

PHÂN LẬP VÀ SÀNG LỌC MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN LAM CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP CHẤT ĐIỀU HÒA SINH TRƯỞNG

Đoàn Thị Oanh¹, Dương Thị Thủy^{2,3,✉}, Nguyễn Thị Thu Liên⁴, Đặng Thị Mai Anh², Hoàng Thị Quỳnh², Hoàng Minh Thắng², Vũ Thị Nguyệt², Lê Thị Phương Quỳnh⁵

¹Đại học Tài nguyên và Môi trường Hà Nội

²Viện Công nghệ môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

⁵Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: duongthuy0712@gmail.com

Ngày nhận bài: 22.12.2019

Ngày nhận đăng: 16.3.2020

TÓM TẮT

Vi khuẩn lam là vi sinh vật quang hợp có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp có giá trị ứng dụng cao. Chúng tạo ra nhiều loại hoạt chất sinh học như lipopeptide, acid béo, độc tố, carotenoids, vitamins và chất điều hòa sinh trưởng thực vật được giải phóng vào môi trường nuôi cấy. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm phân lập và sàng lọc một số chủng vi khuẩn lam thu từ đất nông nghiệp, các thủy vực nước ngọt (kênh, mương, sông) có khả năng sinh tổng hợp phytohormone indole-3-acetic acid (IAA). Các mẫu đất và nước là nguồn phân lập vi khuẩn lam được thu từ một số địa phương (Bắc Giang, Thanh Hóa và Huế). Acid indole-3-acetic chiết xuất từ môi trường nuôi cấy các chủng vi khuẩn lam được xác định bằng phương pháp Salkowski. Từ các hệ sinh thái thủy vực và đất trồng lúa, mười chủng vi khuẩn lam thuộc 4 chi *Nostoc*, *Anabena*, *Geitlerinema* và *Planktothricoides* đã được phân lập. Đặc điểm hình thái của các chủng phân lập được xác định và mỗi chủng được nuôi cấy trong môi trường BG11. Trong môi trường nuôi cấy có bổ sung L-tryptophan, các chủng vi khuẩn lam đều có khả năng sinh tổng hợp chất điều hòa tăng trưởng với hàm lượng IAA dao động từ 9,1 đến 95 µg/mL. Trong số các chủng vi khuẩn lam phân lập, *Planktothricoides raciborskii* là chủng sinh tổng hợp IAA không phụ thuộc vào tiền chất L-tryptophan. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của L-tryptophan đến khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng này cho thấy nồng độ IAA tăng dần và đạt giá trị cao nhất ($118,28 \pm 2,00$ µg/mL) khi bổ sung L-tryptophan vào môi trường nuôi cấy với hàm lượng 900 µg/mL. Khả năng sinh tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn lam trên cho thấy tiềm năng ứng dụng của chúng trong công nghệ sinh học nông nghiệp.

Từ khóa: Acid indole-3-acetic (IAA), chất điều hòa tăng trưởng thực vật, *Planktothricoides raciborskii*, phân lập, vi khuẩn lam.

MỞ ĐẦU

Vi khuẩn lam (VKL) là sinh vật tiền nhân quang tự dưỡng có một số tính chất đặc trưng của cả vi khuẩn và vi tảo. Chúng là nhóm sinh vật có hình thái rất đa dạng (Whitton, Potts, 2000), có thể đơn bào hay liên kết thành các tập đoàn dạng

phẳng, hay hình cầu, có hình dạng hay không có hình dạng rõ ràng, hoặc dạng sợi phân nhánh thật hay giả. VKL có lịch sử tiến hóa lâu dài và một số loài đã phát triển các tế bào chức năng chuyên biệt như tế bào dị hình (heterocytes) cho cố định đạm và bào tử (akinetes) để sống sót trong điều kiện khắc nghiệt. Các loài này có khả năng thích

ứng và có thể tìm thấy ở hầu hết mọi môi trường trên mặt đất, ao hồ, sông suối, đại dương, thậm chí cả ở suối nước nóng, sa mạc hay sông băng. Hazarika *et al.* (2012) đã báo cáo rằng VKL đóng vai trò quan trọng trong hệ sinh thái thủy vực và đất, là sinh vật sơ cấp trong môi trường nước, cung cấp năng lượng sơ cấp cho những sinh vật bậc cao, đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì và làm gia tăng độ phì nhiêu của đất nhờ khả năng cố định đạm, đặc biệt trong các ruộng lúa.

Cho đến nay, VKL chủ yếu được biết đến với khả năng cố định nitơ trong không khí, là nguồn phân bón sinh học quan trọng và được nghiên cứu ở nhiều quốc gia trên thế giới. Nhiều nghiên cứu đã báo cáo rằng hơn 100 loài VKL có khả năng cố định nitơ từ khí quyển đã được xác định và chúng có thể cung cấp 20-25 kg N/ha/vụ (Prasanna *et al.*, 2008; Amarsinh *et al.*, 2016). Bên cạnh đó, VKL còn được biết đến với khả năng sản sinh nhiều chất chuyển hóa thứ cấp như vitamin, amino acid, kháng sinh, độc tố và các hormone tăng trưởng thực vật. Trong đó, có khoảng 45 loài vi khuẩn lam và vi tảo lục có khả năng sinh tổng hợp các hormone tăng trưởng thực vật như gibberellins, cytokinin, auxin hoặc acid abscisic có thể kể tên như *Nostoc*, *Chlorogloeopsis*, *Calothrix*, *Plectonema*, *Gloeotheca*, *Anabaena*, *Cylindrospermu*, *Anabaenopsis*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Lymnothrix*, *Pseudoanabaena*, *Chroococciopsis*, *Synechocystis*... (Romanenko *et al.*, 2016; Sergeeva *et al.*, 2002; Varalakshmi, Malliga, 2012). Các hợp chất hormone được sinh tổng hợp từ các chủng vi khuẩn lam có khả năng thúc đẩy sự tăng trưởng ở thực vật (nảy mầm hạt giống và tăng trưởng rễ và chồi), giúp tăng cường sức chống chịu của thực vật bằng rất nhiều cơ chế khác nhau (Singh *et al.*, 2011). Chính vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập và sàng lọc một số chủng VKL ở các hệ sinh thái khác nhau ở Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp chất điều hòa sinh trưởng IAA.

Phương pháp nghiên cứu

Thu mẫu

Các mẫu nước, đất chứa vi khuẩn lam được

thu từ sông, kênh mương và đất trồng lúa tại các tỉnh Bắc Giang, Thanh Hóa và Thừa Thiên Huế. Đối với mẫu nước mặt, VKL được thu bằng lưới thực vật phù du với kích thước lỗ là 40 μm , bằng cách kéo vợt nhiều lần theo phương nằm ngang. Tại đất ruộng lúa, đất được lấy ở 3 vị trí khác nhau theo phương pháp của Gollerbach và Shtina (1969). Mẫu đất được lấy ở các độ sâu 0 - 5 cm và 5 - 20 cm bằng các dụng cụ đã tiệt trùng. Tại các độ sâu khác nhau, các mẫu được trộn đều rồi lấy mẫu đại diện khoảng 500 g, cho vào túi nylon đã tiệt trùng, ghi ký hiệu, thời gian và chuyển về phòng thí nghiệm.

Phân lập và phân loại

Tại phòng thí nghiệm, mỗi mẫu đất cho vào 2 đĩa petri có lót giấy lọc đã tiệt trùng. Các mẫu đất được giữ âm bằng cách cho vào môi trường BG11 pha loãng 1/10 lần. Tất cả mẫu đặt dưới ánh sáng đèn huỳnh quang có cường độ sáng 1000 - 1200 lux tạo điều kiện cho VKL phát triển. Sau khoảng 2 tuần, trên bề mặt lớp đất sẽ mọc lên các đám tảo lam màu xanh làm nguyên liệu để tiến hành phân lập hay phân loại.

Hình thái của các loài VKL trong các mẫu nước, đất được kiểm tra và xác định sử dụng kính hiển vi (Olympus CK90) có kết hợp máy ảnh. VKL được phân lập theo phương pháp "tách tế bào đơn". Quy trình phân lập được tiến hành theo phương pháp của Shirai *et al.* (1989) có cải tiến). Quá trình phân lập và nuôi cấy VKL sử dụng môi trường BG11. Môi trường BG11 có thành phần như sau (mg/L): NaNO_3 1500; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 36; K_2HPO_4 30,6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 75; $\text{Na}_2\text{Mg EDTA}$ 1; Na_2CO_3 20; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,08; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,05 L; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,81; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,02; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,22; acid citric monohydrate 6; $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{FeNO}_7$ 6; H_3BO_3 2,86. Các tế bào VKL đơn bào hoặc dạng sợi được gắp dưới kính hiển vi sử dụng pipet Pasteur. Tế bào VKL được gắp và chuyển vào một giọt môi trường BG 11 đã khử trùng nhiều lần để loại bỏ các tế bào bám vào hoặc các hạt lơ lửng. Chúng phân lập được đưa vào trong ống nghiệm với môi trường BG11 trong 1-2 tuần, ánh sáng huỳnh quang

(1500 - 2500 lux) ở 25 ± 2 °C, chu kỳ sáng: tối 12:12. Sau đó, chúng phân lập sạch được chuyển sang nuôi cấy trong các bình tam giác 50 và 100 mL trong cùng điều kiện để duy trì. Hình thái của chúng vi khuẩn lam phân lập được phân loại sử dụng phương pháp so sánh hình thái dưới kính hiển vi dựa trên các tài liệu về phân loại VKL (Komárek, Anagnostidis, 1999).

Đánh giá khả năng sinh tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn lam

Hàm lượng IAA sinh ra trong môi trường nuôi cấy của các chủng VKL được xác định bằng phương pháp so màu sử dụng thuốc thử Salkowski (Rahman *et al.*, 2010). Dịch nuôi cấy các chủng VKL trong môi trường BG11 không bổ sung và có bổ sung L-tryptophan (500 µg/mL L-tryptophan) ở nhiệt độ 25 ± 2 °C, cường độ chiếu sáng 1500 - 2500 lux với chu kỳ sáng: tối là 12:12 sau 12 ngày được thu bằng ly tâm ở 10.000 vòng/10 phút. Sau khi ly tâm, dịch nổi được sử dụng để phân tích và xác định hàm lượng IAA. Một 1 ml dịch nổi sau khi ly tâm được trộn với 2 ml thuốc thử Salkowski (2% FeCl₃ 0,5 M trong dung dịch HClO₄ đặc) và được ủ trong 30 phút trong bóng tối ở nhiệt độ phòng. Giá trị OD của mẫu được so sánh và đối chiếu với đồ thị chuẩn để định tính và định lượng IAA trong môi trường nuôi cấy theo đơn vị µg IAA/mL.

Ảnh hưởng của L-tryptophan đến khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng vi khuẩn lam *Planktothricoides raciborskii*

Chủng VKL *Planktothricoides raciborskii* được nuôi cấy trong môi trường BG 11 có bổ sung L-tryptophan với 10 nồng độ từ 0 đến 1000 µg/mL ở nhiệt độ 25 ± 2 °C, cường độ chiếu sáng 1500 - 2500 lux với chu kỳ sáng: tối là 12:12. Sau 12 ngày, dịch môi trường nuôi cấy được thu và phân tích hàm lượng IAA.

Xử lý thống kê

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Các phân tích thống kê được xử lý bằng phần mềm SPSS 16 (SPSS Inc., USA).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và định danh các vi khuẩn lam từ một số hệ sinh thái khác nhau

Từ các mẫu nước và đất thu thập tại các tỉnh Bắc Giang, Thanh Hóa và Thừa Thiên Huế, chúng tôi đã phân lập được 10 chủng VKL thuộc các chi *Anabaena*, *Geitlerinema*, *Nostoc* và *Planktothricoides* (Bảng 1). Sử dụng phương pháp so sánh hình thái dựa trên các tài liệu về phân loại VKL, 10 chủng VKL phân lập được phân loại. Một số đặc điểm hình thái học của các chủng VKL phân lập được mô tả được trình bày ở Hình 1.

Chủng IPL – *Planktothricoides raciborskii*

VKL dạng sợi thẳng hoặc có hơi cong nhẹ phía đầu sợi; không phân nhánh; không có vỏ bao hoặc vỏ bao rất mỏng; không phân biệt đầu đuôi. Tế bào dinh dưỡng chủng này có hình trụ tròn không có eo thắt, không có tế bào dị hình. Trichom dạng sợi dài ngắn khác nhau có thể dài đến 5 cm, màu xanh đen, chiều rộng từ 5 đến 8 µm, chiều cao tế bào 3 đến 5 µm (Hình 1, a). Chủng được phân lập từ mẫu nước ô nhiễm ở nhánh sông nhỏ (hói) thuộc huyện Phú Vang, tỉnh Thừa Thiên Huế.

Chủng BGGes - *Geitlerinema* sp.

Đám sợi có màu xanh tươi trong môi trường nuôi cấy. Sợi thẳng, ngắn, có phân biệt rõ ở vách ngăn tế bào. Tế bào hình trụ, dài có thể gấp 1,5 – 2 - 3 lần so với chiều rộng. Rộng 1,2 – 2 - 5 µm, dài 2 - 5 µm. Tế bào đầu sợi tròn, không có thuôn nhọn về 2 đầu sợi (Hình 1, b). Chủng này được phân lập từ ruộng lúa ở tỉnh Bắc Giang.

Chủng INP- *Nostoc* sp.

Tân thành lớp dày, màu xanh đen. Sợi không có vỏ bao, chiều ngang 5 - 5,5 µm, hơi eo thắt nhẹ ở vách tế bào. Tế bào cuối sợi hình nón tù. Tế bào dinh dưỡng hình trống, dài 5 - 10 µm. Tế bào dị hình hình cầu đến oval, hơi lớn hơn tế bào dinh dưỡng, rộng 4 - 6 µm, cao 5 - 8 µm. Tế bào dị hình ở giữa sợi, không kề bên tế bào dị hình, hình trống hay hình trụ, hình thành một loạt 7 - 10 tế bào hay hơn, bào tử có chiều ngang 7 - 10

μm , chiều dài 8 - 14 μm , vỏ trơn láng (Hình 1, f). Chúng được phân lập từ đất ruộng Phú An, Phú Vang, Thừa Thiên Huế.

Chủng 5AP – Nostoc sp.

Tán hình thành lớp mỏng màu xanh nhạt, hay trong khối nhầy màu xanh đậm khi già. Sợi thẳng, eo thắt ở vách ngăn ngang tế bào, sắp xếp song song trong cụm nhầy màu xanh. Các tế bào đầu sợi có đầu tròn.

Các tế bào dinh dưỡng hình cầu đường kính 4 - 5 μm , hay hình trứng với chiều ngang 3,5 - 4 μm , chiều cao 3 - 5 μm . Tế bào dị hình hơi lớn hơn tế bào dinh dưỡng một ít, nằm xen giữa các tế bào dinh dưỡng, hình trứng hay cầu hoặc hơi cầu, đường kính 6 - 7 μm . Tế bào dị hình hình trứng, dài 12 - 16 μm , ngang 9 - 10 μm , với màng dày, nhẵn, không màu, sắp xếp 2 bên tế bào dị hình (Hình 1, g). Chúng được phân lập từ đất ruộng Phú Hồ, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam.

Chủng 5AD- Nostoc sp.

Sợi thẳng hoặc hơi cong, hơi kết cụm tạo thành lớp mỏng khi nhiều. Sợi ngắn gồm hàng chục hay hàng trăm tế bào đến dài vài cm, không có vỏ bao, có eo thắt ở vách ngăn ngang. Tế bào dinh dưỡng hình trứng dẹt, chiều ngang 4 - 5,5

μm , chiều cao 3 - 5 - 6 μm . Tế bào dị hình hình cầu, đường kính 4 - 5 μm . Bào tử hình trứng ngang 7 - 8 μm , dài 9 - 11 μm , xếp chuỗi từ 2 - 5 - 10 (Hình 1, h). Chúng được phân lập từ đất ruộng Phú Dương, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam.

Chủng 2DL – Nostoc sp.

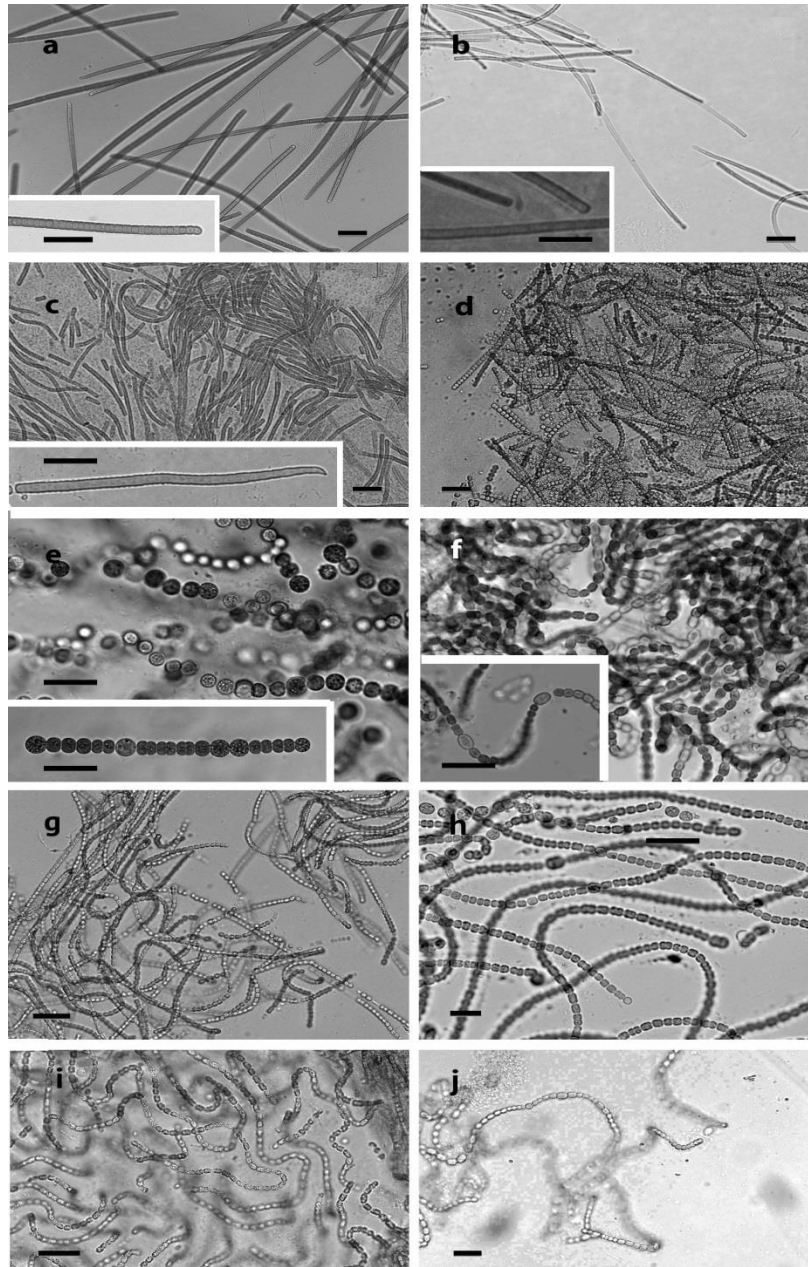
Tán màu xanh đậm mọc thành đám ít nhầy, sợi nhỏ, thẳng, mọc thành đám nhầy. Tế bào dinh dưỡng hình oval, hay trụ tròn, chiều ngang 2,5 - 3 μm , dài 2,5 - 3,5 μm . Tế bào dị hình hình trụ tròn, ngang 3,5 μm , dài 5 μm (Hình 1, i). Chúng được phân lập từ đất ruộng ở Phú Dương, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam.

Chủng 12NA- Nostoc sp.

Tán dạng lớp dày, màu xanh đậm, sợi không có vỏ bao, ngang 3 - 5,5 μm , có eo thắt ở vách tế bào. Tế bào đầu sợi hình nón tròn, đôi khi nhọn. Tế bào dinh dưỡng hình trứng, dài 5 - 10 μm . Tế bào dị hình có dạng hình cầu đến oval, nhiều hay ít lớn hơn tế bào dinh dưỡng, ngang 4 - 6 μm , cao 5 - 8 μm . Tế bào dị hình nằm ở giữa sợi, có hình trứng hay hình trụ, tạo thành một chuỗi từ 7 - 10 tế bào hoặc hơn, chiều ngang 7 - 10 μm , chiều cao 8 - 14 μm , vỏ trơn nhẵn (Hình 1, j). Chúng được phân lập từ đất ruộng xã Phú An, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam.

Bảng 1. Danh mục các chủng VKL phân lập từ một số hệ sinh thái khác nhau tại Bắc Giang, Thanh Hóa và Thừa Thiên Huế

STT	Vi khuẩn lam	Tên loài hình thái	Ký hiệu chủng	Nơi thu mẫu
Bộ Oscillatoriales				
1	<i>Planktothricoides</i>	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	1PL	Sông, Huế
2	<i>Geitlerinema</i>	<i>Geitlerinema sp.</i>	BGGes	Ruộng lúa, Bắc Giang
3	<i>Geitlerinema</i>	<i>Geitlerinema sp.</i>	THGEs	Ruộng lúa, Thanh Hóa
Bộ Nostocales				
4	<i>Anabaena</i>	<i>Anabaena sp.</i>	1AA	Kênh mương, Huế
5	<i>Anabaena</i>	<i>Anabaena sp.</i>	9TN	Kênh mương, Huế
6	<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc sp.</i>	1NP	Ruộng lúa, Huế
7	<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc sp.</i>	5AP	Ruộng lúa, Huế
8	<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc sp.</i>	5AD	Ruộng lúa, Huế
9	<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc sp.</i>	2DL	Ruộng lúa, Huế
10	<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc sp.</i>	12NA	Ruộng lúa, Huế



Hình 1. Hình ảnh hiển vi của các chủng vi khuẩn lam trong nuôi cấy. a. Chủng 1PL - *Planktothricoides raciborskii*; b. Chủng BGGes - *Pseudanabaena* sp.; c. Chủng THGes - *Geitlerinema* sp.; d. Chủng 9TN - *Anabaena* sp.; e. Chủng 1AA- *Anabaena* sp.; f. Chủng 1NP- *Nostoc* sp.; g. Chủng 5AP - *Nostoc* sp.; h. Chủng 5AD- *Nostoc* sp.; i. Chủng 2DL - *Nostoc* sp.; j. Chủng 12NA- *Nostoc* sp. Thước đo: 20 μ m.

Khả năng sinh tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn lam

Khả năng sinh tổng hợp IAA của 10 chủng vi khuẩn lam phân lập được trình bày tại Bảng 2.

Trong điều kiện nuôi cấy môi trường BG11 không bổ sung tiền chất L - tryptophan, 01 chủng VKL *P. raciborskii* 1PL có khả năng sinh tổng hợp IAA với hàm lượng IAA đạt $3,04 \pm 0,05$ μ g/mL. Trong khi đó, IAA không được phát hiện

trong môi trường nuôi cấy của 9 chủng VKL BGGes, THGes, 1AA, 9TN, 1NP, 5AP, 5AD, 2DL và 12NA. Bên cạnh đó, 10 chủng VKL khảo sát trong nghiên cứu này đều có khả năng sinh tổng hợp IAA khi có bổ sung L-Tryptophan với nồng độ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trong môi trường nuôi cấy. Hàm lượng IAA ngoại bào dao động trong khoảng 9,1 – 95 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Trong đó, 10% chủng VKL phân lập được có hàm lượng IAA ngoại bào < 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 70% chủng VKL có khả năng sinh tổng hợp IAA ngoại bào từ 10 - 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Đó là các chủng BGGes, THGes, 1AA, 9TN, 5AP, 5AD, 12NA với khả năng sinh tổng hợp IAA ngoại bào đạt tương ứng khoảng $23,1 \pm 0,4$; $25,5 \pm 0,3$; $15,2 \pm 5,4$; $19,6 \pm 0,5$; $23,6 \pm 0,5$; $17,7 \pm 1$ và $18,6 \pm 0,3$ $\mu\text{g}/\text{mL}$. Hai chủng vi khuẩn lam (20%) có khả năng sinh tổng hợp IAA ngoại bào đạt mức trên 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ là chủng 1PL và 2DL với khả năng sinh tổng hợp IAA ngoại bào đạt tương ứng $95,0 \pm 2,4$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ và $70,8 \pm 7$ $\mu\text{g}/\text{mL}$.

L-Tryptophan thường được coi tiền chất quan trọng để sinh tổng hợp IAA ở vi sinh vật. Sự tương đồng về cấu trúc β - indol acetic acid và tryptophan là cơ sở cho giả định rằng auxin có thể được tổng hợp từ amino acid này. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy khả năng sinh tổng hợp IAA ở một số chủng vi khuẩn và VKL phụ

thuộc vào sự hiện diện của L-tryptophan trong môi trường (Mehboob *et al.*, 2010; Mazhar, Hasnain, 2011). Ngoài ra, nghiên cứu này cũng ghi nhận chủng *P. raciborskii* 1PL có khả năng sinh tổng hợp IAA phụ thuộc L-tryptophan nhưng có cũng khả năng tự sản sinh IAA độc lập với L-tryptophan. Kết quả nghiên cứu này cũng tương đồng với công bố của Chittapun *et al.* (2018). Sinh tổng hợp IAA không phụ thuộc vào tryptophan được ghi nhận ở hai chủng *Nostoc* là *N. carneum* TUBT04 và *N. soc* TUB05 (Chittapun *et al.*, 2018). Ngoài ra, hai chủng *Anabeana* có khả năng tổng hợp với hàm lượng IAA cao khi chúng được nuôi cấy trong môi trường không có tryptophan và được nuôi ở điều kiện chiếu sáng liên tục (Prasanna *et al.*, 2010).

Trong số 10 chủng VKL phân lập, chủng *P. raciborskii* (1PL) không chỉ có khả năng sinh tổng hợp IAA ngoại bào khi nuôi trong môi trường BG 11 không bổ sung L-tryptophan, mà còn có khả năng sinh tổng hợp IAA ngoại bào cao nhất so với các chủng vi khuẩn lam còn lại đạt $95 \pm 2,4$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ khi nuôi trong môi trường BG 11 có bổ sung 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ L-tryptophan. Chính vì vậy, chủng *P. raciborskii* 1PL đã được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 2. Khả năng sinh tổng hợp IAA của 10 chủng vi khuẩn lam phân lập tại một số hệ sinh thái khác nhau tại Bắc Giang, Thanh Hóa và Thừa Thiên Huế.

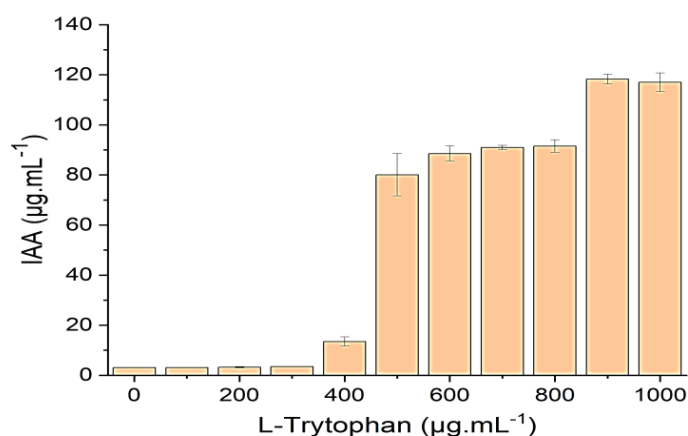
Chủng vi khuẩn lam	Công thức thực nghiệm				
	BG11 không bổ sung L-tryptophan	BG11 bổ sung L-tryptophan (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	IAA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	IAA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Số chủng	Tỷ lệ chủng có khả năng sinh IAA (%)	
1NP	-	$9,1 \pm 2$	< 10	1	10
BGGes	-	$23,1 \pm 0,4$	10 - 70	7	70
THGes	-	$25,5 \pm 0,3$			
1AA	-	$15,2 \pm 5,4$			
9TN	-	$19,6 \pm 0,5$			
5AP	-	$23,6 \pm 0,5$			
5AD	-	$17,7 \pm 1$			
12NA	-	$18,6 \pm 0,3$			
2DL	-	$70,8 \pm 7$	> 70	2	20
1PL	$3,04 \pm 0,05$	$95,0 \pm 2,4$			

Ảnh hưởng của nồng độ L-Tryptophan lên khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng VKL *P. raciborskii*

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ L-tryptophan sinh tổng hợp IAA ngoại bào của chủng vi khuẩn lam *P. raciborskii* 1PL được trình bày tại Hình 2. Có mối tương quan tuyến tính giữa hàm lượng tryptophan bổ sung vào môi trường nuôi cấy và sinh tổng hợp IAA ngoại bào của chủng *P. raciborskii*. Trong điều kiện nuôi cấy không bổ sung L-tryptophan, chủng vi khuẩn lam này sinh tổng hợp IAA ngoại bào thấp, đạt khoảng $3,04 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$. Hàm lượng IAA trong môi trường nuôi cấy của chủng *P. raciborskii* 1PL tăng lên đồng thời với tăng nồng độ L-tryptophan. Ở công thức bổ sung 100, 200 và 300 $\mu\text{g/mL}$ L-tryptophan vào môi trường nuôi thì *P. raciborskii* 1PL sản sinh IAA ngoại bào chỉ đạt tương ứng là $3,07 \pm 0,07$, $3,26 \pm 0,24$ và $3,49 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$.

Kết quả nghiên cứu này cho thấy khi bổ sung L-tryptophan vào môi trường nuôi (100 – 300 $\mu\text{g/mL}$) khả năng sinh tổng hợp IAA ngoại bào

của *P. raciborskii* 1PL tăng không đáng kể so với thực nghiệm không bổ sung L-tryptophan vào môi trường nuôi. Có sự gia tăng đáng kể IAA ngoại bào trong môi trường nuôi ở các thực nghiệm bổ sung 500, 600, 700, 800, 900 và 1000 $\mu\text{g/mL}$ L-tryptophan đạt tương ứng là $80,07 \pm 8,41$; $88,55 \pm 3,06$; $90,99 \pm 0,82$; $91,53 \pm 2,48$; $118,28 \pm 2,00$ và $117 \pm 3,70 \mu\text{g/mL}$. Nồng độ IAA ngoại bào ở các công thức thực nghiệm bổ sung 500 - 1000 $\mu\text{g/mL}$ L-tryptophan cao hơn 26 - 39 lần so với thực nghiệm không bổ sung L-tryptophan. Hàm lượng IAA trong môi trường nuôi cấy đạt giá trị cao nhất khoảng $118,28 \pm 2,00 \mu\text{g/mL}$ trong môi trường nuôi có bổ sung 900 $\mu\text{g/mL}$ L-tryptophan. Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự báo cáo của Mehboob *et al.* (2010) khi tryptophan 1500 $\mu\text{g/mL}$ bổ sung vào môi trường nuôi cấy của chủng *A. platensis* cho hàm lượng IAA cao nhất. Ngoài ra, một số nghiên cứu cũng cho thấy khả năng sinh tổng hợp IAA ở một số chủng vi khuẩn và VKL phụ thuộc vào sự hiện diện của L-tryptophan trong môi trường, khi tăng nồng độ L-tryptophan trong môi trường nuôi thì nồng độ IAA cũng tăng (Ahmad *et al.*, 2005; Ahmed *et al.*, 2010).



Hình 2. Ảnh hưởng của L-tryptophan đến nồng độ IAA ngoại bào của chủng vi khuẩn lam *P. raciborskii* 1PL

KẾT LUẬN

Mười chủng VKL thuộc các chi *Anabena*, *Nostoc*, *Geitlerinema* và *Planktothricoides* đã được phân lập và định danh từ các hệ sinh thái khác nhau.

Tất cả các chủng VKL phân lập đều có khả năng sinh tổng hợp IAA trong môi trường có sự hiện diện của L-tryptophan với nồng độ 500 $\mu\text{g/mL}$. Hàm lượng IAA ngoại bào của các chủng vi khuẩn lam dao động trong khoảng 9,1 – 95

µg/mL. Chúng *P. raciborskii* (1PL) phân lập được cho thấy tiềm năng sản xuất IAA ngay cả khi không có tryptophan trong môi trường nuôi.

Bổ sung L-tryptophan vào môi trường nuôi cấy với các nồng độ (500 - 1000 µg/mL) làm tăng đáng kể khả năng sinh tổng hợp IAA ngoại bào của chủng *P. raciborskii* 1PL.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được hoàn thành trong khuôn khổ đề tài VAST 07.03/19-20. Tập thể tác giả chân thành cảm ơn Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tài trợ kinh phí thực hiện.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS (2005) Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and in the absence of tryptophan. *Turk J Biol* 29: 29-34.
- Ahmed M, Stal LJ, Hasnain H (2010) Production of indole- 3-acetic acid by the cyanobacterium *Arthrospira platensis* strain MMG-9. *J Microbiol Biotechnol* 20(9): 1259–1265.
- Amarsinh B, Pravin PSunil P (2016) Screening and optimization of indole 3 acetic acid producing non-heterocystous cyanobacteria isolated from saline soil. *Scholars Acad J Biosci* 4(9): 738-744.
- Ashok KB, Perumal V, Sivakumar N (2013) Indole-3-acetic acid from filamentous cyanobacteria: Screening, strain identification and production. *J Sci Ind Res* 72: 581-584.
- Chittapun S, Limbipichai S, Amnuaysin N, Boonkerd R, Charoensook M (2018) Effects of using cyanobacteria and fertilizer on growth and yield of rice, Pathum Thani I: a pot experiment. *J Appl Phycol* 30: 79–85.
- Duong TT (1996) Taxonomy of cyanobacteria of Vietnam. *Agriculture Publishing House*, Hanoi.
- Hazarika D, Duarah I, Barukial J (2012) An ecological assessment of algal growth with particular reference to blue-green algae from upper Brahmaputra valley of Assam. *Indian J Fund Appl Life Sci* 2(3): 29–35.
- Gollerbakh MM, Shtina AE (1969) Pochvennye vodorosli (Soil algae). *Idz. 'Nauka' Leningrad* 228 pp.
- Komárek J, Anagnostidis K (1999) Cyanoprokaryota, Teil, Chroococcales. - In: Ettl, H., Gärtner, G., Heynig, H., Mollenhauer, D. (eds): Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1 (pp 1-548). Fischer Verlag, Jena.
- Mazhar S, Hasnain S (2011) Screening of native plant growth promoting cyanobacteria and their impact on *Triticum aestivum* var. Uqab 2000 growth. *Afr J Agric Res* 6 (17): 3988-3993.
- Mehboob A, Stal LJ, Hasnain S (2010) Production of indole-3-acetic acid *Arthrospira platensis* strain MMG-9. *J Microbiol Biotechnol* 20:1259-1265.
- Prasanna R, Jaiswal P, Kaushik BD (2008) Cyanobacteria as potential options for environmental sustainability- promises and challenges. *Indian J. Microbiol* 48: 89-94.
- Prasanna R, Jishi M, Rana A, Nain L (2010) Modulation of IAA production in cyanobacteria by tryptophan and light. *Pol J Microbio* 59: 99–105.
- Romaneko KO, Kosakovskaya IV, Romanenko PO (2016) Phytohormones of microalgae: biological role and involvement in the regulation of physiological processes. Pt II. Cytokinins and ibberellins. *Inter J Algae* 18(2): 179–201.
- Sergeeva E, Liaimer A, Bergman B (2002). Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. *Planta* 215: 229–238.
- Shirai M, Matumaru K, Ohotake A, Takamura Y, Tokujiro A, Nakano M (1989) Development of a solid medium for growth and isolation of axenic microcystis strains (Cyanobacteria). *Appl Environ Microbiol* 55: 2569–2571.
- Singh DP, Prabha R, Yandigeri MS, Arora DK (2011) Cyanobacteria-mediated phenylpropanoids and phytohormones in rice (*Oryza sativa*) enhance plant growth and stress tolerance. *Antonie van Leeuwenhoek* 100: 557–568.
- Rahman A, Sitepu IR, Tang SY, Hashidoko Y (2010) Salkowski's reagent test as a primary screening index for functionalities of rhizobacteria isolated from wild dipterocarp saplings growing naturally on medium-strongly axitic tropical peat soil. *Biosci Biotechnol Biochem* 74(11): 2202–2208.
- Varalakshmi P, Malliga P (2012) Evidence of production of indole-3-acetic acid from a fresh water cyanobacteria (*Oscillatoria annae*) on the growth of *H. annuus*. *Inter J Sci Res Publ* 2(3):1–15.

Whitton BA, Potts M (2000) The ecology of cyanobacteria: Their diversity in time and space, *Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands*, pp. 669.

ISOLATION AND SCREENING PRODUCING GROWTH REGULATOR CYANOBACTERIA STRAINS

Doan Thi Oanh¹, Duong Thi Thuy^{2,3}, Nguyen Thi Thu Lien⁴, Dang Thi Mai Anh², Hoang Thi Quynh², Hoang Minh Thang², Vu Thi Nguyet², Le Thi Phuong Quynh⁵

¹*Ha Noi University of Natural Resources and Environment*

²*Institute of Environmental Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

³*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

⁴*Institute of Biotechnology, Hue University*

⁵*Institute of Natural Products Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

Cyanobacteria are photosynthetic microorganisms that have their biosynthesis capacities for secondary compounds with the high application value. They can produce a variety of bioactive compounds such as lipopeptides, fatty acids, toxins, carotenoids, vitamins and plant growth regulators which could be released into the culture medium. The present study aimed to isolate and screen cyanobacteria strains that could synthesize phytohormone, indole-3-acetic acid (IAA) from paddy soil and fresh water ecosystems (canals, river). Soil and water samples were collected from different provinces (Bac Giang, Thanh Hoa and Hue). Indole-3-acetic acid was extracted from the culture of isolated cyanobacteria strains and identified using the Salkowski method. As a result, total 10 strains belonging to 4 genera including *Nostoc*, *Anabena*, *Geitlerinema* and *Planktothricoides* were successfully isolated from river, canal and rice field. The morphology of isolated taxa was characterized and monoalgal cultures were grown in BG 11 medium. In L-tryptophan-enriched growth media, all cyanobacteria strains in this research were able to biosynthesize growth regulators with IAA concentrations ranging from 9.1 to 95 µg/mL. Among the isolated cyanobacteria strains, the *Planktothricoides raciborskii* showed potential for the production of IAA even in the absence of tryptophan in the culture medium. Research results of the L-tryptophan concentration effect on the ability of IAA biosynthesis of this cyanobacteria strain showed that IAA concentration increased gradually and reached the highest value ($118,28 \pm 2,00$ µg/mL) when supplementing L- tryptophan in culture medium at 900 µg/mL. The capacity of producing IAA makes these isolated cyanobacteria an appropriate candidate for agricultural biotechnology.

Keywords: *Cyanobacteria, indole-3-acetic acid (IAA), isolate, phytohormone, Planktothricoides raciborskii.*