

## TỐI ƯU HÓA MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY CHÙNG VI KHUẨN VÙNG RỄ *Priestia aryabhatai* RB.HP54 ĐỂ TĂNG KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP IAA

Trịnh Thị Huyền Trang<sup>1</sup>, Trần Thị Phương Hạnh<sup>1</sup>

Ngày nhận bài: 09/08/2024; Ngày phản biện thông qua: 16/10/2024; Ngày duyệt đăng: 17/10/2024

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành với mục tiêu tìm ra giá trị tối ưu của các yếu tố môi trường nuôi cấy tác động trực tiếp đến sinh tổng hợp IAA của chủng vi khuẩn vùng rễ *Priestia aryabhatai* RB.HP54 làm tiền đề tạo chế phẩm sinh học ứng dụng trong sản xuất. Kết quả khảo sát các đơn yếu tố của môi trường cho thấy, chủng RB.HP54 sinh trưởng và tổng hợp IAA tốt trong môi trường có thành phần glucose 5g/L, pepton 7,5 g/L và L-tryptophan 1 g/L, pH 6,5 -7. Ba yếu tố có tác động lớn nhất đến hàm lượng IAA (glucose, pepton và L-tryptophan) được tối ưu hóa bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) và sử dụng thiết kế Box – Behnken. Kết quả phân tích cho thấy, phương trình hồi quy đa biến có dạng IAA (mg/L) = 66,98 -1,81A +3,09B + 4,17C +3,46AB - 1,27AC - 0,4625BC - 6,06A<sup>2</sup> - 1,39B<sup>2</sup> - 5,74C<sup>2</sup>. Mô hình dự đoán hàm lượng IAA tối đa đạt 68,955 mg/L và thực tế thí nghiệm thu được IAA có hàm lượng 71,417 mg/L khi chủng RB.HP54 được nuôi cấy trong môi trường có thành phần glucose 4,97 g/L, pepton 8,97 g/L và L-tryptophan 1,07 g/L.

**Từ khóa:** IAA, môi trường nuôi cấy, *Priestia aryabhatai*, vi khuẩn vùng rễ.

### 1. MỞ ĐẦU

Vi khuẩn vùng rễ kích thích sinh trưởng thực vật (Plant Growth Promoting Rhizobacteria -PGPR) là những vi khuẩn tự nhiên tồn tại xung quanh rễ thực vật, trực tiếp hoặc gián tiếp tham gia kích thích sinh trưởng và phát triển của thực vật (Wang và cộng sự, 2021). Cơ chế thúc đẩy sinh trưởng thực vật của vi khuẩn vùng rễ liên quan đến việc hòa tan các chất dinh dưỡng, sản xuất các hormone tăng trưởng thực vật (indole-acid 3-acetic (IAA), 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase, cytokinin, gibberellin), cố định đạm, phân giải phosphat, kali, kẽm khó tan, siderophores, giúp cây kháng lại các mầm bệnh thực vật bằng cách tổng hợp các enzyme phân giải, các hợp chất kháng sinh, hydrogen cyanide (Poria và cộng sự, 2022). Indole acetic acid (IAA) là một trong những hợp chất quan trọng cho sự sinh trưởng và phát triển của thực vật, có tác dụng kéo dài tế bào, mở rộng tế bào và phân chia tế bào. IAA được tổng hợp cả ở thực vật và vi sinh vật. Khi IAA được sản xuất ở vi sinh vật, IAA sẽ có tác dụng làm tăng sự phát triển của rễ, chiều dài rễ, dẫn đến diện tích bề mặt rễ lớn hơn, và cho phép thực vật hấp thu được nhiều chất dinh dưỡng hơn từ đất. Chính vì vậy, IAA được xem là một trong những yếu tố cần thiết để thúc đẩy sinh trưởng thực vật (Suliasih and Widawati, 2020).

*Priestia aryabhatai* là vi khuẩn gram dương, hình que. *Priestia* (trước đây gọi là *Bacillus*) là một loài mới thuộc họ Bacillaceae thuộc bộ Bacillales (Shahid và cộng sự, 2022, Nsa và

cộng sự, 2023, Srithaworn và cộng sự, 2023). Các tế bào *P.aryabhatai* được đặc trưng bởi hình dạng và kích thước rất khác nhau (dài 2,5–4- $\mu$ m và rộng 0,8–1- $\mu$ m), tùy thuộc vào độ tuổi nuôi cấy. Chúng có khả năng sử dụng D-galactose và erythritol nhưng không thể sử dụng inositol và inulin. Phân tích về bộ gen của loài vi khuẩn này cho thấy hầu hết chúng đều mang gen chịu trách nhiệm kích thích sự phát triển của thực vật. Chúng có đặc điểm nổi bật trong chu kỳ phát triển, đó là khả năng phân chia thành nhiều dạng siêu nhỏ, góp phần vào quá trình xâm chiếm một cách nhanh chóng và hiệu quả ở vùng rễ của cây trồng (Esikova, 2021).

Phương pháp đáp ứng bề mặt (Response Surface Methodology - RSM) là một trong những thiết kế thử nghiệm được sử dụng phổ biến nhất để tối ưu hóa. RSM đóng vai trò quan trọng trong việc phân tích, thiết kế và phát triển các quy trình và sản phẩm mới. Đây là tập hợp các kỹ thuật thống kê và toán học được sử dụng để thiết lập một loạt các thử nghiệm phù hợp với mô hình thực nghiệm và xác định các điều kiện tối ưu trên các biến đầu vào của mô hình và có thể phản hồi tối đa/tối thiểu trong một vùng quan tâm (Reji and Kumar, 2022). Chính vì vậy, nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy được thực hiện với mục đích lựa chọn điều kiện nhân nuôi thích hợp của chủng *Priestia aryabhatai* RB.HP54 cho sinh tổng hợp IAA làm tiền đề để sản xuất chế phẩm vi sinh ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp bền vững.

<sup>1</sup>Khoa Khoa học tự nhiên và công nghệ, Trường Đại học Tây Nguyên;

Tác giả liên hệ: Trịnh Thị Huyền Trang; ĐT: 0932012705; Email: tttrang@ttn.edu.vn.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Đối tượng nghiên cứu: Vi khuẩn *Priestia aryabhatai* RB.HP54 đã được phân lập và tuyển chọn có hoạt tính sinh tổng hợp IAA từ vùng rễ cây rau cải trồng tại Thành phố Buôn Ma Thuột. Chúng này đã được định danh bằng phương pháp giải trình tự 16S rRNA và bảo quản trong glycerol 50% ở -20°C tại Bộ môn Sinh học, trường Đại học Tây Nguyên.

*Phạm vi nghiên cứu:* Nghiên cứu chỉ tiến hành khảo sát một số yếu tố của môi trường nuôi cấy đến mật độ, sinh tổng hợp IAA của chủng vi khuẩn vùng rễ *Priestia aryabhatai* RB.HP54 và tối ưu hóa các điều kiện này.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phương pháp xác định mật độ vi khuẩn

Mật độ vi khuẩn được xác định dựa trên phương pháp đo độ đục của huyền phù vi khuẩn ở OD<sub>610nm</sub> và phương pháp đếm khuẩn lạc gián tiếp nhằm xây dựng phương trình tương quan tuyến tính giữa độ đục và mật độ tế bào. Từ độ đục của huyền phù vi khuẩn, dựa vào đường tương quan tuyến tính suy ra mật độ của vi khuẩn cần xác định (Trần Linh Thuộc, 2007).

#### 2.2.2. Phương pháp xác định hàm lượng IAA (Phương pháp Salkowski của Glickmann và Des-saux, 1995)

Chủng vi khuẩn *P. aryabhatai* RB.HP54 chuyển từ ống giống vào bình tam giác có chứa 50 mL môi trường LB (môi trường cấp 1) đã được hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút. Chủng vi khuẩn được nuôi trên máy lắc với tốc độ lắc 150 vòng/phút, thời gian nuôi 24 h, điều chỉnh để đạt mật độ 10<sup>8</sup> CFU/ml. Dịch vi khuẩn cấp 1 (1 mL) được chuyển vào môi trường cấp 2 (Succrose 5 g/L, Pepton 10 g/L, L-tryptophan 1 g/L, NaCl 5g/L, pH 7) để thực hiện các thí nghiệm khảo sát ngưỡng tối ưu của các đơn yếu tố tại mục 2.2.3.

Dịch nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường cấp 2 được ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/ phút, 10 phút, thu dịch nổi. Dịch này được sử dụng để xác định hàm lượng IAA (mg/L) như sau: Dịch vi khuẩn sau khi ly tâm (2 mL) được cho vào ống nghiệm bổ sung thêm thuốc thử Salkowski (4 mL), ủ 10 phút trong tối ở nhiệt độ phòng sau đó tiến hành đo OD ở bước sóng 530nm. Dựa vào phương trình đường

chuẩn về tương quan giữa nồng độ IAA và OD<sub>530nm</sub> để xác định nồng độ IAA (mg/L).

#### 2.2.3. Ảnh hưởng của các đơn yếu tố đến khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng *P. aryabhatai* RB.HP54

Tiến hành khảo sát ngưỡng tối ưu của các đơn yếu tố bao gồm nguồn cacbon, nguồn nitơ, L-tryptophan và pH. Khảo sát lần lượt từng yếu tố đơn bằng cách thay đổi lần lượt từng yếu tố và cố định các yếu tố khác nhau để thu nhận ngưỡng tối ưu của các yếu tố cụ thể như sau:

Nguồn cacbon (5 g/L) bao gồm glucose, lactose, mannitol, sucrose, galactose. Cố định nguồn nitơ, L-tryptophan, NaCl và pH với thành phần như trong môi trường cấp 2. Sau khi lựa chọn được nguồn cacbon thích hợp, thay đổi các nồng độ khác nhau 0g/L, 2,5g/L, 5g/L, 7,5g/L, 10g/L, 12,5g/L và 15g/L và cố định các yếu tố còn lại. Sau khi lựa chọn được nguồn cacbon với nồng độ thích hợp nhất, tiến hành khảo sát nguồn nitơ (10 g/L) bao gồm tryptone, cao thịt, cao nấm men, pepton, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> và cố định các yếu tố bao gồm nguồn cacbon với nồng độ thích hợp đã khảo sát trên, L-tryptophan, NaCl và pH với hàm lượng như ở môi trường cấp 2. Sau khi lựa chọn được nguồn nitơ thích hợp, thay đổi các nồng độ khác nhau 0 g/L, 2,5 g/L, 5 g/L, 7,5 g/L, 10 g/L, 12,5 g/L và 15 g/L. Tiếp tục khảo sát hàm lượng của L- tryptophan lần lượt 0,25 g/L, 0,5 g/L, 0,75 g/L, 1 g/L và 1,25 g/L với các yếu tố các yếu tố khác bao gồm nồng độ cacbon, nồng độ nitơ thích hợp nhất đã khảo sát. Sau khi lựa chọn được nồng độ cacbon, nồng độ nitơ, L-tryptophan thích hợp, nghiên cứu tiếp tục khảo sát các pH khác nhau từ 5,5 đến 8,0

Chỉ tiêu theo dõi: mật độ vi khuẩn (CFU/g) và hàm lượng IAA (mg/L)

#### 2.2.4. Tối ưu hóa điều kiện sinh tổng hợp IAA bằng phương pháp đáp ứng bề mặt và thiết kế Box - Behnken

Mô hình kiểm tra các yếu tố môi trường cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp IAA của vi khuẩn được thực hiện theo phương pháp đáp ứng bề mặt và thiết kế Box – Behnken. Trong thí nghiệm có 3 mức độ khảo sát là thấp (-1), cơ sở (0) và cao (+1). Ba yếu tố (nguồn cacbon, nitơ và L-tryptophan) ảnh hưởng chính đến hàm lượng IAA được chọn lọc từ thí nghiệm trước sẽ được sử dụng trong thiết kế Box – Behnken và được ký hiệu lần lượt là A, B, C (Bảng 1)

**Bảng 1. Các yếu tố được sử dụng trong thiết kế Box - Behnken**

Tên yếu tố	Khoảng biến thiên	Mức		
		Thấp (-1)	Cơ sở (0)	Cao (+1)
A: Glucose(g/L)	2,5 -7,5	2,5	5	7,5
B: Pepton (g/L)	5,0 -10,0	5,0	7,5	10,0
C: L-tryptophan (g/L)	0,75- 1,25	0,75	1,0	1,25

Phương trình hồi quy có dạng:

$$Y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{23}BC + b_{11}A^2 + b_{22}B^2 + b_{33}C^2$$

Trong đó:  $b_0$  là hệ số hồi quy tại tâm,  $b_1, b_2, b_3$  là các hệ số tuyến tính;  $b_{11}, b_{22}, b_{33}$  là các hệ số bình phương;  $b_{12}, b_{13}, b_{23}$  là các hệ số tương tác của từng cặp yếu tố; A, B và C là các biến độc lập. Mỗi hệ số  $b$  đặc trưng cho ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình sinh tổng hợp IAA của chủng vi khuẩn *P. aryabhatai* RB.HP54.

#### 2.2.5. Kiểm định thực tế mô hình tối ưu hóa

Sau khi xác định được hàm lượng IAA từ thí nghiệm, nhập hàm lượng IAA vào ma trận được tạo từ phần mềm Design-Expert 12.0.1.0®, đọc kết quả ở mục Analysis gồm ANOVA, Diagnostic, Model Graphs và mục Optimization để xác định phương trình hồi quy. Phần mềm sẽ dự đoán hàm mục tiêu là hàm lượng IAA (mg/L) đạt giá trị cao nhất dựa trên ba yếu tố khảo sát. Sau đó thí nghiệm kiểm định giá trị mô hình dự đoán bằng

thực nghiệm với 3 lần lặp lại.

#### 2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm thống kê SAS 9.1 dùng cho Windows và Microsoft Excel 2016.

Phần mềm Design-Expert (phiên bản 12.0.1.0, Copyright©2016, Stat-Ease Inc., USA) được sử dụng tính toán hệ số của phương trình hồi quy và đề xuất giải pháp cho mô hình tối ưu hóa.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến mật độ và khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng RB.HP54

Nguồn carbon (C) sử dụng trong tổng hợp IAA là nguồn năng lượng, dinh dưỡng và làm tăng khả năng phục hồi các cofactor trong tế bào. Vì vậy, nó ảnh hưởng lớn đến hiệu suất của quá trình sinh tổng hợp IAA. Khả năng sản xuất IAA của các vi khuẩn khác nhau rất khác nhau, tùy thuộc vào nguồn C được sử dụng trong môi trường (Wagi and Ahmed, 2019).

**Bảng 2. Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến mật độ và khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng RB.HP54**

Nguồn cacbon (g/L)	Mật độ vi khuẩn ( $\times 10^5$ CFU/g)	Hàm lượng IAA (mg/L)
Glucose	2.228,67 $\pm$ 2,62 <sup>a</sup>	62,58 $\pm$ 0,84 <sup>a</sup>
Sucrose	736,00 $\pm$ 8,36 <sup>d</sup>	29,83 $\pm$ 0,19 <sup>c</sup>
Mannitol	2.213,67 $\pm$ 2,41 <sup>a</sup>	38,23 $\pm$ 0,47 <sup>b</sup>
Galactose	1.786,33 $\pm$ 4,55 <sup>c</sup>	37,10 $\pm$ 0,75 <sup>b</sup>
Lactose	1.834,67 $\pm$ 6,94 <sup>b</sup>	36,88 $\pm$ 0,74 <sup>b</sup>
CV%	0,71	1,73

*Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột là khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$  theo trắc nghiệm phân hạng Duncan.*

Qua kết quả ở bảng 2 cho thấy, các nguồn cacbon khác nhau có ảnh hưởng khác nhau đến khả năng sinh tổng hợp IAA và mật độ vi khuẩn RB.HP54, trong đó glucose và mannitol là nguồn cacbon tốt nhất đến mật độ vi khuẩn RB.HP54 tiếp theo là lactose, galactose và thấp nhất là sucrose. Tuy nhiên, hàm lượng IAA cao nhất thu được trong môi trường bổ sung glucose. Điều này có thể là do vi khuẩn sử dụng glucose cho sinh tổng hợp IAA tốt hơn so với các nguồn carbon khác. Tương tự như các nghiên cứu trước đây cho thấy, *Bacillus* sp. có khả năng sinh tổng hợp IAA tốt nhất trong môi trường có bổ sung glucose như chủng *Bacillus subtilis* TIB6 (Ton và cộng sự, 2015) với hàm lượng IAA 76,3 mg/L, chủng *Bacillus* MJHN10 (Bhutani và cộng sự, 2018) với hàm lượng IAA 99,33  $\mu$ g/mL. Tuy nhiên, chủng *Bacillus aryabhatai* MBN3 tổng hợp IAA

hiều nhất khi nguồn carbon trong môi trường là mannitol (Bhutani và cộng sự, 2018) với hàm lượng IAA đạt 114,11  $\mu$ g/ml.

Sau khi xác định được glucose là nguồn cacbon ảnh hưởng tốt nhất đến mật độ và hàm lượng IAA của chủng RB.HP54, nghiên cứu tiếp tục xác định hàm lượng glucose thích hợp cho chủng RB.HP54. Kết quả trình bày ở bảng 3 cho thấy, với nồng độ 5 g/L glucose thích hợp cho sinh trưởng và tổng hợp IAA của chủng RB.HP54. Ở nghiệm thức bổ sung 5 g/L có mật độ vi khuẩn cao gấp 2,79 lần so với bổ sung glucose 15 g/L, có hàm lượng IAA cao gấp 11,03 lần khi bổ sung glucose 0 g/L. Nghiên cứu của Cuong, P. V., & Hoa, N. P. (2021), glucose ở nồng độ 0,5 % được coi là nguồn carbon tốt nhất, tạo ra 84,13  $\pm$  1,36  $\mu$ g/mL IAA.

**Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ glucose đến mật độ và khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng RB.HP54**

Nồng độ glucose (g/L)	Mật độ vi khuẩn ( $\times 10^5$ CFU/g)	Hàm lượng IAA (mg/L)
0	195,33 $\pm$ 7,87 <sup>f</sup>	5,38 $\pm$ 0,23 <sup>f</sup>
2,5	1.289,00 $\pm$ 10,50 <sup>b</sup>	42,13 $\pm$ 0,38 <sup>b</sup>
5	<b>2.154,67<math>\pm</math>12,03<sup>a</sup></b>	<b>70,85<math>\pm</math>0,60<sup>a</sup></b>
7,5	1.310,67 $\pm$ 2,62 <sup>b</sup>	41,67 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>
10	1.000,00 $\pm$ 4,55 <sup>c</sup>	32,90 $\pm$ 1,05 <sup>c</sup>
12,5	863,67 $\pm$ 28,39 <sup>d</sup>	25,85 $\pm$ 0,68 <sup>d</sup>
15	771,33 $\pm$ 6,94 <sup>c</sup>	29,50 $\pm$ 1,20 <sup>c</sup>
CV%	1,13	2,12

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột là khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$  theo trắc nghiệm phân hạng Duncan.

**3.2. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến mật độ và khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng RB.HP54**

Nguồn nitơ bao gồm nguồn nitơ dưới dạng hữu cơ như cao nấm men, cao thịt, pepton, trypton và nguồn nitơ dưới dạng vô cơ như  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  đóng vai trò quan trọng cho sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của các nguồn nitơ khác nhau đến sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng RB.HP54 được trình bày tại bảng 4.

Trong các nguồn nitơ khảo sát, mật độ vi khuẩn

và hàm lượng IAA cao nhất ở nghiệm thức pepton (1845,33  $\times 10^5$  CFU/g và 54,75 mg/L). Tuy nhiên, mật độ vi khuẩn RB.HP54 trong môi trường sử dụng cao nấm men, pepton và trypton không có sự khác biệt về mật độ thống kê nhưng hàm lượng IAA lại có sự khác biệt thống kê. Cụ thể, hàm lượng IAA ở nghiệm thức sử dụng pepton đạt cao nhất tiếp đến là cao nấm men và trypton. Tuy nhiên, nhu cầu sử dụng nguồn nitơ để tổng hợp IAA ở mỗi chủng là khác nhau như chủng *Bacillus subtilis* TIB6 (Ton và cộng sự, 2015) là nguồn cao nấm men, chủng *Bacillus siamensis* là nguồn trypton (Suliasih and Widawati, 2020).

**Bảng 4. Ảnh hưởng của nguồn nitơ khác nhau đến mật độ và khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng RB.HP54**

Nguồn nitơ (g/L)	Mật độ vi khuẩn ( $\times 10^5$ CFU/g)	Hàm lượng IAA (mg/L)
Cao nấm men	1.577,33 $\pm$ 16,39 <sup>ab</sup>	50,83 $\pm$ 1,98 <sup>b</sup>
Cao thịt	986,33 $\pm$ 6,94 <sup>bc</sup>	29,03 $\pm$ 0,08 <sup>d</sup>
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	822,67 $\pm$ 4,55 <sup>c</sup>	16,38 $\pm$ 1,61 <sup>c</sup>
Pepton	<b>1.845,33<math>\pm</math>56,77<sup>a</sup></b>	<b>54,75<math>\pm</math>0,05<sup>a</sup></b>
Trypton	1.463,67 $\pm$ 19,81 <sup>abc</sup>	41,40 $\pm$ 1,55 <sup>c</sup>
CV%	17,78	3,63

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột là khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$  theo trắc nghiệm phân hạng Duncan.

Sau khi xác định được pepton là nguồn nitơ ảnh hưởng tốt nhất đến mật độ và hàm lượng IAA của chủng RB.HP54, nghiên cứu tiếp tục xác định hàm lượng nitơ thích hợp cho chủng RB.HP54. Mỗi chủng vi sinh vật thường có một nguồn nitơ và nồng độ thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển cũng như tổng hợp IAA. Vì vậy, nghiên cứu tiến hành xác định nồng độ của pepton đến sinh

trưởng và hàm lượng IAA của chủng RB.HP54. Kết quả bảng 5 cho thấy, nồng độ pepton 10 g/L có mật độ cao nhất tiếp theo là nồng độ 7,5 g/L. Tuy nhiên, ở nồng độ pepton 7,5 g/L có hàm lượng IAA cao nhất (69,77 mg/L) gấp 1,55 lần so với bổ sung pepton nồng độ 10 g/L. Vì vậy, nghiên cứu lựa chọn hàm lượng pepton 7,5 g/L cho các nghiên cứu tiếp theo.

**Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ pepton đến mật độ và khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng RB.HP54**

Nồng độ peptone (g/L)	Mật độ vi khuẩn ( $\times 10^5$ CFU/g)	Hàm lượng IAA (mg/L)
0	82,67 $\pm$ 0,69 <sup>f</sup>	24,25 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>
2,5	381,67 $\pm$ 4,55 <sup>c</sup>	26,15 $\pm$ 0,43 <sup>d</sup>

Nồng độ peptone (g/L)	Mật độ vi khuẩn ( $\times 10^5$ CFU/g)	Hàm lượng IAA (mg/L)
5	884,67 $\pm$ 21,48 <sup>c</sup>	36,08 $\pm$ 1,07 <sup>c</sup>
7,5	1.445,67 $\pm$ 19,81 <sup>b</sup>	69,77 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
10	1.766,67 $\pm$ 45,53 <sup>a</sup>	44,93 $\pm$ 0,50 <sup>b</sup>
12,5	672,67 $\pm$ 4,55 <sup>d</sup>	24,78 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>
15	359,00 $\pm$ 12,03 <sup>e</sup>	21,48 $\pm$ 0,13 <sup>f</sup>
CV%	2,65	1,38

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột là khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  theo trắc nghiệm phân hạng Duncan

### 3.3. Ảnh hưởng của L-tryptophan đến mật độ và khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng RB.HP54

Ở vi khuẩn, quá trình tổng hợp IAA phụ thuộc vào tryptophan bao gồm bốn con đường, trong đó tryptophan được chuyển thành IAA thông qua các chất trung gian khác nhau. Acid amin L-tryptophan (L-Trp) đóng vai trò là tiền chất sinh lý cho quá trình sinh tổng hợp auxin ở vi khuẩn nên nồng độ của nó trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng nhất định đến quá trình tổng hợp IAA (Bhutani, 2018; Cuong, P. V., & Hoa, N. P., 2021). L-Trp có nồng độ khác nhau (0-1,25g/L) đã được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và

tổng hợp IAA của chủng vi khuẩn RB.HP54. Kết quả trình bày tại bảng 6 cho thấy, mật độ vi khuẩn và hàm lượng IAA tăng dần khi sử dụng L-Trp từ nồng độ 0 g/L đến 1 g/L sau đó giảm dần ở nồng độ 1,25 g/L. Mật độ vi khuẩn RB.HP54 không có sự khác biệt khi sử dụng nồng độ L-Trp 0,75 g/L và 1,0 g/L. Về hàm lượng IAA, môi trường nuôi cấy chủng RB.HP54 không bổ sung L-Trp (0 g/L) có hàm lượng IAA thấp hơn so với khi môi trường bổ sung L-Trp. Trong các nồng độ khảo sát, hàm lượng L-Trp 1,0 g/L thích hợp nhất cho sinh tổng hợp IAA của chủng RB.HP54, gấp 2,06 lần đến 15,77 lần so với các nghiệm thức còn lại.

**Bảng 6. Ảnh hưởng của L-tryptophan đến mật độ và khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng RB.HP54**

Hàm lượng L-tryptophan (g/L)	Mật độ vi khuẩn ( $\times 10^5$ CFU/g)	Hàm lượng IAA (mg/L)
0	326,00 $\pm$ 5,25 <sup>c</sup>	4,37 $\pm$ 0,08 <sup>c</sup>
0,25	544,00 $\pm$ 13,89 <sup>c</sup>	13,61 $\pm$ 2,51 <sup>d</sup>
0,5	1.573,67 $\pm$ 2,62 <sup>b</sup>	15,76 $\pm$ 2,67 <sup>d</sup>
0,75	2.198,67 $\pm$ 14,61 <sup>a</sup>	33,44 $\pm$ 0,45 <sup>b</sup>
1	2.341,00 $\pm$ 13,64 <sup>a</sup>	68,92 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>
1,25	1.586,33 $\pm$ 59,09 <sup>b</sup>	28,47 $\pm$ 0,13 <sup>c</sup>
CV%	14,53	3,97

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột là khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$  theo trắc nghiệm phân hạng Duncan.

Ở nhiều vi khuẩn như *Azospirillum*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas agglomerans* và *Pseudomonas putida* hàm lượng IAA đều gia tăng khi sử dụng tryptophan ngoại sinh. Mỗi chủng vi khuẩn sẽ có nhu cầu sử dụng lượng tryptophan ngoại sinh không giống nhau để sản xuất IAA vì chúng có khả năng tổng hợp tryptophan nội sinh khác nhau (Idris và cộng sự, 2007). Nghiên cứu của Đỗ Tất Thịnh và cộng sự (2023) đã chỉ ra chủng PPM4.5 (OQ149978) với tên khoa học *Priestia megaterium* NBRC15308 (NR112636) có khả năng sinh IAA cao với hàm lượng 30,05 mg/L khi bổ sung L-tryptophan với hàm lượng 1 g/L.

### 3.4. Ảnh hưởng của pH đến mật độ và khả năng

#### sinh tổng hợp IAA của chủng RB.HP54

Điều kiện hóa lý của môi trường nuôi cấy luôn đặc trưng cho từng đối tượng vi sinh vật để tổng hợp các sản phẩm thứ cấp. pH của môi trường nuôi cấy là một trong những thông số quan trọng đối với sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn sản xuất IAA, vì nó ảnh hưởng đến hoạt động của các enzyme cần thiết trong quá trình sinh tổng hợp IAA (Duca và cộng sự, 2014).

**Bảng 7. Ảnh hưởng của điều kiện pH đến mật độ và khả năng sinh tổng hợp IAA của chủng RB.HP54**

pH	Mật độ vi khuẩn (x10 <sup>5</sup> CFU/g)	Hàm lượng IAA (mg/L)
5,5	884,33±20,45 <sup>f</sup>	45,98±0,22 <sup>d</sup>
6,0	1.522,67±45,45 <sup>d</sup>	54,98±0,27 <sup>c</sup>
6,5	1.873,00±9,09 <sup>b</sup>	<b>66,20±0,35<sup>a</sup></b>
7,0	<b>2.161,33±20,45<sup>a</sup></b>	60,50±0,10 <sup>b</sup>
7,5	1.632,00±27,27 <sup>c</sup>	34,63±0,18 <sup>e</sup>
8,0	1.045,33±4,55 <sup>e</sup>	16,75±0,05 <sup>f</sup>
CV(%)	1,87	1,56

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột là khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  theo trắc nghiệm phân hạng Duncan.

Môi trường nuôi cấy chủng RB.HP54 được điều chỉnh pH từ 5,5- 8 (bước nhảy 0,5 cho mỗi giá trị) để đánh giá ảnh hưởng của pH đến mật độ vi khuẩn và hàm lượng IAA. Kết quả nghiên cứu bảng 7 cho thấy, mật độ và của chủng RB.HP54 đều tăng dần từ pH 4,5 đến pH7, sau đó giảm dần từ pH 7,5. Mật độ vi khuẩn thích hợp nhất trong môi trường có pH 7 gấp 1,15 lần pH 6,5 và gấp 1,32 lần pH 7,5. Tuy nhiên, hàm lượng IAA của chủng RB.HP54 đạt cao nhất ở pH 6,5 (66,20 mg/L) gấp 1,09 lần pH 7. Như vậy, pH từ 6,5 -7 thích hợp cho sự sinh trưởng và tổng hợp IAA của chủng RB.HP54.

**Bảng 8. Ảnh hưởng của glucose, pepton và L – tryptophan đến hàm lượng IAA (mg/L) theo thiết kế Box – Behnken**

Nghiem thức	A:Glucose (g/L)	B:Pepton (g/L)	C:L-tryptophan (g/L)	Hàm lượng IAA (mg/L)	
				Thực nghiệm	Mô hình
1	5	7,5	1	68,93	66,98
2	7,5	7,5	0,75	50,30	50,47
3	5	7,5	1	65,65	66,98
4	2,5	7,5	1,25	62,60	62,43
5	5	5	1,25	61,75	61,39
6	5	7,5	1	66,35	66,98
7	2,5	7,5	0,75	50,93	51,55
8	2,5	5	1	61,18	61,71
9	5	10	0,75	58,88	59,24
10	7,5	5	1	50,18	51,16
11	5	5	0,75	53,28	52,13
12	2,5	10	1	61,95	60,97
13	7,5	10	1	64,80	64,27
14	7,5	7,5	1,25	56,88	56,26
15	5	10	1,25	65,50	66,65

Nghiên cứu của Cuong, P. V., & Hoa, N. P. (2021 ghi nhận, khả năng sinh IAA của *Bacillus* sp. DTAN1-M5 tăng lên khi tăng pH từ 6 lên 7,1 và đạt giá trị tối đa ( $76,67 \pm 2,15 \mu\text{g/mL}$ ) ở pH này. Sau đó, việc sản xuất IAA giảm dần khi độ pH tiếp tục tăng. Tương tự, chủng *B. safensis* YKS2 được tối ưu hóa ở các giá trị pH (4 đến 9), tốt nhất ở pH tối ưu là 7,00 (Lakshmanan và cộng sự, 2022).

**3.5. Tối ưu hóa quá trình sinh tổng hợp IAA**

Ba yếu tố đơn có ảnh hưởng lớn nhất đến hàm lượng IAA gồm có glucose, pepton và L-tryptophan được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo nhằm tối ưu hóa quá trình sinh tổng hợp IAA theo phương pháp đáp ứng bề mặt RSM – BBD. Hàm lượng IAA đạt từ 50,18 mg/L đến 68,93 mg/L trong môi trường có thành phần glucose 5 g/L, pepton 7,5 g/L và L- tryptophan 1 g/L (Bảng 8). Kết quả phân tích ANOVA (Bảng 9) cho thấy, các giá trị A, B, C của nhân tố tuyến tính và các giá trị A<sup>2</sup>, C<sup>2</sup> có ý nghĩa tin cậy cao (giá trị P < 0,05). Mô hình được thiết lập với các giá trị F (24,49) và giá trị P (0,0013) có ý nghĩa thống kê cao. Dựa vào kết quả phân tích, ảnh hưởng của glucose, pepton và L-tryptophan được mô tả dưới dạng mô hình bậc hai bởi các đơn vị được mã hóa có dạng  $Y = 66,98 - 1,81A + 3,09B + 4,17C + 3,46AB - 1,27AC - 0,4625BC - 6,06A^2 - 1,39B^2 - 5,74C^2$

Trong đó, Y là hàm lượng IAA (mg/L), A là glucose (g/L), B là pepton (g/L), C là L-tryptophan (g/L).

Với giá trị p của mô hình nhỏ hơn 0,0013 (có ý nghĩa thống kê) và giá trị p của kiểm định sự không phù hợp là 0,6357 (> 0,05 không có ý nghĩa thống kê), điều này cho thấy mô hình có sự phù hợp. Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) ở bảng 9 cho thấy, sự thay đổi hàm lượng glucose (giá trị  $p = 0,0218$ ), pepton (giá trị  $p = 0,0025$ ) và L-tryptophan (giá trị  $p = 0,0006$ ) đều ảnh hưởng tích cực đến hàm lượng IAA. Sự tương tác giữa hai yếu tố glucose và pepton (AB, giá trị  $P = 0,0068$ ) ảnh hưởng mạnh đến hàm lượng IAA, tương tác giữa hai yếu tố glucose và L-tryptophan (AC, giá trị  $P = 0,1639$ ) ít tác động đến hàm lượng IAA. Tuy nhiên, tương tác giữa pepton và L-tryptophan (BC, giá trị  $P = 0,5792$ ) đều ảnh hưởng không nhiều đến

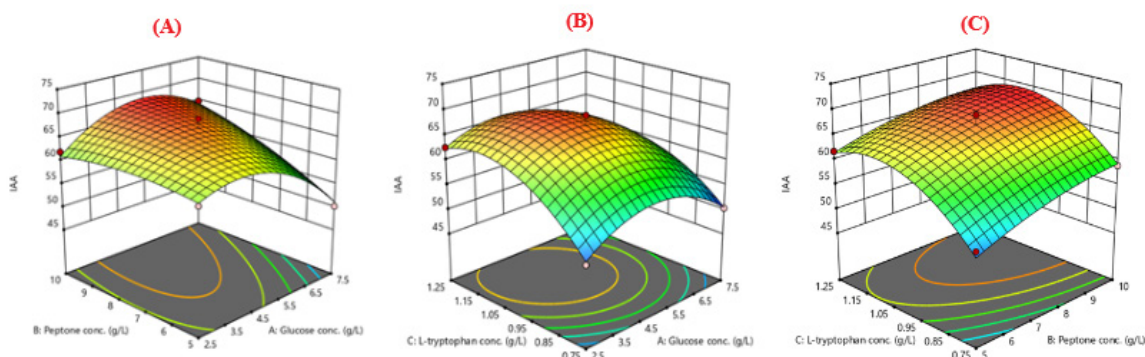
hàm lượng IAA.

Mô hình tương quan được xây dựng từ thí nghiệm có  $R^2$  (hệ số xác định tương quan) cao đạt 0,9778 cho thấy 97,78% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu mô hình. Chứng tỏ, các biến được lựa chọn có mối quan hệ chặt chẽ với nhau và có sự phù hợp trong mô hình.  $R^2$  hiệu chỉnh của mô hình cao ( $Adj-R^2=0,9379$ ) cho thấy mô hình thể hiện thực tế khá chính xác và  $R^2$  dự đoán ( $Pred-R^2=0,7945$ ) phù hợp với  $R^2$  hiệu chỉnh (sai khác phù hợp là nhỏ hơn 0,2). Độ chính xác đầy đủ ( $Adeq\ Precision = 12,9520$ ) thể hiện một tỉ lệ tín hiệu trên nhiễu tốt (yêu cầu >4), điều này cho thấy mô hình phù hợp để đưa vào thực tế (Trương Phước Thiên Hoàng, 2021).

**Bảng 9. Phân tích thống kê ANOVA về hàm lượng IAA**

Nhân tố	Tổng bình phương	df	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P	Ý nghĩa
Mô hình	537,00	9	59,67	24,49	0,0013	Ý nghĩa
A- Glucose	26,28	1	26,28	10,79	0,0218	
B- Peptone	76,51	1	76,51	31,40	0,0025	
C- L- tryptophan	138,94	1	138,94	57,03	0,0006	
AB	47,96	1	47,96	19,68	0,0068	
AC	6,48	1	6,48	2,66	0,1639	
BC	0,8556	1	0,8556	0,3512	0,5792	
A <sup>2</sup>	135,69	1	135,69	55,69	0,0007	
B <sup>2</sup>	7,10	1	7,10	2,92	0,1484	
C <sup>2</sup>	121,53	1	121,53	49,88	0,0009	
Sự không phù hợp	6,21	3	2,07	0,6940	0,6357	Không ý nghĩa
Pure Error	5,97	2	2,98			
Total	549,18	14				

Ghi chú:  $CV=2,6$ ;  $R^2 = 0,9778$ ;  $Pred-R^2=0,7945$ ;  $Adj-R^2=0,9379$ ;  $Adeq\ Precision = 12,9520$



**Hình 1. Biểu đồ đáp ứng bề mặt 3D của IAA (µg/mL) theo các cặp yếu tố ảnh hưởng**

Ghi chú: (A) Tương tác giữa glucose và pepton; (B) tương tác giữa glucose và L-tryptophan; (C) tương tác giữa pepton và L-tryptophan.

Mức độ tối ưu của mỗi yếu tố đối với hàm lượng IAA và sự tương tác của từng cặp yếu tố được xác định thông qua đồ thị bề mặt 3D (đồ thị đáp ứng bề mặt) với trục Z là hàm lượng IAA và

2 yếu tố độc lập bất kỳ, trong khi đó, yếu tố còn lại được duy trì ở mức tối ưu của chúng. Hình 1a và 1b cho thấy, glucose ảnh hưởng không nhiều đến hàm lượng IAA, khoảng giá trị thích hợp của

glucose từ 4,5 g/L – 5,5 g/L. Tuy nhiên, kết quả ở hình 1a và 1c cho thấy, pepton và L-tryptophan là yếu tố ảnh hưởng lên đến hàm lượng IAA với khoảng tối ưu của pepton từ 8 -9 g/L, L-tryptophan từ 0,95 – 1,15 g/L.

### 3.6. Kiểm định thực tế mô hình tối ưu

**Bảng 10. Kết quả kiểm định mô hình thực tế**

Chỉ tiêu	Trung bình dự đoán	Độ lệch chuẩn	n	SE dự đoán	95% PI (khoảng dự đoán) thấp	Trung bình thực nghiệm	95% PI (khoảng dự đoán) cao
IAA (mg/L)	68,955	1,561	3	1,229	65,795	71,417	72,116

### 4. KẾT LUẬN

Ba yếu tố môi trường nuôi cấy được lựa chọn (glucose 5 g/L, pepton 7,5 g/L và L- tryptophan 1 g/L) từ thí nghiệm khảo sát các yếu tố đơn với khoảng giá trị thích hợp để thiết kế tối ưu bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) – thiết kế Box Behnken. Thông qua kết quả thực nghiệm phương trình hồi quy có dạng  $IAA (mg/L) = 66,98 - 1,81A + 3,09B + 4,17C + 3,46AB - 1,27AC - 0,4625BC - 6,06A^2 - 1,39B^2 - 5,74C^2$ . Hàm lượng IAA được mô hình dự đoán cao nhất đạt giá trị 71,417 mg/L

Từ các kết quả thu được và phương trình hồi quy, các yếu tố tối ưu trong môi trường được xác định gồm glucose 4,97 g/L, pepton 8,97 g/L, L-tryptophan 1,07 g/L với hàm lượng IAA thực tế thu được đạt 71,417 mg/L.

với thành phần môi trường gồm glucose 4,97 g/L, pepton 8,97 g/L, L-tryptophan 1,07 g/L. Tuy nhiên, các nghiên cứu tiếp theo cần xác định thêm các yếu tố nhiệt độ, thời gian, tốc độ lắc kết hợp với các giá trị tối ưu đã khảo sát.

\* **Lời cảm ơn:** Đề tài này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp cơ sở: “Tối ưu hóa điều kiện sinh tổng hợp IAA của chủng vi khuẩn vùng rễ RP.HP54 và ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây rau cải ngọt”, mã số T2024 –08CB của trường ĐH Tây Nguyên.

## OPTIMIZING THE CULTURE MEDIUM OF RHIZOBACTERIA *Priestia aryabhatai* RB.HP54 TO INCREASE IAA BIOSYNTHESIS ABILITY

Trinh Thi Huyen Trang<sup>1</sup>, Tran Thi Phuong Hanh<sup>1</sup>

Received Date: 09/08/2024; Revised Date: 16/10/2024; Accepted for Publication: 17/10/2024

### ABSTRACT

This study aimed to determine the optimal values of culture medium factors that directly affect IAA biosynthesis in the rhizobacteria *Priestia aryabhatai* strain RB.HP54. This information is crucial for the development of biological products for use in production. The experimental results of environmental single factors showed that RB.HP54 grew and synthesized IAA effectively when cultured in a medium containing 5 g/L glucose, 7.5 g/L peptone, and 1 g/L L-tryptophan at pH 6.5 -7. The three most influential factors on IAA content (glucose, peptone, and L-tryptophan) were optimized using response surface methodology (RSM) with the Box-Behnken design. The multivariate regression equation was found to be  $IAA (mg/L) = 66.98 - 1.81A + 3.09B + 4.17C + 3.46AB - 1.27AC - 0.4625BC - 6.06A^2 - 1.39B^2 - 5.74C^2$ . The model predicted a maximum IAA content of 68.955 mg/L, and the actual experiment yielded an IAA content of 71.417 mg/L when the RB.HP54 strain was cultured in a medium containing 4.97 g/L glucose, 8.97 g/L peptone, and 1.07 g/L L-tryptophan.

**Keywords:** IAA, medium, *Priestia aryabhatai*, rhizobacteria.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Trương Phước Thiên Hoàng, Lê Phước Thọ, Vũ Phú Quang, Nguyễn Phú Hòa, Nguyễn Văn Thống, Phạm

<sup>1</sup>Faculty of Natural Science and Technology, Tay Nguyen university;

Corresponding author: Trinh Thi Huyen Trang; Tel: 0932012705; Email: tthtrang@ttn.edu.vn.



- Công Hoạch (2021). Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men thu sinh khối vi khuẩn *Pseudomonas stutzeri* bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM). *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 19(11): 1509-1521
- Đỗ Tất Thịnh, Lê Xuân Sơn, Trần Thị Nhân, Nguyễn Thị Kim Oanh, Nguyễn Văn Hiếu (2023). Tuyến chọn và xác định đặc điểm sinh học của một số chủng vi khuẩn có khả năng sinh Indole-3-acetic acid (IAA). *TNU Journal of Science and Technology*, 228(13): 162 – 169.
- Trần Linh Thuộc (2007). *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*. NXB Giáo dục
- Bhutani, N., Maheshwari, R., Negi, M., & Suneja, P. (2018). Optimization of IAA production by endophytic *Bacillus* spp. from *Vigna radiata* for their potential use as plant growth promoters. *Israel journal of plant sciences*, 65(1-2), 83-96.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., & Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106, 85-125.
- Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 61(2), 793-796.
- Esikova, T. Z., Anokhina, T. O., Abashina, T. N., Suzina, N. E., & Solyanikova, I. P. (2021). Characterization of soil bacteria with potential to degrade benzoate and antagonistic to fungal and bacterial phytopathogens. *Microorganisms*, 9(4), 755.
- Idris, E.E., Iglesias, D.J., Talon, M., Borriss, R. (2007). Tryptophan-Dependent Production of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Affects Level of Plant Growth Promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:619–626.
- Lakshmanan, R., Poyil, M. M., Kalaimurugan, D., Sivasankar, P., Ponnurugan, K., & Venkatesan, S. (2022). Optimization, Characterization and Quantification of Indole Acetic Acid Produced by a Potential Plant Growth Promoting Rhizobacterium *Bacillus safensis* YKS2 from Yercaud Hills, Eastern Ghats. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 16(3).
- Nsa, I. Y., & Omolere, B. M. (2023). Draft genome sequence and annotation of *Priestia aryabhatai* strain BD1 isolated from a dye sediment. *Microbiology Resource Announcements*, 12(2), e01175-22.
- Cuong, P. V., & Hoa, N. P. (2021). Optimization of culture condition for iaa roduction by *Bacillus* sp. isolated from cassava field of Vietnam. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 59(3), 312-323
- Poria, V., Dębiec-Andrzejewska, K., Fiodor, A., Lyzohub, M., Ajijah, N., Singh, S., & Pranaw, K. (2022). Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) integrated phytotechnology: A sustainable approach for remediation of marginal lands. *Frontiers in Plant Science*, 13, 999866.
- Reji, M., & Kumar, R. (2022). Response surface methodology (RSM): An overview to analyze multivariate data. *Indian J. Microbiol. Res*, 9, 241-248.
- Wagi, S., & Ahmed, A. (2019). *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. *PeerJ*, 7, e7258.
- Shahid, M., Zeyad, M. T., Syed, A., Singh, U. B., Mohamed, A., Bahkali, A. H., ... & Pichtel, J. (2022). Stress-tolerant endophytic isolate *Priestia aryabhatai* BPR-9 modulates physio-biochemical mechanisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) for enhanced salt tolerance. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(17), 10883.
- Srithaworn, M., Jaroenthanayakorn, J., Tangjitjaroenkun, J., Suriyachadkun, C., & Chunhachart, O. (2023). Zinc solubilizing bacteria and their potential as bioinoculant for growth promotion of green soybean (*Glycine max* L. Merr.). *PeerJ*, 11, e15128.
- Suliasih and S Widawati (2020). Isolation of Indole Acetic Acid (IAA) producing *Bacillus siamensis* from peat and optimization of the culture conditions for maximum IAA production. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 572, No. 1, p. 012025). IOP Publishing.
- Ton That Huu Dat, Nguyen Thị Kim Cuc, and Pham Viet Cuong (2015). Optimization of indole-3-acetic acid production by *Bacillus subtilis* TIB6 using response surface methodology. *International Journal of Development Research*, 5(4), 4036-4042.
- Wang, H., Liu, R., You, M. P., Barbetti, M. J., & Chen, Y. (2021). Pathogen biocontrol using plant growth-promoting bacteria (PGPR): Role of bacterial diversity. *Microorganisms*, 9(9), 1988.