BẢN TRÍCH YẾU LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Tên tác giả: Hoàng Thị Lan Anh

Tên luận án: "Nghiên cứu vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và tổng hợp IAA cho một số cây trồng tại Thái Nguyên"

Ngành: Công nghệ sinh học **Mã số: 9.42.02.01**

Tên cơ sở đào tạo: Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

Mục tiêu nghiên cứu:

Phân lập, tuyển chọn, định danh được chủng vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp indole -3- acetic (IAA) để sản xuất phân hữu cơ vi sinh cho một số cây trồng tại Thái Nguyên.

Phương pháp nghiên cứu:

Nghiên cứu sử dụng phương pháp thu thập số liệu thứ cấp từ các cơ quan quản lý trong tỉnh Thái Nguyên làm cơ sở cho việc nghiên cứu đề tài; phương pháp phân lập và tuyển chọn vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA từ 175 mẫu thu thập ngẫu nhiên tại 10 địa phương sau đó tiến hành nghiên cứu đặc điểm hình thái tế bào, khuẩn lạc và tính chất nhuộm Gram, định danh đến loài chủng vi sinh vật dựa vào trình tự gen 16SrRNA, giải trình tự hệ gen vi sinh vật; đánh giá đặc điểm sinh học của một số chủng vi sinh vật tuyển chọn bao gồm đặc điểm sinh lý, đặc điểm sinh hóa, phân tích sơ bộ cấu trúc hệ gen của vi sinh vật làm căn cứ để phân tích trình tự các gen, vị trí gen, trình tự promoter bằng các phần mềm chuyên dụng. Trên cơ sở đó, tiến hành xác định sự hiện diện của các gen chức năng bằng phương pháp PCR, một số chủng tiềm năng được thử hoạt tính đối kháng lẫn nhau bằng phương pháp cấy vạch.

Từ một số chủng vi sinh vật được tuyển chọn, tiến hành sản xuất 05 mẻ liên tiếp phân hữu cơ vi sinh theo Quy trình mã số MREC-QTCN-2022-03 của Trung tâm Môi trường Tài nguyên Miền núi ban hành theo Quyết định số 32/QĐ-TTMTTNMN ngày 28 tháng 03 năm 2023. Chất lượng phân HCVS được đánh giá theo các chỉ tiêu của TCVN 7185:2002 về phân hữu cơ vi sinh vật.

Sử dụng phương pháp đánh giá ảnh hưởng của liều lượng phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa và cây ngô theo quyết định 726/QĐ-BNN-KN ngày 24 tháng 02 năm 2022 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (nay là Bộ Nông nghiệp và Môi trường) ban hành định mức kinh tế - kỹ thuật khuyến nông Trung ương. Quy trình chăm sóc lúa được thực hiện theo QCVN 01-55/2011/BNNPTNT về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống lúa; Quy trình chăm sóc cây ngô theo QCVN 01-56/2011/BNN&PTNT về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng giống ngô. Sau khi xác định được liều lượng sử dụng cho hiệu quả tốt nhất đối với lua và ngô, tiến hành đánh giá hiệu quả kinh tế sử dụng phân bón hữu cơ vi sinh trên mô hình diện rộng (0,5 ha/ mô hình) theo TCVN 12719:2019. Sử dụng các phần mềm SAS 9.1, Design-Expert (DX 7.1.5), JASP 0.19.3., Microsoft excel 2015 để tổng hợp và xử lý số liệu và tối ưu thông số kỹ thuật.

Kết quả chính và kết luận

1. Kết quả phân lập và tuyển chọn vi sinh vật có khả năng cố định niitơ và sinh tổng hợp IAA

- Từ 175 mẫu thu thập ngẫu nhiên trên 7 đối tượng đất trồng, rễ cây tại 10 địa phương, sử dụng môi trường chọn lọc đặc thù Ashby- vô đạm đã phân lập được 80 chủng vi sinh vật có khả năng cố định nitơ. Trong đó có 38 chủng có khả năng đồng thời cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA tập trung ở 3 đối tượng chính: đất trồng lúa 14,42%; đất trồng ngô 31,58% và đất trồng chè 39,47%. Kết quả phân tích đánh giá có 6 chủng vi sinh vật bao gồm: NL1, NL3, MN88, MN42, MN47 và MN72 vừa có khả năng cố định nitơ vừa có khả năng sinh tổng hợp IAA đạt giá trị giới hạn về khả năng cố định nitơ (≥ 20 µg/ml); khả năng sinh tổng hợp IAA (≥ 50 µg/ml); 6 chủng đều có khả năng di động.

- Kết quả giải trình tự gen 16SrRNA của 6 chủng nghiên cứu cho thấy sự tương đồng từ 99,20 %-100,00% với các trình tự gen của các loài đã được công bố trên ngân hàng gen NCBI và trên Eztaxon, các loài vi sinh vật này đều có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA.

- Quá trình đánh giá tương tác giữa 6 chủng sàng lọc, chọn được 02 chủng là NL1 và NL3 không đối kháng và không thể hiện sự ức chế/kìm hãm lẫn nhau.

2. Kết quả đặc điểm sinh học của một số chủng tuyển chọn

- Khi nuôi cấy trên môi trường Ashby, mật độ tế bào của chủng NL1 đạt giá trị lớn nhất sau 5 ngày nuôi cấy, trong khi chủng NL3 sau 4 ngày nuôi cấy, nhiệt độ thích hợp cho cả 2 chủng phát triển là 32°C, pH thích hợp cho NL1 và NL3 phát triển lần lượt là 6,5 và 7,0 kết quả này trùng khớp với thí nghiệm tối ưu hóa quá trình nuôi cấy được thiết kế thử nghiệm bằng mô hình Box-Behnken.

+ Chủng *Azospirillum* sp. NL1: có nhiệt độ và pH tối ưu cho quá trình nuôi tăng sinh trong môi trường lỏng lần lượt là 31,73 °C và 6,61; Thể hiện 11/19 hoạt tính sinh enzyme và 37/53 chỉ tiêu hóa sinh được khảo sát.

+ Chủng *Azotobacter* sp. NL3: có nhiệt độ và pH tối ưu cho quá trình nuôi tăng sinh trong môi trường lỏng lần lượt là 32,18°C, pH = 7,10; Thể hiện 9/19 hoạt tính sinh enzyme và 25/53 chỉ tiêu hóa sinh được khảo sát.

- Kết quả phân tích bộ genome của chủng NL1 đã xác định sự hiện diện của các gene liên quan đến con đường cố định nitơ trong trình tự bộ gene của mẫu. Kết quả cho thấy trong genome của chủng NL1 có 29 gen tham gia vào quá trình cố định nitơ và 4 gen tham gia vào quá trình tổng hợp IAA. Trong khi đó chủng NL3 có 45 gen liên quan tham gia vào quá trình cố định nitơ và 07 gen tham gia vào con đường chuyển hóa IAA khi tham chiếu trên CSDL MetaCyc.

- Kết quả đánh giá an toàn sinh học của 2 chủng vi sinh vật tuyển chọn chủng NL1, NL3 được xác định đảm bảo an toàn sinh học cấp 1.

3. Kết quả sản xuất phân hữu cơ vi sinh với một số chủng vi sinh vật tuyển chọn

- Đã sản xuất được 2.000 kg phân hữu cơ vi sinh đạt yêu cầu về phân hữu cơ vi sinh theo QCVN 01-189: 2019/BNNPTNT về chất lượng phân bón và TCVN 7185:2002 về phân hữu cơ vi sinh vật.

- Đã nghiên cứu xác định được liều lượng sử dụng phân hữu cơ phù hợp đối với cây lúa là 1,5 tấn/ ha, cây ngô 2,0 tấn /ha.

4. Kết quả đánh giá hiệu quả sử dụng phân hữu cơ vi sinh chứa một số chủng vi sinh vật tuyển chọn trên cây lúa và ngô (quy mô 0,5 ha/ mô hình)

- Đã đánh giá được năng suất thực tế trên mô hình cây lúa và cây ngô sử dụng phân hữu cơ vi sinh. Kết quả trên cây lúa đạt 63,23 tạ/ ha; cây ngô 89,18 tạ/ ha.

- Đã đánh giá hiệu quả kinh tế mô hình cây lúa và cây ngô sử dụng phân hữu cơ vi sinh cụ thể: mô hình cây lúa tăng 16,62%, lợi nhuận tăng 10.062.000 đồng (tương đương 35,7%) so với đối chứng; mô hình cây ngô tăng 15,67%, lợi nhuận tăng 11.044.000 đồng (tương đương 39,6 %) so với đối chứng.

Người hướng dẫn khoa học		**Nghiên cứu sinh**
TS. Trần Văn Chí	**TS. Nguyễn Thanh Hải**	**Hoàng Thị Lan Anh**

THESIS ABSTRACT

Author: Hoang Thi Lan Anh

Thesis Title: "Research on Microorganisms Capable of Nitrogen Fixation and IAA Biosynthesis for Selected Crops in Thai Nguyen"

Major: Biotechnology **Code:** 9.42.02.01

Educational Institution: Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry

Research Objective

This study aimed to isolate, select, and identify microbial strains capable of nitrogen fixation and indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis for the production of microbial bio-fertilizer for selected crops in Thai Nguyen Province.

Materials and Methods

The study employed secondary data collection from administrative agencies in Thai Nguyen Province as the basis for the research. Microbial strains capable of nitrogen fixation and IAA biosynthesis were isolated and selected from 175 randomly collected samples across 10 localities. Morphological characteristics of cells and colonies, Gram staining properties, and species-level identification were conducted based on 16S rRNA gene sequencing and whole-genome sequencing. The biological characteristics of selected microbial strains were assessed, including their physiological and biochemical traits. Preliminary analysis of microbial genome structure was performed to support gene sequence analysis, gene location, and promoter sequence identification using specialized software. The presence of functional genes was determined using PCR. Antagonistic activity among potential strains was evaluated using the streak method.

Selected microbial strains were used to produce five consecutive batches of microbial organic fertilizer following Procedure Code MREC-QTCN-2022-03 issued by the Center for Mountainous Environmental Resources under Decision No. 32/QĐ-TTMTTNMN dated March 28, 2023. Fertilizer quality was assessed according to the criteria specified in TCVN 7185:2002 for microbial organic fertilizers.

The impact of microbial organic fertilizer dosage on rice and maize was evaluated based on Decision No. 726/QĐ-BNN-KN dated February 24, 2022, issued by the Ministry of Agriculture and Rural Development (currently the Ministry of Agriculture and Environment), which stipulates national technical-economic norms for agricultural extension. Rice cultivation procedures followed QCVN 01-55/2011/BNNPTNT, and maize cultivation procedures followed QCVN 01-56/2011/BNN&PTNT, both concerning the testing of cultivation and usage value of crop varieties. For large-scale model development, one dosage formula demonstrating optimal effectiveness from the trials was selected to assess the economic efficiency of fertilizer use. A comparison was made between the experimental fertilizer and the control fertilizer according to TCVN 12719:2019.

Data analysis and technical parameter optimization were conducted using SAS 9.1, Design-Expert (DX 7.1.5), JASP 0.19.3, and Microsoft Excel 2015.

Results and Conclusions

1. Results of Isolation and Selection of Microorganisms Capable of Nitrogen Fixation and IAA Biosynthesis

- From 175 randomly collected samples of cultivated soils and plant roots across seven target cropping systems in 10 locations, 80 nitrogen-fixing microbial strains were isolated using the selective nitrogen-free Ashby medium. Among these, 38 strains exhibited both nitrogen fixation and IAA synthesis capabilities, primarily found in three sample types: rice-cultivated soil (14,42%), maize-cultivated soil (31,58%), and tea-cultivated soil (39,47%). Six strains, including NL1, NL3, MN88, MN42, MN47, and MN72, exhibited nitrogen fixation capacity (≥ 20 µg/ml) and IAA biosynthesis capacity (≥ 50 µg/ml), and all six strains were motile.

- The 16S rRNA gene sequencing of the six strains revealed 99,20%–100,00% similarity with published sequences in the NCBI GenBank and EzTaxon databases. The identified species were demonstrated to possess nitrogen fixation and IAA biosynthesis capabilities.

- Interaction assessment among the six selected strains was presented between NL1 and NL3, which were non-antagonistic and did not exhibit mutual inhibition.

2. Biological Characteristics of Selected Microbial Strains

- Strain NL1 demonstrated the highest cell density after five days when cultured on Ashby medium, while strain NL3 peaked after four days. The optimal temperature for the growth of both strains was 32°C. The optimal pH for NL1 and NL3 was 6,5 and 7,0 respectively. These results were consistent with the culture optimization experiment designed using the Box-Behnken model.

+ Strain Azospirillum sp. NL1 exhibited optimal growth conditions in liquid medium at 31,73°C and pH 6,61. It demonstrated 11 out of 19 enzymatic activities and met 37 out of 53 biochemical criteria assessed.

+ Strain Azotobacter sp. NL3 exhibited optimal growth conditions in liquid medium at 32.18°C and pH 7.10. It demonstrated 9 out of 19 enzymatic activities and met 25 out of 53 biochemical criteria assessed.

- Genome analysis of strain NL1 confirmed the presence of genes associated with the nitrogen fixation pathway. Specifically, 29 genes related to nitrogen fixation and 4 genes related to IAA biosynthesis were identified. In comparison, strain NL3 contained 45 genes associated with nitrogen fixation and 7 genes involved in IAA metabolism, based on the MetaCyc database references.

- Biosafety assessment of strains NL1 and NL3 confirmed that both meet biosafety level 1 standards.

3. Production of Microbial Organic Fertilizer Using Selected Microbial Strains

- A total of 2.000 kg of microbial organic fertilizer was produced. The final products meet the requirements of QCVN 01-189:2019/BNNPTNT on fertilizer quality and TCVN 7185:2002 on microbial organic fertilizers.

- Suitable rates of fertilizer application to crops were determined as 1,5 tons/ha for rice and 2,0 tons/ha for maize.

4. Effectiveness Evaluation of Microbial Organic Fertilizer Containing Selected Microbial Strains on Rice and Maize at the Model Scale of 0,5 ha

- Actual crop yields were assessed in rice and maize models using microbial organic fertilizer. The yields of rice and maize reached 63,23 quintals/ha and 89,18 quintals/ha, respectively.

- Economic efficiency was evaluated, showing the yield of rice increased by 16,62%, with profit rising by VND 10.062.000 (equivalent to 35,7%) compared to the control. For maize, the yield increased by 15.67%, with profit rising by VND 11.044.000 (equivalent to 39,6%) compared to the control.