phân lập trong cây khóm trồng trên đất phèn vĩnh thuận, tỉnh Kiên Giang. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, (15a): 54-63.
- 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. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 14 (5): 772-778.
- Nguyễn Thị Thu Hà, Hà Thanh Toàn, Cao Ngọc Diệp, 2009. Phân lập và đặc tính của những dòng vi khuẩn nội sinh trong một số cây cỏ chăn nuôi. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 7 (2): 241-250.
- Đỗ Kim Nhung, Vũ Thành Công, 2011. Khảo sát khả năng sinh tổng hợp IAA và cố định đạm của vi khuẩn *Gluconacetobacter* sp. và *Azospirillum* sp. được phân lập từ cây mía. *Tạp chí Khoa học*, 18a: 161-167.
- Nguyễn Thu Trang, Trần Thị Thúy Hà, Nguyễn Xuân Trường, Nguyễn Văn Giang, 2018. Phân lập và khảo sát một số đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn nội sinh từ rễ cây hồ tiêu. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 95 (10): 85-90.
- Lương Đức Phẩm, 2004. Công nghệ vi sinh vật. *Nhà xuất bản Nông Nghiệp, Hà Nội*.
- Ames B.N., 1966. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphate. *Methods in Enzymology*, 8: 115-118.
- Banerjee D., Chakrabarti S., Hazra A.K., Banerjee S., Ray J., Mukherjee B., 2008. Antioxidant activity and total phenolics of some mangroves in Sundarbans. *African Journal of Biotechnology*, 7: 805-810.
- Brian L.C., Daniel Haarmann & Aaron Lynne M., 2011. Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *Journal of microbiology & biology education*: 51-53.
- 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.
- Costa J.M., Loper J.E., 1994. Characterization of siderophore production by the biological- control agent *Enterobacter cloacae*. *Mol. Plant. Microbe. Interac.*, 7: 440-448.
- 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.
- Gurudeeban S., K. Satyavani, T. Ramanathan, and T. Balasubramanian, 2012. Antidiabetic effect of a black mangrove species *Aegiceras corniculatum* in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research* Jan-Mar, 3(1): 52-56.
- Herlina L., Pukan K.K., Mustikaningtyas D., 2017. The endophytic bacteria producing IAA (Indole Acetic Acid) in *Arachis hypogaea*. *Cell. Bio. Dev.*, 1: 31-35.
- Khan M.S., Zaidi, A., and Ahmad, E., 2014. *Mechanism of phosphate solubilisation and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms*. In: Phosphate Solubilizing Microorganisms, eds. M. S. Khan, A. Zaidi, and J. Mussarrat (Springer International Publishing), 34-35. doi:10.1007/978-3-319-08216-5_2
- Kpombekou K., and Tabatabai, M.A, 1994. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Sci.* 158: 442-453. doi:10.1097/00010694-199415860-00006
- Kumar, R. Singh, A. Yadav, 2016. Isolation and characterization of bacterial endophytes of *Curcuma longa* L. *3 Biotech*, 6: 60. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4752947/pdf/13205_2016_Article_393.pdf, DOI 10.1007/s13205-016-0393-y.
- Lee S., Flores-Encarnacion M., Contreras-Zentella M., Garcia-Flores L., Escamilla J.E., Kennedy C., 2004. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome C biogenesis genes. *Journal of Bacteriology*, 186: 5384-5391.
- 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.
- Schwyn B. and Neilands J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160: 47-56.
- Sessitsch, A., Howieson, J.G., Perret, X, Antoun, H., and Martínez-Romero, E, 2002. Advances in Rhizobium research. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21: 323-378.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. and Harper, J, 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, 67: 257-268

Isolation and evaluation of biological characteristics of endophytic bacteria from roots of river mangrove

Pham Hong Hien, Vu Thi Tuoi,
Vu Thi Linh, Nguyen Van Giang

Abstract

Endophytes play important roles in improving plant nutrient uptake and synthesis of plant growth regulators. This study was carried out with aim of selecting and evaluating the ability to synthesize indole-3-acetic acid (IAA), solubilize phosphate, and produce siderophores of some endophytic bacteria isolated from roots of river mangrove (*Aegiceras corniculatum* (L.) Blanco) at Lu dune, Nam Dien commune, Nghia Hung district, Nam Dinh province. As a result, 10 endophytic bacterial strains designated as RS4 - RS10, capable of producing IAA with a concentration of 3.01 - 47.20 $\mu\text{g/mL}$ were isolated. Of which, 7 strains (RS3 - RS10) have the ability to solubilize phosphate, the concentration of PO_4^{3-} released into the culture medium reaches 4.65 - 9.24 mg/L. 8 strains (RS2, and RS4 - RS10) have the ability in siderophore production. These bacterial strains will be an important material resource for the production of biological products.

Keywords: River mangrove (*Aegiceras corniculatum* (L.) Blanco), endophytic bacteria, isolation and evaluation, plant growth regulators

Ngày nhận bài: 30/6/2021
Ngày phản biện: 17/7/2021

Người phản biện: PGS.TS. Đinh Duy Kháng
Ngày duyệt đăng: 30/7/2021