

# Nghiên cứu đánh giá khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp Indole-3-acetic acid (IAA) của chủng vi khuẩn *Flavobacterium anhuiense* MN47 phân lập từ đất trồng chè tại Thái Nguyên

Hoàng Thị Lan Anh, Nguyễn Thị Giang, Nguyễn Mạnh Tuấn, Phạm Thị Tuyết Mai, Trần Văn Chí\*

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên, xã Quyết Thắng, TP Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam

Ngày nhận bài 22/4/2024; ngày chuyển phản biện 23/4/2024; ngày nhận phản biện 17/5/2024; ngày chấp nhận đăng 20/5/2024

## Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu là lựa chọn các chủng vi khuẩn tiềm năng có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp Indole-3-acetic acid (IAA). Từ 36 mẫu đất trồng chè thu được tại xã La Bằng, huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên đã tuyển chọn được chủng MN47 có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA với hoạt lực cao nhất lần lượt là 20,41 và 106,08  $\mu\text{g/ml}$ . pH 7,5 và nhiệt độ 30°C là điều kiện thích hợp cho chủng MN47 sinh tổng hợp IAA trong môi trường Ashby có bổ sung 0,1% tryptophan. Kết quả so sánh trình tự gen 16S rRNA của chủng MN47 với các loài đã công bố trên EzTaxon cho thấy chủng MN47 có mức độ tương đồng cao nhất (99,86%) với chủng *Flavobacterium anhuiense* D3<sup>T</sup>. Dựa vào dữ liệu phân tích trình tự gen 16S rRNA, chủng MN47 được xác định thuộc loài *F. anhuiense*. Đây là công bố đầu tiên về khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA của chủng *F. anhuiense* MN47, là nguồn chủng tiềm năng cho phát triển chế phẩm vi sinh ứng dụng trong nông nghiệp.

**Từ khóa:** cố định đạm, đất trồng chè, *Flavobacterium*, tổng hợp IAA, tuyển chọn, vi khuẩn.

**Chỉ số phân loại:** 1.6, 4.6

## 1. Đặt vấn đề

Chè là một trong những cây trồng chủ lực của ngành nông nghiệp Việt Nam nói chung và tỉnh Thái Nguyên nói riêng. Việc canh tác chè tại xã La Bằng, huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên không chỉ mang lại nguồn thu nhập cho nông dân mà còn đóng góp vào mục tiêu xóa đói giảm nghèo của địa phương. Tình trạng suy thoái đất và giảm chất lượng, cũng như năng suất sản xuất của đất đang là một thách thức đáng kể trong canh tác chè [1]. Hiện tượng làm bạc màu đất đai và giảm nhu cầu trồng cây thương mại như chè có thể do ảnh hưởng tiêu cực của việc sử dụng thường xuyên và lâu dài phân bón, thuốc trừ sâu hóa học trên nền đất canh tác nông nghiệp [2]. Thực tế cho thấy, để tăng năng suất cây chè, người nông dân ngày càng phụ thuộc vào phân bón vô cơ, đặc biệt là phân đạm. Việc sử dụng quá liều lượng và không có kiểm soát đối với các loại phân bón vô cơ, trong đó có phân đạm có thể gây ra những vấn đề không mong muốn, bao gồm suy giảm chất lượng chè, axit hóa đất, ô nhiễm kim loại nặng, nén chặt đất và thay đổi hệ vi sinh vật trong đất [3, 4]. Ngoài ra còn tiềm ẩn nhiều rủi ro cho con người [5]. Vì vậy, phân hữu cơ và chế phẩm vi sinh thân thiện với môi trường ngày càng được khuyến khích sử dụng [6]. Việc sử dụng phân hữu cơ vi sinh có chứa vi sinh vật có hoạt tính kích thích sinh trưởng thực vật và cố định nitơ tự do là một giải pháp quan trọng và có ý nghĩa thực tiễn để khắc phục những hạn chế của việc sử dụng phân hóa học, góp phần cải thiện sự bền vững của canh tác nông nghiệp [7].

\*Tác giả liên hệ: Email: tranvanchi@tuaf.edu.vn

## 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Đối tượng

36 mẫu đất trồng chè được thu tại xã La Bằng, huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

**Phương pháp thu mẫu:** Tiến hành thu mẫu đất ở các nương chè tại xã La Bằng, huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên. Mẫu đất được lấy ở độ sâu 6-15 cm [8]. Thu thập 36 mẫu đất (500 g/mẫu) tại các xóm trên địa bàn xã, bao gồm La Cút (8 mẫu), La Nạc (7 mẫu), Rừng Vản (9 mẫu), Tân Sơn (6 mẫu) và Đồng Đình (6 mẫu).

**Phương pháp phân lập vi khuẩn có khả năng cố định nitơ:** 1 g mẫu đất được nghiền mịn và pha loãng trong 10 ml nước muối sinh lý 0,85%, tương ứng với độ pha loãng  $10^{-1}$ . Lấy 1 ml ở độ pha loãng  $10^{-1}$  pha với 9 ml nước muối sinh lý sẽ thu được độ pha loãng ở  $10^{-2}$ . Tiếp tục thao tác như vậy để thu được độ pha loãng ở  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , việc pha loãng được tiến hành trong các ống nghiệm đã vô trùng. Cây trái 50  $\mu\text{l}$  dung dịch đã pha loãng lên môi trường Ashby manitol agar (20 g manitol; 0,2 g  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 0,2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,2 g NaCl; 0,1 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ; 5 g  $\text{CaCO}_3$ ; 15 g Agar; 1000 ml nước cất; pH 7-7,2), ủ ở nhiệt độ 30°C trong 72 giờ [9]. Những khuẩn lạc mọc lên trên môi trường thạch đĩa vô đạm được kết luận sơ bộ là có khả năng cố định nitơ.

# Evaluate the ability of nitrogen fixation and Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis of *Flavobacterium anhuiense* MN47 isolated from tea-growing soil in Thai Nguyen

Thi Lan Anh Hoang, Thi Giang Nguyen,  
Manh Tuan Nguyen, Thi Tuyet Mai Pham, Van Chi Tran\*

Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry - Thai Nguyen University,  
Quyet Thang Commune, Thai Nguyen City, Thai Nguyen Province, Vietnam

Received 22 April 2024; revised 17 May 2024; accepted 20 May 2024

## Abstract:

The goal of this study is to select potential bacterial strains capable of fixing nitrogen and Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis. From 36 tea-growing soil samples collected in La Bang commune, Dai Tu district, Thai Nguyen province, the strain MN47 was selected, with the highest ability to fix nitrogen and biosynthesize IAA of 20.41 and 106.08  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. pH 7.5 and at 30°C are appropriate conditions for strain MN47 to synthesize IAA in Ashby medium supplemented with 0.1% tryptophan. The results of comparing the 16S rRNA gene sequence of strain MN47 with species published on EzTaxon showed that strain MN47 has the highest similarity (99.86%) with *Flavobacterium anhuiense* D3<sup>T</sup>. Based on 16S rRNA gene sequence analysis data, strain MN47 belongs to the genus *Flavobacterium*, with the scientific name *F. anhuiense*. This is the first publication on the ability to fix nitrogen and biosynthesize IAA of *F. anhuiense* MN47, which is a potential source of strains for the development of microbial products for agricultural applications.

**Keywords:** bacteria, *Flavobacterium*, Indole-3-acetic acid biosynthesis, nitrogen fixation, selection, tea-growing soil.

**Classification numbers:** 1.6, 4.6

**Phương pháp xác định khả năng cố định nitơ:** Nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường Ashby lỏng, lắc 180 vòng/phút ở 30°C trong 6 ngày. Sau khi nuôi cấy, dịch được ly tâm để tách vi khuẩn khỏi dung dịch, thu dịch trong. Sử dụng phương pháp so màu với thuốc thử Nessler [10] xác định nồng độ  $\text{NH}_4^+$  được cố định bởi chủng vi khuẩn trong dịch nuôi. Định tính khả năng sinh tổng hợp IAA của vi khuẩn bằng cách bổ sung thuốc thử Salkowski vào dịch nuôi cấy các chủng vi khuẩn, dịch nuôi sẽ chuyển sang màu đỏ nếu có IAA [11].

**Xác định khả năng sinh tổng hợp IAA của các chủng tiềm năng:** Nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường Ashby lỏng có bổ sung 0,1% tryptophan, nuôi lắc (180 vòng/phút) trong tủ tối ở nhiệt độ 30°C trong 72 giờ. Hàm lượng IAA thô sinh ra trong dịch nuôi cấy được xác định bằng phương pháp phản ứng màu với thuốc thử Salkowski tạo sản phẩm có màu, so màu trên máy quang phổ ở bước sóng 530 nm. Hàm lượng IAA sinh ra bởi các chủng vi khuẩn được xác định theo mô tả của E. Glickmann và cs (1995) [12].

**Xác định khả năng sinh enzyme và đồng hóa các nguồn đường của chủng MN47:** Sử dụng bộ kit API ZYM và API 32GN (Biomérieux, Pháp) để xác định các loại enzyme và đồng hóa các nguồn đồng của chủng MN47.

**Xác định ảnh hưởng pH môi trường và nhiệt độ nuôi cấy đến sinh tổng hợp IAA của chủng MN47:** Về pH môi trường, chủng MN47 được cấy vào các ống nghiệm chứa 10 ml môi trường Ashby có bổ sung 0,1% tryptophan có pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 và 8,0 nuôi lắc (150 vòng/phút) trong tủ tối ở nhiệt độ 30°C trong 72 giờ. Hàm lượng IAA thô sinh ra trong dịch nuôi cấy được xác định bằng phương pháp phản ứng màu với thuốc thử Salkowski tạo sản phẩm có màu, so màu trên máy quang phổ ở bước sóng 530 nm. Đối với nhiệt độ nuôi cấy thích hợp, chủng MN47 được nuôi trong 10 ml môi trường Ashby bổ sung 0,1% tryptophan, pH môi trường thích hợp (được lựa chọn dựa trên kết quả thí nghiệm trước), nuôi lắc ở 150 vòng/phút ở các nhiệt độ 20, 25, 30, 35 và 40°C trong 72 giờ. Hàm lượng IAA thô sinh ra trong dịch nuôi cấy được xác định bằng phương pháp phản ứng màu với thuốc thử salkowski tạo sản phẩm có màu, so màu trên máy quang phổ ở bước sóng 530 nm [12].

**Định danh chủng MN47 bằng giải trình tự 16S rRNA:** Chủng MN47 được hoạt hóa trong môi trường dịch thể Ashby ở 30°C với tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 72 giờ. Thu nhận sinh khối tế bào của chủng tuyển chọn và tách chiết DNA tổng số theo phương pháp của J. Sambrook và cs (1989) [13]. Sử dụng cặp mồi 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' và 1492R 5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3' để nhân trình tự gen 16S rRNA của chủng tuyển chọn. Trình tự gen 16S rRNA được đọc thông qua hệ thống Applied Biosystems 3730 xl DNA analyzer sử dụng Big Dye terminator cycle sequencing kit v.3.1 (Macrogen, Hàn Quốc) và được so sánh với dữ liệu công bố trên EzTaxon [14]. Sơ đồ phả hệ được xây dựng trên cơ sở trình tự gen 16S rRNA của chúng và so sánh với các loài gần nhất thông qua phần mềm MEGA 7 [15].

## 2.3. Xử lý số liệu

Tất cả các số liệu thu thập là đại diện của 3 thí nghiệm lặp lại, kết quả được phân tích phương sai một nhân tố trên phần mềm SPSS 20.0 và Microsoft Excel. Sự khác biệt của giá trị trung bình giữa các công thức được đánh giá nhờ kiểm định Duncan ở độ tin cậy 95%.

### 3. Kết quả và bàn luận

#### 3.1. Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp Indole-3-acetic acid

Từ 36 mẫu đất trồng chè thu được tại xã La Bằng, huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên đã phân lập được 67 chủng vi khuẩn có khả năng sinh trưởng trên môi trường Ashby có bổ sung 0,1% (w/v) L-tryptophan. Qua sàng lọc sơ bộ, có 8/67 (chiếm 11,94%) chủng vi khuẩn với khả năng đồng thời cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA (bảng 1).

**Bảng 1.** Đặc điểm hình thái, sinh lý, khả năng cố định nitơ, tổng hợp Indole-3-acetic acid của các chủng vi khuẩn phân lập.

| Ký hiệu chủng | Địa điểm lấy mẫu | Hình thái khuẩn lạc                           | Hình thái tế bào | Gram | Khả năng di động | Khả năng cố định nitơ (µg/ml) | Khả năng tổng hợp IAA (µg/ml) |
|---------------|------------------|-----------------------------------------------|------------------|------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| MN43          | La Cút           | Trong, lồi tròn, bề mặt bóng, không rìa, nhót | Que ngắn         | -    | +                | 3,12 <sup>e</sup>             | 13,00 <sup>e</sup>            |
| MN44          | La Cút           | Trắng sữa, lồi tròn, không rìa, trơn          | Que ngắn         | -    | +                | 0,89 <sup>b</sup>             | 5,60 <sup>b</sup>             |
| MN46          | La Nạc           | Trong, lồi tròn, bề mặt bóng, không rìa       | Que ngắn         | -    | +                | 4,68 <sup>c</sup>             | 13,96 <sup>f</sup>            |
| MN47          | Tân Sơn          | Trắng đục, lồi tròn, có chân giả, bóng, dính  | Que ngắn         | -    | +                | 20,41 <sup>a</sup>            | 101,89 <sup>a</sup>           |
| MN48          | Tân Sơn          | Trong, lồi tròn, có nhân, không rìa           | Cầu              | -    | +                | 4,11 <sup>f</sup>             | 15,79 <sup>e</sup>            |
| MN50          | Rừng Vắn         | Trắng sữa, lồi tròn, không rìa, dính          | Cầu              | -    | +                | 6,92 <sup>d</sup>             | 32,04 <sup>d</sup>            |
| MN51          | Đồng Đình        | Trắng sữa, lồi tròn, không rìa, trơn          | Que ngắn         | -    | +                | 7,84 <sup>c</sup>             | 53,00 <sup>b</sup>            |
| MN57          | Đồng Đình        | Trắng sữa, lồi tròn, không rìa, trơn          | Que ngắn         | -    | +                | 14,16 <sup>b</sup>            | 43,68 <sup>c</sup>            |

Các chữ cái trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức  $\alpha=0,05$ .

Kết quả bảng 1 cho thấy, khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn phân lập được có dạng hình tròn, màu trắng trong, trắng sữa và trắng đục; bề mặt bóng, trơn hoặc dính; không rìa. Tế bào có dạng hình cầu hoặc que ngắn; gram âm và có khả năng di động. Với 8 chủng vi khuẩn phân lập được có hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào khác nhau, nhưng đều có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA. Tuy nhiên, hoạt lực cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA giữa các chủng là khác nhau. Chủng MN44 có hoạt lực yếu nhất, với khả năng cố định nitơ là 0,89 µg/ml, khả năng tổng hợp IAA là 5,60 µg/ml. Chủng MN47 có hoạt lực cao nhất, với khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA lần lượt là 20,41 và 101,89 µg/ml. Chủng MN47 có đặc điểm sinh học tương đồng với mô tả của chi *Flavobacterium* (loài chuẩn *F. aquatile* ATCC 11947<sup>T</sup>) là vi khuẩn hình que, gram âm và có khả năng di động [16]. Cho đến nay, có khoảng hơn 403 loài *Flavobacterium* được mô tả, chúng được phân lập chủ yếu từ đất và nước (<https://lpsn.dsmz.de/genus/flavobacterium>). Các báo cáo gần đây cho thấy, thành viên của chi *Flavobacterium* có các đặc điểm tiềm năng trong hỗ trợ sinh trưởng ở cây trồng. Chủng *Flavobacterium* sp. 72 (trình tự 16S rRNA có mức độ tương đồng 98,52% với *F. saccharophilum* NBRC 15944<sup>T</sup>) bộc lộ cả khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp [17]. Tương tự, kết quả nghiên cứu của T.V. Chi và cs (2022) [18] đã xác định khả năng cố

định nitơ và sinh tổng hợp IAA của chủng *Flavobacterium* sp. MN26 (trình tự gen 16S rRNA tương đồng 98,88% với *F. tistrianum* GB 56.1<sup>T</sup>) với hiệu suất lần lượt là 20,82 và 77,234 µg/ml.

Bên cạnh đó, chủng MN47 thể hiện khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA cao hơn so với các chủng vi khuẩn tiềm năng khác. Từ kết quả bảng 1, hoạt lực chủng MN47 cao hơn với công bố của D.K. Nhung và cs (2011) [19] khi khảo sát khả năng cố định đạm và sinh tổng hợp IAA

của chủng *Azospirillum* spp. và *Gluconacetobacter* spp. được phân lập từ cây mía, với khả năng cố định nitơ tương ứng đạt 8,10 và 8,77 µg/ml, khả năng sinh tổng hợp IAA tương ứng là 17,75 và 2,71 µg/ml. Hoạt lực cố định nitơ và sinh tổng hợp của chủng MN47 cũng cao hơn kết quả công bố của N.A. Huy và cs (2018) [20] khi khảo sát khả năng cố định đạm và sinh tổng hợp IAA của chủng *Bukholderia cenocepacia* PL9 được phân lập từ đất sản xuất lúa - tằm ở các tỉnh Bạc Liêu, Sóc Trăng và Kiên Giang, với khả năng chuyển đổi đạm phân tử thành nitơ dạng ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) đạt 2,71 µg/ml, khả năng sinh tổng hợp IAA đạt 46,46 µg/ml. Thêm nữa, kết quả này còn cao hơn công bố của T.V. Chi và cs (2023) [21] khi xác định khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA của chủng *Agrobacterium deltaense* MN72 (lần lượt là 20,13 và 56,62 µg/ml) được phân lập từ vùng chè tại huyện Phú Lương, tỉnh Thái Nguyên.

#### 3.2. Đánh giá đặc điểm hoá sinh của chủng *Flavobacterium anhuiense* MN47

Nghiên cứu thông tin về các đặc điểm hóa sinh của chủng vi sinh vật là cần thiết, hỗ trợ cho những nghiên cứu ứng dụng liên quan đến việc thiết kế và tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy. Đồng thời, góp phần bổ sung vào cơ sở dữ liệu về nguồn gen của vi sinh vật. Sử dụng kit API đã giúp xác định một số đặc điểm hóa sinh của chủng MN47 (bảng 2).

**Bảng 2. Đặc điểm hóa sinh của chủng *Flavobacterium anhuiense* MN47.**

| Enzyme                             | Khả năng sinh enzyme | Nguồn carbon                     | Khả năng đồng hóa |
|------------------------------------|----------------------|----------------------------------|-------------------|
| Alkaline phosphatase               | +                    | D-glucose                        | +                 |
| Esterase (C4)                      | +                    | Phenylacetic acid                | -                 |
| Esterase lipase (C8)               | +                    | Glycogen                         | +                 |
| Lipase (C14)                       | -                    | D-mannitol                       | +                 |
| Leucine arylamidase                | +                    | L-serine                         | -                 |
| Valine arylamidase                 | +                    | D-maltose                        | +                 |
| Cystine arylamidase                | -                    | Potassium gluconate              | +                 |
| Trypsine                           | -                    | Capric acid                      | -                 |
| D-chymotrypsine                    | -                    | Lactic acid                      | +                 |
| Acid phosphatase                   | +                    | Malic acid                       | +                 |
| Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase     | +                    | Sodium acetate                   | +                 |
| D-galactosidase                    | -                    | Trisodium citrate                | +                 |
| $\beta$ -galactosidase             | -                    | L-alanin                         | +                 |
| $\beta$ -glucuronidase             | -                    | L-rhamnose                       | +                 |
| D-glucosidase                      | +                    | D-ribose                         | +                 |
| $\beta$ -glucosidase               | +                    | 3-hydroxybutyric acid            | -                 |
| N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase | +                    | Phản ứng Voges-Proskauer         | -                 |
| D-mannosidase                      | -                    | Chuyển hóa nitrate thành nitrite | -                 |
| D-fucosidase                       | -                    | Sinh indole                      | +                 |

(-): âm tính/không có khả năng; (+): dương tính/có khả năng.

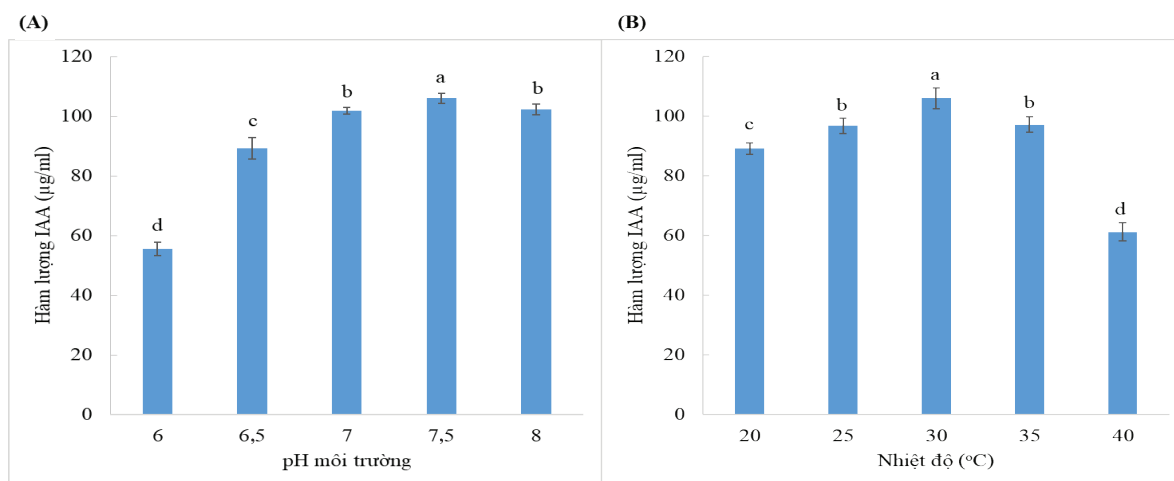
Kết quả bảng 2 cho thấy, chủng MN47 có khả năng sinh các enzyme, bao gồm alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), leucine arylamidase, valine arylamidase, acid phosphatase, naphtol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\beta$ -galactosidase, D-glucosidase và N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase và có khả năng đồng hoá các nguồn carbon (D-glucose, Glycogen, D-mannitol, D-maltose, potassium gluconate, lactic acid, malic acid, sodium acetate, trisodium citrate, L-alanin, L-rhamnose, D-ribose) và có khả năng sinh indole. Khả năng sinh các loại enzyme và đồng hóa

các nguồn carbon của chủng MN47 tương đồng với chủng *F. anhuiense* D3<sup>T</sup> [22]. Đồng thời, đặc điểm hóa sinh của chủng MN47 cũng tương đồng với công bố của Q. Feng và cs (2015) [23] khi nghiên cứu về chủng *F. procerum* T3<sup>T</sup> như cùng có khả năng sinh các loại enzyme esterase (C4), esterase lipase (C8), leucine arylamidase, valine arylamidase, acid phosphatase và khả năng đồng hoá maltose. Thêm nữa, kết quả cũng có những tương đồng với nghiên cứu về chủng *F. soyangense* IMCC 26223<sup>T</sup>, một loại vi khuẩn chịu lạnh, được phân lập từ một hồ nước ngọt nghèo dinh dưỡng của G.G. Nam và cs (2017) [24]. Theo đó, chủng MN47 và chủng *F. soyangense* sp. nov. có một số tương đồng về đặc tính sinh hoá như khả năng sinh ra các loại enzym esterase (C4), esterase lipase (C8), lipase (C14), leucine arylamidase, valine arylamidase, acid phosphatase, Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase,

N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase và trypsin và có khả năng đồng hoá một số nguồn carbon D-glucose và maltose.

### 3.3. Ảnh hưởng của pH môi trường và nhiệt độ lên men đến khả năng sinh Indole-3-acetic acid của chủng MN47

Tác động của pH môi trường và nhiệt độ nuôi cấy ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp IAA của chủng MN47 (hình 1). Đối với pH môi trường, hàm lượng IAA sinh ra bởi chủng MN47 trong môi trường Ashby có bổ sung 0,1%



**Hình 1. Ảnh hưởng của pH môi trường (A) và nhiệt độ (B) nuôi cấy đến sinh tổng hợp Indole-3-acetic acid của chủng MN47. Các chữ cái biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức  $\alpha \leq 0,05$ .**

tryptophan ở pH 6, 6,5, 7, 7,5 và 8 lần lượt là 55,56, 89,18, 101,89, 106,03 và 102,28  $\mu\text{g/ml}$  (hình 1A). Trong đó, môi trường có pH 6,0 khả năng sinh tổng hợp IAA là thấp nhất (55,56  $\mu\text{g/ml}$ ). Ở pH 7,0 và 8,0 khả năng tổng hợp IAA của chủng lần lượt đạt 101,89 và 102,28  $\mu\text{g/ml}$ ; tuy nhiên sự sai khác không có ý nghĩa. Hàm lượng IAA tổng hợp được cao nhất trong môi trường có pH 7,5 (106,03  $\mu\text{g/ml}$ ) và ở mức sai khác có ý nghĩa với các kết quả còn lại. Do vậy, pH 7,5 của môi trường Ashby có bổ sung 0,1% tryptophan là điều kiện thích hợp nhất cho chủng MN47 sinh tổng hợp IAA.

Tương tự, nhiệt độ lên men có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng MN47. Hàm lượng IAA sinh ra bởi chủng MN47 ở các nhiệt độ 20, 25, 30, 35 và 40°C lần lượt là 89,15; 96,86; 106,08; 97,21 và 61,25  $\mu\text{g/ml}$  (hình 1B). Từ kết quả tại hình 1B cho thấy, hàm lượng IAA thấp nhất thu được khi lên men ở 40°C, là 61,25  $\mu\text{g/ml}$ . Khi lên men ở 25 và 35°C, hàm lượng IAA thu được cao hơn so với ở mức 20 và 40°C lần lượt là 96,86 và 97,21  $\mu\text{g/ml}$  và sai khác không có ý nghĩa. Ở nhiệt độ 30°C khả năng tổng hợp IAA của chủng ở mức sai khác có ý nghĩa cao nhất, đạt 106,08  $\mu\text{g/ml}$ . Do vậy, pH và nhiệt độ thích hợp cho chủng MN47 sinh tổng hợp IAA trong môi trường Ashby có bổ sung 0,1% tryptophan lần lượt là 7,5 và 30°C. Các nghiên cứu trước đây cho thấy, nhiệt độ và pH môi trường là những yếu tố có tác động lớn đến tốc độ sinh trưởng của khuẩn; ở điều kiện thuận lợi, mật độ vi khuẩn và các sản phẩm trao đổi chất của chúng cũng đa dạng với hàm lượng cao hơn và ngược lại [25, 26]. Kết quả công bố của N.H. Van và cs (2017) [27] về ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến khả năng sinh IAA của 6 chủng vi khuẩn thuộc các chi *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Pantoea* và *Bacillus* được phân lập từ các vùng sinh thái khác nhau cho thấy hàm lượng IAA được sinh ra bởi các chủng vi khuẩn phụ thuộc vào pH và nhiệt độ nuôi cấy thích hợp cho các chủng đó sinh trưởng.

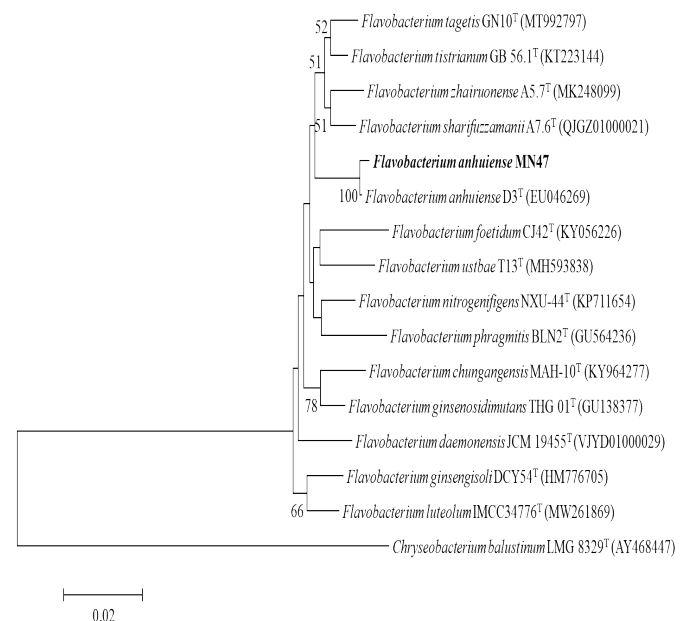
### 3.4. Định danh chủng MN47 bằng giải trình tự 16S rRNA

Kết quả so sánh trình tự gen 16S rRNA của chủng MN47 với các loài đã được công bố trên EzTaxon được trình bày trong bảng 3 cho thấy, chủng MN47 có mức độ tương đồng cao nhất (99,86%) với chủng *F. anhuiense* D3<sup>T</sup> (EU046269) và 96,69-98,03% với các thành viên khác của chi *Flavobacterium*. Dựa vào giới hạn (>98,7%) về mức độ tương đồng của trình tự gen 16S rRNA, chủng MN47 được xác định là *F. anhuiense* [28].

**Bảng 3.** So sánh sự tương đồng về trình tự gen 16S rRNA của chủng MN47 với các loài gần nhất công bố trên dữ liệu EzTaxon.

| Loài gần nhất                                                           | Tỷ lệ tương đồng (%) | Số nucleotide sai khác |
|-------------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------|
| <i>Flavobacterium anhuiense</i> D3 <sup>T</sup> (EU046269)              | 99,86                | 2/1397                 |
| <i>Flavobacterium tistrianum</i> GB 56.1 <sup>T</sup> (KT223144)        | 98,03                | 28/1420                |
| <i>Flavobacterium tagetis</i> GN10 <sup>T</sup> (MT992797)              | 97,75                | 32/1422                |
| <i>Flavobacterium ginsenosidimutans</i> THG 01 <sup>T</sup> (GU138377)  | 97,62                | 33/1388                |
| <i>Flavobacterium sharifuzzamanii</i> A7.6 <sup>T</sup> (QJGZ01000021)  | 97,40                | 37/1422                |
| <i>Flavobacterium nitrogenifigens</i> NXU-44 <sup>T</sup> (KP711654)    | 97,36                | 37/1401                |
| <i>Flavobacterium chungangensis</i> MAH-10 <sup>T</sup> (KY964277)      | 97,33                | 37/1387                |
| <i>Flavobacterium zhairuonense</i> A5.7 <sup>T</sup> (MK248099)         | 97,33                | 38/1422                |
| <i>Flavobacterium daemonensis</i> JCM 19455 <sup>T</sup> (VJYD01000029) | 97,05                | 42/1422                |
| <i>Flavobacterium luteolum</i> IMCC34776 <sup>T</sup> (MW261869)        | 96,91                | 44/1422                |
| <i>Flavobacterium foetidum</i> CJ42 <sup>T</sup> (KY056226)             | 96,85                | 44/1396                |
| <i>Flavobacterium phragmitis</i> BLN2 <sup>T</sup> (GU564236)           | 96,77                | 46/1422                |
| <i>Flavobacterium ginsengisoli</i> DCY54 <sup>T</sup> (HM776705)        | 96,70                | 46/1396                |
| <i>Flavobacterium ustbae</i> T13 <sup>T</sup> (MH593838)                | 96,69                | 47/1422                |
| <i>Flavobacterium humidisoli</i> MMS21-Er5 <sup>T</sup> (OK393633)      | 96,69                | 47/1422                |

Đồng thời, sơ đồ phả hệ cũng được thiết lập (hình 2) cho thấy, chủng MN47 được sắp xếp thuộc chi *Flavobacterium* và cùng nhánh gần nhất với chủng *F. anhuiense* D3<sup>T</sup> (EU046269). Từ kết quả so sánh trình tự gen và sơ đồ phả hệ cho thấy chủng MN47 là loài *F. anhuiense*.



**Hình 2.** Sơ đồ phả hệ của chủng MN47 với các loài gần nhất thuộc chi *Flavobacterium* dựa vào trình tự gen 16S rRNA.

#### 4. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập được 67 chủng vi khuẩn từ các mẫu đất trồng chè tại xã La Bằng, huyện Đại Từ, tỉnh Thái Nguyên, trong đó có 8 chủng có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA. Trong 8 chủng, tuyển chọn được chủng vi khuẩn MN47 có hoạt lực cao nhất, với khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA lần lượt là 20,41 và 106,08 µg/ml). Chủng MN47 được xác định thuộc loài *F. anhuiense* dựa trên trình tự 16S rRNA. Chủng *F. anhuiense* MN47 có khả năng sinh các loại enzyme alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), leucine arylamidase, valine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, β-galactosidase, D-glucosidase và N-acetyl-β-glucosaminidase và có khả năng đồng hoá các nguồn carbon D-glucose, glycogen, D-mannitol, D-maltose, potassium gluconate, lactic acid, malic acid, sodium acetate, trisodium citrate, L-alanine, L-rhamnose, D-ribose). pH và nhiệt độ thích hợp cho chủng MN47 sinh tổng hợp IAA trong môi trường Ashby có bổ sung 0,1% tryptophan lần lượt là 7,5 và 30°C.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện với sự tài trợ kinh phí từ đề tài khoa học và công nghệ cấp quốc gia mã số NVQG-2021/ĐT.04. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Y. Li, Z. Li, Y. Arafat, et al. (2017), "Characterising rhizosphere microbial communities in long-term monoculture tea orchards by fatty acid profiles and substrate utilization", *Eur. J. Soil Biol.*, **81**, pp.48-54, DOI: 10.1016/j.ejsobi.2017.06.008.

[2] J. Bhaduri, P. Kundu, D. Mitra, et al. (2016), "Isolation and characterisation of nitrogen fixing bacteria (*Azotobacter* sp.) from tea field soil of Dooars and Darjeeling region of North Bengal, India", *International Journal of Engineering Science Invention*, **5**(8), pp.46-51.

[3] G. Gao, R. Tao (2001), "Experiment studies on the hygienics of As, Ba, Cd, Pb in tea", *Chinese Journal of Food Hygiene*, **6**, pp.12-14.

[4] Y. Arafat, X. Wei, Y. Jiang, et al. (2017), "Spatial distribution patterns of root-associated bacterial communities mediated by root exudates in different aged ratooning tea monoculture systems", *International Journal of Molecular Sciences*, **18**(8), pp.17-27, DOI: 10.3390/ijms18081727.

[5] J.K. Ladha, H. Pathak, T.J. Krupnil, et al. (2005), "Efficiency of fertilizer Nitrogen in cereal production: Retrospects and prospects", *Advances in Agronomy*, **87**, pp.85-156, DOI: 10.1016/S0065-2113(05)87003-8.

[6] P.T.T. Ha, N.K.B. Tam, P.N. Ngoc, et al. (2017), "Assessing some chemical and physical properties of orange planting soil using EarthCare with SumaGrow inside product in Tran Cao Town, Phu Cu district, Hung Yen province", *VNU Journal of Science*, **33**(1S), pp.85-91, DOI: 10.25073/2588-1094/vnuess.4156 (in Vietnamese).

[7] L.T.T. Thuy, L.N. Kieu, N.T.T. Hang, et al. (2012), "Selection of beneficial microorganisms to produce micro-organic fertilizer using for tea tree in Yen Bai province", *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, **5**(23), pp.120-127 (in Vietnamese).

[8] TCVN 7538-6:2010 (2010), *Soil Quality - Sampling - Part 6: Guidance on The Collection, Handling and Storage of Soil Under Aerobic Conditions for The Assessment of Microbiological Processes, Biomass and Diversity in The Laboratory* (in Vietnamese).

[9] T.N.L. Pham, T.V. Nguyen (2016), "Isolation and selection of nitrogen fixing bacteria from soil of mangrove in Thua Thien Hue province", *Hue University Journal of Science*, **4**(1), pp.63-72 (in Vietnamese).

[10] T.T.H. Nguyen, T.T. Nguyen (2015), "Screening of *Azotobacter* strains with the ability of nitrogen fixing and synthesis of indole acetic acid (IAA)", *Journal of Forestry Science and Technology*, **4**, pp.3-9 (in Vietnamese).

[11] TCVN 10784:2015 (2015), *Microorganisms - Determination of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Synthesis Capability* (in Vietnamese).

[12] E. Glickmann, Y. Dessaux (1995), "A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria", *Apply Environ. Microbiol.*, **61**(2), pp.793-795, DOI: 10.1128/aem.61.2.793-796.1995.

[13] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1546pp.

[14] J. Chun, J.H. Lee, Y. Jung, et al. (2007), "EzTaxon: A web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**, Pt 10, pp.2259-2261, DOI: 10.1099/ijs.0.64915-0.

[15] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura (2016), "MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets", *Molecular Biology and Evolution*, **33**(7), pp.1870-1974, DOI: 10.1093/molbev/msw054.

[16] J.F. Bernardet, J.P. Bowman (2011), "Genus I. *Flavobacterium* Bergey, et al. 1923", *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, **4**, pp.112-154.

[17] A.I. Yakubovskaya, T.N. Melnychuk, I.A. Kameneva, et al. (2019), "*Flavobacterium* sp. strain no. 72 - associative symbiont of *Oryza sativa* L. plants", *Asian Jr. of Microbiol. Biotech. Env. Sc.*, **21**(3), pp.566-571.

[18] T.V. Chi, M.N. Tuan, N.X. Binh, et al. (2022), "Selection of bacterial strains capable of fixing nitrogen and synthesizing indole-3-acetic acid (IAA) from tomato soil in some communes and wards in Thai Nguyen province", *Vietnam Agricultural Science Journal*, **20**(12), pp.1599-1607 (in Vietnamese).

[19] D.K. Nhung, V.T. Cong (2011), "Investigating the ability of IAA synthesis and nitrogen fixation of *Gluconacetobacter* spp. and *Azospirillum* spp. isolated from sugarcane", *Can Tho University Journal of Science*, **18a**, pp.161-167 (in Vietnamese).

[20] N.A. Huy, N.H. Hiep (2018), "Isolation and identification of salt tolerant bacteria capable in nitrogen fixation and IAA synthesis from rice - shrimp soils in Bac Lieu, Soc Trang and Kien Giang provinces", *Can Tho University Journal of Science*, **54**(1B), pp.7-12, DOI: 10.22144/ctu.jvn.2018.002 (in Vietnamese).

[21] T.V. Chi, L.V. Hien, N.M. Tuan, et al. (2023), "Selection of highly active bacterial strains for fixing nitrogen and synthesizing indole-3-acetic acid (IAA) from green tea cultivation soil at Tuc Tranh commune, Thai Nguyen province", *Journal of Forestry Science and Technology*, **12**(6), pp.3-11 (in Vietnamese).

[22] H. Liu, R. Liu, S.Y. Yang, et al. (2008), "*Flavobacterium anhuiense* sp. nov., isolated from field soil", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **58**(4), pp.756-760, DOI: 10.1099/ijs.0.65536-0.

[23] Q. Feng, L. Han, X. Yuan, et al. (2015), "*Flavobacterium procerum* sp. nov., isolated from freshwater", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **6**, pp.2702-2708, DOI: 10.1099/ijs.0.000326.

[24] G.G. Nam, Y. Joung, M. Park, et al. (2017), "*Flavobacterium soyangense* sp. nov., a psychrotolerant bacterium, isolated from an oligotrophic freshwater lake", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **67**, pp.2440-2445, DOI: 10.1099/ijsem.0.001987.

[25] R.C. Sánchez, M.I. Igeño, A.G. Población, et al. (2018), "Study of pH changes in media during bacterial growth of several environmental strains", *Proceedings*, **2**(20), DOI: 10.3390/proceedings2201297.

[26] Y. Qiu, Y. Zhou, Y. Chang, et al. (2022), "The effects of ventilation, humidity, and temperature on bacterial growth and bacterial genera distribution", *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **19**(22), DOI: 10.3390/ijerph192215345.

[27] N.H. Van, N.T. Minh (2017), "Research on using endophytic bacteria isolated from different ecosystems", *Vietnam J. Agri. Sci.*, **15**(5), pp.605-618 (in Vietnamese).

[28] H.P. Browne, S.C. Forster, B.O. Anonye, et al. (2016), "Culturing of unculturable human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation", *Nature*, **533**, pp.543-546, DOI: 10.1038/nature17645.