

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM



HOÀNG THỊ LAN ANH

**NGHIÊN CỨU VI SINH VẬT CÓ KHẢ NĂNG
CỐ ĐỊNH NITƠ VÀ TỔNG HỢP IAA CHO MỘT SỐ
CÂY TRỒNG TẠI THÁI NGUYÊN**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2025

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM



HOÀNG THỊ LAN ANH

**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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: TS. Trần Văn Chí
TS. Nguyễn Thanh Hải

THÁI NGUYÊN - 2025

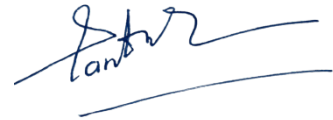
LỜI CAM ĐOAN

Tác giả xin cam đoan luận án là công trình nghiên cứu của tác giả, tất cả các kết quả nghiên cứu trình bày trong luận án đảm bảo trung thực, khách quan và chưa sử dụng để bảo vệ ở bất kì học vị nào, các thông tin trích dẫn trong luận án đều được chỉ rõ nguồn gốc.

Trong quá trình thực hiện luận án này mọi sự giúp đỡ đã được cảm ơn.

Thái Nguyên, ngày 12 tháng 09 năm 2025

Tác giả luận án

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Lan Anh', with a horizontal line underneath.

Hoàng Thị Lan Anh

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình thực hiện và hoàn thành luận án, tác giả đã nhận được rất nhiều sự hỗ trợ, động viên, quan tâm và giúp đỡ từ các tổ chức, cơ quan, bạn bè, đồng nghiệp và gia đình. Tác giả xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến các cá nhân và đơn vị đã đồng hành cùng tác giả trong hành trình nghiên cứu và học tập đầy ý nghĩa này.

Trước tiên, tác giả xin gửi lời cảm ơn đến Ban Giám hiệu Trường Đại học Nông lâm - Đại học Thái Nguyên, Phòng Đào tạo nơi đã tạo điều kiện thuận lợi về môi trường học tập, cơ sở vật chất và các hỗ trợ cần thiết trong quá trình tác giả thực hiện luận án.

Tác giả xin gửi lời tri ân chân thành đến thầy cô, bạn bè, đồng nghiệp tại Viện Công nghệ Sinh học - Công nghệ Thực phẩm, Khoa Quản lý Tài nguyên, Khoa Công nghệ Nông nghiệp, Trường Đại học Nông lâm, Đại học Thái Nguyên. Sự giúp đỡ nhiệt tình và những lời động viên chân thành từ Quý thầy cô và đồng nghiệp đã tiếp thêm sức mạnh tạo động lực cho tác giả hoàn thành nhiệm vụ.

Đặc biệt, tác giả xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến các cán bộ, công chức Vụ Khoa học kỹ thuật và Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ, vì những đóng góp thiết thực, những ý kiến chuyên môn sâu sắc cùng sự hỗ trợ tận tình và hiệu quả đã đóng vai trò quan trọng trong việc định hướng và triển khai thành công nghiên cứu này.

Trân trọng gửi lời biết ơn đến hai thầy giáo hướng dẫn khoa học TS. Trần Văn Chí và TS. Nguyễn Thanh Hải những người đã dành thời gian, tâm huyết, luôn tận tình chỉ bảo, khích lệ và định hướng quan trọng cho tác giả trong quá trình thực hiện nghiên cứu.

Cuối cùng, tác giả xin gửi lời cảm ơn chân thành đến gia đình, bạn bè và đồng nghiệp, những người đã luôn đồng hành, động viên và sẻ chia mọi khó khăn trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận án. Đặc biệt, tác giả vô cùng trân trọng sự hy sinh và tình yêu thương của gia đình, những người thân đã không chỉ động viên tinh thần mà còn dành thời gian quý báu, tạo điều kiện tốt nhất để tác giả có thể tập trung hoàn thành mục tiêu quan trọng này. *Xin chân thành cảm ơn./.*

Thái Nguyên, ngày 12 tháng 09 năm

2025

Tác giả luận án



Hoàng Thị Lan Anh

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC VIẾT TẮT	vii
DANH MỤC BẢNG	viii
DANH MỤC HÌNH	x
THESIS ABSTRACT	xv
MỞ ĐẦU	1
1. Tính cấp thiết	1
2. Mục tiêu nghiên cứu	3
3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn	3
4. Những đóng góp mới của luận án	4
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	5
1.1. Vai trò của vi sinh vật trong hệ sinh thái nông nghiệp	5
1.1.1. Vi sinh vật và sự phân hủy chất hữu cơ.....	5
1.1.2. Vi sinh vật kích thích sinh trưởng cây trồng (PGPB).....	5
1.1.3. Vi sinh vật và sự kiểm soát sinh học đối với sâu bệnh.....	6
1.1.4. Vi sinh vật và cải thiện sức khỏe đất.....	7
1.1.5. Vi sinh vật và sự bền vững nông nghiệp.....	7
1.2. Tổng quan về vi sinh vật kích thích sinh trưởng	7
1.2.1. Khái niệm vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật.....	7

1.2.2. Đặc điểm của vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật.....	8
1.3. Vi sinh vật cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA	15
1.3.1. Vi sinh vật có khả năng cố định nitơ.....	15
1.3.2. Vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp IAA.....	23
1.3.3. Vi sinh vật đồng thời có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA.....	24
1.3.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA.	24
1.3.5. Ứng dụng phân tích di truyền trong tuyển chọn vi sinh vật.....	26
1.4. Tổng quan về phân hữu cơ vi sinh	31
1.5. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước về vi sinh vật đồng thời cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA ứng dụng trong sản xuất phân hữu cơ vi sinh	34
1.5.1. Các nghiên cứu trên thế giới.....	34
1.5.2. Các nghiên cứu tại Việt Nam.....	38
1.6. Thực trạng phát triển cây trồng ngô, lúa và ứng dụng công nghệ sinh học trong sản xuất nông nghiệp tại tỉnh Thái Nguyên	45
1.7. Nhận xét rút ra từ nghiên cứu tổng quan	49
Chương 2: NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	52
2.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu	52
2.2. Nội dung nghiên cứu	52
2.2.1. Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA.....	52
2.2.2. Nghiên cứu đặc điểm sinh học của một số chủng tuyển chọn.	53
2.2.3. Sản xuất phân hữu cơ vi sinh từ một số chủng vi sinh vật tuyển chọn.....	53

2.2.4. 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).....	53
2.3. Phương pháp nghiên cứu	55
2.3.1. Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật có khả năng cố định Nitơ và sinh tổng hợp IAA.....	55
2.3.2. Đánh giá đặc điểm sinh học của một số chủng tuyển chọn.....	60
2.3.3. Sản xuất phân hữu cơ vi sinh từ một số chủng vi sinh vật tuyển chọn.....	64
2.3.4. 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).....	80
2.3.5. Phương pháp xử lý số liệu.....	82
Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	83
3.1. Kết quả phân lập và tuyển chọn một số chủng vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA	83
3.1.1. Kết quả phân lập một số chủng vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA.....	83
3.1.2. Sàng lọc một số chủng tiềm năng về hoạt cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA.....	85
3.1.3. Đặc điểm hình thái một số chủng vi sinh vật đã qua sàng lọc..	88
3.1.4. Định danh một số chủng vi sinh vật dựa trên giải trình tự gen 16SrRNA.....	89
3.1.5. Nghiên cứu khả năng tương tác giữa một số chủng đã sàng lọc..	92
3.2. Kết quả nghiên cứu đặc điểm sinh học của một số chủng tuyển chọn	94

3.2.1. Đánh giá đặc điểm sinh lý của một số chủng vi sinh vật đã được tuyển chọn.....	94
3.2.2. Tối ưu điều kiện (thời gian, nhiệt độ, pH) nuôi một số chủng tuyển chọn.....	98
3.2.3. Đánh giá đặc điểm sinh hóa của một số chủng vi sinh vật đã được tuyển chọn.....	100
3.2.4. Đánh giá đặc điểm di truyền của một số chủng tuyển chọn..	105
3.2.5. Phân loại và đánh giá an toàn sinh học của 2 chủng vi sinh vật tuyển chọn.....	112
3.3. Sản xuất phân hữu cơ vi sinh từ một số chủng tuyển chọn	114
3.3.1. Sản xuất chế phẩm vi sinh.....	114
3.3.2. Sản xuất phân hữu cơ vi sinh.....	115
3.3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của liều lượng sử dụng phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa và cây ngô.....	117
3.4. 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)	122
3.4.1. Đánh giá năng suất mô hình sử dụng phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa và ngô.....	122
3.4.2. Đánh giá hiệu quả kinh tế mô hình sử dụng phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa và ngô.....	127
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	136
CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	138
TÀI LIỆU THAM KHẢO	139

DANH MỤC VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Nghĩa tiếng Việt
ABA (abscisic acid)	Chất điều hòa sinh trưởng thực vật
BNN&PTNT	Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn
BVTV	Bảo vệ thực vật
BYT	Bộ Y tế
CFU	Đơn vị ước tính số lượng vi khuẩn
ĐC	Đối chứng
DNA (deoxyribonucleic acid)	Là một phân tử mang thông tin di truyền
GDP (Gross Domestic Product)	Tổng sản phẩm Quốc nội
HCVS	Hữu cơ vi sinh
IAA (indole-3-acetic acid)	IAA là một hormone thực vật (auxin) có khả năng kích thích sinh trưởng
IBA (Indole - 3 - butyric acid)	Hormone thực vật thuộc nhóm auxin
KHCN (KH&CN)	Khoa học và Công nghệ
N ₂	Nitơ
NPK	N (Nitơ), P (Photpho), và K (Kali)
NQ/TW	Nghị quyết trung ương
NQ-HĐND	Nghị quyết Hội đồng nhân dân
NSLT	Năng suất lý thuyết
NSTT	Năng suất thực thu (năng suất thực tế)
NVQG	Nhiệm vụ quốc gia
P	Phốt pho
<i>PCR (Polymerase Chain Reaction)</i>	Kỹ thuật được sử dụng để khuếch đại phân tử DNA hoặc đoạn phân tử RNA ngoài cơ thể sống
PGPB	Vi sinh vật thúc đẩy sinh trưởng thực vật
PGPR	Vi sinh vật vùng rễ
QCVN	Quy chuẩn Việt Nam
QĐ	Quyết định
Rs	Rupee, đơn vị tiền tệ của Ấn Độ
Si	Silic
TCVN	Tiêu chuẩn Việt Nam
TTMTTNMN	Trung tâm Môi trường Tài nguyên Miền núi
USD	United States dollar: "đô la" hay "đô" là đơn vị tiền tệ chính thức của Hoa Kỳ

Chữ viết tắt	Nghĩa tiếng Việt
Zn	Z Kẽm

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Một số chủng vi sinh vật phổ biến được sử dụng sản xuất phân hữu cơ vi sinh thương mại ở Châu Á và Việt Nam	34
Bảng 2.1. Thành phần phản ứng PCR	63
Bảng 2.2. Lượng phân bón trên các công thức	75
Bảng 2.3. Lượng phân bón trên các công thức	78
Bảng 2.4. Sơ bộ đánh giá hiệu quả của mô hình	82
Bảng 3.1. Kết quả phân lập một số chủng có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA	83
Bảng 3.2. Kết quả khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA của một số chủng vi sinh vật phân lập được	85
Bảng 3.3. Mô tả hình thái tế bào, hình thái khuẩn lạc và tính chất nhuộm Gram của một số chủng đã được sàng lọc	88
Bảng 3.4. So sánh sự tương đồng về trình tự gen 16SrRNA của 6 chủng vi sinh vật đã lựa chọn với các loài gần nhất công bố trên dữ liệu Eztaxon	89
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến 2 chủng vi sinh vật tuyển chọn	95
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của pH môi trường đến sinh trưởng của 2 chủng tuyển chọn	97
Bảng 3.7. Kết quả phân tích phương sai ANOVA của mô hình nuôi cấy	98
Bảng 3.8. Khả năng sinh enzyme của 2 chủng vi sinh vật được tuyển chọn	101
Bảng 3.9. Một số đặc điểm hóa sinh của 2 chủng vi sinh vật tuyển chọn	103

Bảng 3.10. Kết quả lắp ráp de novo đặc điểm genome của một số chủng tuyển chọn	106
Bảng 3.11. Số lượng gen tham gia cố định nitơ, tổng hợp IAA của NL1 và NL3	109
Bảng 3.12. Kết quả lai genome của một số chủng NL1 và <i>Azotobacter</i> sp. NL3 với các loài gần nhất thông qua Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) v3.0	112
Bảng 3.13. Chất lượng chế phẩm vi sinh từ quy trình MREC-QTCN-2022-02	115
Bảng 3.14. Chất lượng phân hữu cơ vi sinh 3 mẻ sản xuất	116
Bảng 3.15. Ảnh hưởng của liều lượng phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa vụ xuân	117
Bảng 3.16. Ảnh hưởng của liều lượng phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa vụ mùa	118
Bảng 3.17. Ảnh hưởng của liều lượng phân hữu cơ vi sinh trên cây ngô vụ xuân	120
Bảng 3.18. Ảnh hưởng của liều lượng phân HCVS trên cây ngô vụ mùa	121
Bảng 3.19. Năng suất mô hình sử dụng phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa	122
Bảng 3.20. Năng suất mô hình sử dụng phân hữu cơ vi sinh trên cây ngô	126
Bảng 3.21. Kết quả đánh giá hiệu quả kinh tế mô hình sử dụng phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa	130
Bảng 3.22. Kết quả đánh giá hiệu quả kinh tế mô hình sử dụng phân hữu cơ vi sinh trên cây ngô	134

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Đặc điểm của vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật	9
Hình 1.2. Con đường sinh tổng hợp IAA (Zhang, 2023)	12
Hình 1.3. Sơ đồ phạm vi, ranh giới tỉnh Thái Nguyên	46
Hình 2.1. Sơ đồ khái quát quy trình nghiên cứu của luận án	54
Hình 2.2. Đồ thị chuẩn IAA	57
Hình 2.3. Đồ thị chuẩn NH_4^+	57
Hình 2.4. Cách cấy vạch trên đĩa thạch	60
Hình 2.5. Sơ đồ quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh quy mô 50 kg/mẻ	65
Hình 2.6. Sơ đồ quy trình sản xuất phân hữu cơ vi sinh chứa vi sinh vật cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA quy mô 400 kg/mẻ	70
Hình 2.7. Địa điểm và sơ đồ triển khai mô hình trồng lúa	74
Hình 2.8. Địa điểm và sơ đồ triển khai mô hình trồng ngô	77
Hình 3.1. Sơ đồ kết quả phân lập một số chủng có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA	84
Hình 3.2. Sơ đồ cây định danh của 6 chủng vi sinh vật tuyển chọn	92
Hình 3.3. Khả năng tương tác giữa một số chủng đã sàng lọc	93
Hình 3.4 A. Đường cong sinh trưởng của chủng NL1	94
Hình 3.4 B. Đường cong sinh trưởng của chủng NL3	94
Hình 3.5. Bề mặt đáp ứng mật độ tế bào chủng NL1	99
Hình 3.6. Bề mặt đáp ứng mật độ tế bào chủng NL3	100
Hình 3.7 A. Bản đồ genome của chủng <i>Azospirillum</i> sp. NL1	108
Hình 3.7 B. Bản đồ genome của chủng <i>Azotobacter</i> sp. NL3	108
Hình 3.8A. Dữ liệu loài chuẩn <i>Azospirillum lipoferum</i> công bố trên ATCC (Mỹ)	113

Hình 3.9B. Dữ liệu loài chuẩn <i>Azotobacter vinelandii</i> công bố trên ATCC (Mỹ)	114
Hình 3.9. Năng suất lúa sử dụng phân bón AZO-NL	123
Hình 3.10. Năng suất ngô sử dụng phân bón AZO-NL	126

TRÍCH YẾU LUẬN ÁN

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 lúa 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 nitơ 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 ($\geq 20 \mu\text{g/ml}$); khả năng sinh tổng hợp IAA ($\geq 50 \mu\text{g/ml}$); 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.

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 ($\geq 20 \mu\text{g/ml}$) and IAA biosynthesis capacity ($\geq 50 \mu\text{g/ml}$), 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.

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết

Nông nghiệp luôn giữ vai trò then chốt trong an ninh lương thực, là nguồn cung cấp lương thực, thực phẩm thiết yếu, đóng góp lớn vào xuất khẩu và tạo việc làm cho phần lớn dân số nông thôn Việt Nam. Tuy nhiên, tình trạng lạm dụng phân bón hóa học với lượng trung bình trên 10 triệu tấn phân bón/năm, cao gấp ba lần mức toàn cầu, trong đó phân vô cơ chiếm 75% tổng lượng sử dụng đã dẫn đến hiện tượng suy thoái đất, ô nhiễm môi trường và tiềm ẩn rủi ro sức khỏe cộng đồng (Vũ Văn Thức, 2024).

Trước thực trạng đó, phân hữu cơ vi sinh (HCVS) được xem là giải pháp chiến lược nhằm khôi phục độ phì nhiêu của đất, nâng cao hiệu quả sử dụng dinh dưỡng và hạn chế sử dụng phân bón hóa học (Lukas Schütz và cs.,2017). Nhận thức được tầm quan trọng của việc chuyển đổi mô hình nông nghiệp theo hướng bền vững, Đảng và Nhà nước đã ban hành nhiều chính sách nhằm thúc đẩy sản xuất và sử dụng phân bón hữu cơ như Quyết định số 885/QĐ-TTg ngày 23/6/2020 của Thủ tướng Chính phủ, theo đó tăng tỷ lệ sản phẩm phân bón hữu cơ trong tổng sản phẩm phân bón lên 15% năm 2025; Quyết định 5190/QĐ-BNN-BVTV ngày 07/12/2023 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (nay là Bộ Nông nghiệp và Môi trường) với mục tiêu đến 2030 sản xuất phân bón hữu cơ của các cơ sở sản xuất đủ điều kiện lên 5 triệu tấn/năm, sử dụng phân bón hữu cơ chiếm tối thiểu 30% so với tổng lượng phân bón sử dụng trong sản xuất nông nghiệp. Định hướng đến năm 2050, Việt Nam phấn đấu trở thành quốc gia tỷ lệ sử dụng phân bón hữu cơ đạt 50% diện tích canh tác. Trong lộ trình đó, cơ quan quản lý nhà nước giữ vai trò chỉ đạo và định hướng chiến lược; doanh nghiệp đóng vai trò trung tâm trong việc triển khai và đổi mới công nghệ; người nông dân là chủ thể then chốt, trực tiếp thực hiện và hưởng lợi từ quá trình chuyển đổi. Nghị

quyết số 36-NQ/TW ngày 30/01/2023 của Bộ Chính trị về phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học đến năm 2030 tầm nhìn đến năm 2045, đã khẳng định rõ quan điểm của Đảng và Nhà nước trong việc đẩy mạnh ứng dụng công nghệ sinh học vào sản xuất nông nghiệp, nhằm nâng cao năng suất, chất lượng và phát triển theo hướng bền vững. Trong bối cảnh đó, việc ứng dụng vi sinh vật cố định nitơ giải pháp sinh học hiệu quả cho nền nông nghiệp hiện đại đang được quan tâm nghiên cứu và triển khai thực tiễn như một hướng đi đầy triển vọng. Nghiên cứu về vi sinh vật cố định nitơ đã được phát hiện từ năm 1901 bởi Beijerinck được xem là một trong những phát minh quan trọng của thế kỷ 20 trong nông nghiệp (Wagner, 2011). Vi sinh vật cố định nitơ không chỉ có khả năng chuyển hóa nitơ từ khí quyển thành dạng dễ hấp thu, cung cấp nguồn đạm tự nhiên cho cây trồng, mà còn thể hiện nhiều chức năng sinh học có lợi khác. Theo Phạm Thị Thủy và Ngô Thanh Phong (2018), chế phẩm sinh học sản xuất từ dòng vi sinh vật cố định đạm *Burkholderia Vietnamiensis* BV3 sau ba tháng bảo quản vẫn duy trì hiệu quả, có thể thay thế 50% lượng đạm hóa học. *Azospirillum* và *Azotobacter* là các vi sinh vật sống hội sinh và tự do trong vùng rễ cây trồng có khả năng cố định nitơ và tổng hợp kích thích sinh trưởng thực vật (Orr và cs., 2011, Phạm Văn Toàn, 2017). Theo Trần Văn Chí và cs. (2024), việc ứng dụng các vi sinh vật cố định nitơ, tổng hợp IAA có hoạt lực cao đã góp phần nâng cao năng suất cây trồng cho địa phương. Phạm Văn Toàn (2017), cho biết sử dụng phân HCVS đa chủng, chức năng có khả năng gia tăng sinh khối và năng suất cây trồng ngay cả khi giảm 10 - 30% lượng dinh dưỡng khoáng N, P. Nguyễn Thị Thu Hằng và Nguyễn Thị Thủy (2015) đã phân lập thành công một số chủng *Azotobacter* phục vụ sản xuất phân HCVS cho cây ngô và xác định mật độ tối ưu khi bón khoảng 5×10^6 CFU/g. Zhang và cs. (2023) nhấn mạnh vai trò của các vi sinh vật hữu ích trong việc cải thiện sức khỏe đất và tăng sức đề kháng của cây trồng. Tại Ấn Độ, Pawar và Suryawanshi (2022) khẳng định, sử dụng

phân bón sinh học từ vi sinh vật có thể thay thế phân bón hóa học để giúp tăng sản lượng cây lúa. Với cây ngô, Patel và cs. (2022) ghi nhận mức tăng năng suất ngô tới 18%. Tại Việt Nam, hiệu quả của phân bón HCVS cũng được nhiều nhà khoa học xác nhận, trong đó Ngô Thanh Phong và cs. (2011); Văn Thị Phương Như và Cao Ngọc Điệp (2014) đã chứng minh sử dụng phân hữu cơ vi sinh có thể thay thế 50 - 75% lượng phân đạm trong canh tác giống lúa, giúp cải thiện chất lượng hạt và đất trồng lúa.

Nằm ở khu vực Đông Bắc Việt Nam, tỉnh Thái Nguyên sở hữu điều kiện khí hậu và thổ nhưỡng đa dạng, thuận lợi cho sản xuất nông nghiệp. Trong đó lúa và ngô là hai cây trồng chính, cây lương thực chủ lực được Tỉnh chú trọng phát triển theo hướng nâng cao chất lượng, năng suất và giá trị theo Quyết định số 4130/QĐ – UBND ngày 27/12/2021.

Với mục đích giảm thiểu sự phụ thuộc vào phân bón hóa học và các tác động tiêu cực từ lạm dụng phân bón hóa học đến môi trường, góp phần phát triển nền nông nghiệp sạch, an toàn, bền vững. Việc lựa chọn đề tài luận án với tiêu đề ***“Nghiên cứu vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và tổng hợp IAA cho một số cây trồng tại Thái Nguyên”*** có ý nghĩa khoa học và thực tiễn. Luận án là một phần trong kết quả nghiên cứu của nhiệm vụ khoa học và công nghệ quỹ gen cấp quốc gia ***“Khai thác phát triển nguồn gen vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp indole-3-acetic acid (IAA) ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp”***, mã số NVQG-2021/ĐT.04.

2. 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.

3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

3.1. Ý nghĩa khoa học

- Luận án là một công trình khoa học nghiên cứu đầy đủ về đặc điểm sinh học của một số chủng vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA. Từ đó sản xuất được phân hữu cơ vi sinh giúp tăng năng suất cây trồng tại Thái Nguyên.

- Là nguồn tài liệu khoa học tham khảo có giá trị trong nghiên cứu, giảng dạy và ứng dụng sản xuất phân bón hữu cơ vi sinh.

3.2. Ý nghĩa thực tiễn

- Phân lập và tuyển chọn được một số chủng vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA ứng dụng sản xuất phân bón hữu cơ vi sinh, góp phần tăng năng suất cây trồng, giảm thiểu sự phụ thuộc vào phân bón hóa học, mang lại hiệu quả kinh tế cho người làm nông nghiệp.

- Đây là bước tiến quan trọng trong việc phát triển các mô hình canh tác tiên tiến, đáp ứng xu hướng nông nghiệp xanh, sạch, an toàn, bền vững và bảo vệ sức khỏe cộng đồng, góp phần nâng cao chất lượng sản phẩm nông nghiệp của tỉnh Thái Nguyên.

4. Những đóng góp mới của luận án

- Phân lập, tuyển chọn, định danh được những chủng vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA cao thông qua đánh giá đặc điểm sinh học, giải trình tự gen 16SrRNA và giải trình tự toàn bộ hệ gen.

- Xác định được liều lượng sử dụng phân hữu cơ vi sinh chứa chủng *Azospirillum sp.*NL1 và *Azotobacter sp.*NL3 tốt nhất cho cây lúa và cây ngô tại Thái Nguyên với mức bón lần lượt là 1,5 tấn/ha đối với cây lúa, tăng năng suất 16,62% và 2,0 tấn/ha đối với cây ngô, tăng năng suất 15,67%

- Đánh giá được hiệu quả kinh tế mô hình sử dụng phân bón hữu cơ vi sinh trên cây lúa và cây ngô tại Thái Nguyên giúp tăng hiệu quả kinh tế so với mô hình đối chứng lần lượt là 10.062.000 đồng/ha (tương đương 35,7%) và 11.044.000 đồng/ha (tương đương 39,6 %).

- Mở ra hướng nghiên cứu và ứng dụng mới trong sản xuất nông nghiệp, giải quyết được bài toán tiết kiệm lượng nitơ sử dụng trong canh tác, đồng

thời chứng minh khả năng sản xuất chất kích thích sinh trưởng IAA từ vi sinh vật, giúp tăng hiệu quả sinh trưởng và năng suất cây trồng.

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Vai trò của vi sinh vật trong hệ sinh thái nông nghiệp

Vi sinh vật đóng vai trò vô cùng quan trọng không thể thiếu trong hệ sinh thái nông nghiệp. Từ việc góp phần vào quá trình phân hủy các chất hữu cơ, cải thiện sự phát triển của cây trồng, kiểm soát sâu bệnh, đến cải thiện nâng cao sức khỏe đất. Những nghiên cứu gần đây đã cho thấy: vi sinh vật có thể tăng cường khả năng chống chịu của cây trồng đối với các điều kiện môi trường khắc nghiệt. Sử dụng vi sinh vật một cách hiệu quả có thể giúp tăng cường năng suất nông nghiệp, bảo vệ môi trường và hỗ trợ sự phát triển bền vững của ngành nông nghiệp trong tương lai. Vai trò của vi sinh vật trong hệ sinh thái nông nghiệp được thể hiện ở các khía cạnh sau:

1.1.1. Vi sinh vật và sự phân hủy chất hữu cơ

Vi khuẩn, nấm và xạ khuẩn, tham gia vào quá trình phân hủy chất hữu cơ trong đất, biến đổi các chất này thành dinh dưỡng dễ tiêu cho cây trồng. Các vi sinh vật này hoạt động như những tác nhân phân giải chính, giúp cải thiện cấu trúc đất và tạo ra môi trường thuận lợi cho sự phát triển của cây trồng.

Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc áp dụng các chất hữu cơ như phân chuồng và phân xanh, cùng với sự hiện diện của vi sinh vật, có thể làm tăng hàm lượng dinh dưỡng trong đất. Theo Zhang (2020) đã chứng minh rằng, việc sử dụng phân hữu cơ kết hợp với vi sinh vật đã làm tăng đáng kể hàm lượng nitơ và phospho trong đất, đồng thời cải thiện cấu trúc đất và khả năng giữ nước.

1.1.2. Vi sinh vật kích thích sinh trưởng cây trồng (PGPB)

Vi sinh vật có vai trò trực tiếp hỗ trợ sự phát triển của cây trồng thông qua nhiều cơ chế khác nhau như: cố định nitơ, hòa tan phosphat và sản sinh

các chất kích thích tăng trưởng thực vật (*phytohormones*). Các vi sinh vật cố định nitơ như *Rhizobium*, có khả năng chuyển đổi nitơ khí quyển thành các hợp chất nitơ mà cây trồng có thể hấp thụ và sử dụng. Ngoài ra, vi sinh vật hòa tan phosphat như *Bacillus* và *Pseudomonas* có thể chuyển đổi các dạng phosphat không tan trong đất thành các dạng dễ hấp thụ hơn, giúp cây trồng tiếp cận nguồn dinh dưỡng một cách hiệu quả. Một nghiên cứu của Khan (2019) đã cho thấy, việc sử dụng các vi sinh vật hòa tan phosphat có thể làm tăng hàm lượng phosphat trong đất và cải thiện sự phát triển của cây trồng lúa mì.

1.1.3. Vi sinh vật và sự kiểm soát sinh học đối với sâu bệnh

Vi sinh vật cũng đóng vai trò quan trọng trong việc kiểm soát sinh học đối với sâu bệnh. Các vi sinh vật này có thể tấn công và tiêu diệt các loài sâu bệnh gây hại cho cây trồng, đồng thời làm giảm sự phụ thuộc vào các loại thuốc trừ sâu hóa học.

Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (Bt) là một ví dụ điển hình về vi sinh vật kiểm soát sinh học, có khả năng đối kháng với nhiều loại sâu bệnh hại nhiều loại cây trồng khác nhau (Chattopadhyay và cs., 2018). Nghiên cứu của (Đình Trường Sơn và cs., 2022) về bệnh héo vàng chuối do nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) gây ra là một trong những bệnh hại nghiêm trọng nhất đối với cây chuối, gây thiệt hại lớn về năng suất và chất lượng. Đặc biệt, chủng Foc TR4 có khả năng lây nhiễm trên phạm vi rộng, ảnh hưởng đến hầu hết các giống chuối hiện nay. Trong bối cảnh các biện pháp phòng trừ truyền thống chưa mang lại hiệu quả bền vững, giải pháp sinh học sử dụng vi sinh vật đối kháng đang được xem là hướng đi chiến lược. Nghiên cứu này tập trung phân lập và đánh giá hoạt tính đối kháng của chủng xạ khuẩn VNUA27 đối với nấm Foc TR4. Đồng thời, tiến hành khảo sát ảnh hưởng của dịch nuôi cấy xạ khuẩn VNUA27 đến sự phát triển của hệ sợi và quá trình nảy mầm của bào tử nấm gây bệnh. Từ 39 mẫu đất thu thập tại 2 địa điểm Núi Pháo, Đại Từ và Mỏ Sắt, Trại Cau thuộc tỉnh Thái Nguyên nhóm nghiên cứu

của (Đỗ Thị Hiền và., 2019) đã phân lập và tuyển chọn chủng xạ khuẩn sinh kháng sinh ức chế sinh trưởng vi khuẩn Gram dương. Bên cạnh đó, nấm *Trichoderma* cũng có khả năng đối kháng với nhiều loại nấm gây bệnh cây trồng như *Fusarium*, *Rhizoctonia* và *Pythium*. Các nghiên cứu của Harman (2004) đã chứng minh rằng, *Trichoderma* có thể cạnh tranh với các nấm gây bệnh về dinh dưỡng và không gian, đồng thời sản sinh các chất kháng sinh tự nhiên giúp ức chế sự phát triển của chúng.

1.1.4. Vi sinh vật và cải thiện sức khỏe đất

Đất đai được coi là một thực thể sống. Sức khỏe đất là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến năng suất nông nghiệp. Vi sinh vật đất góp phần cải thiện sức khỏe đất thông qua việc tăng cường cấu trúc đất, cải thiện khả năng giữ nước và cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng.

Các vi sinh vật như nấm rễ *Arbuscular mycorrhiza* (AMF) có khả năng tạo ra mạng lưới rễ phụ, giúp cây trồng tăng cường hấp thu nước và dinh dưỡng từ đất. Nghiên cứu của Wang (2021) đã chỉ ra rằng, việc sử dụng AMF trong canh tác đã giúp cải thiện sức khỏe đất và tăng năng suất cây ngô.

1.1.5. Vi sinh vật và sự bền vững nông nghiệp

Vi sinh vật không chỉ hỗ trợ sự phát triển của cây trồng mà còn góp phần vào sự bền vững của hệ sinh thái nông nghiệp. Việc sử dụng vi sinh vật trong nông nghiệp có thể giảm thiểu sự phụ thuộc vào phân bón hóa học và thuốc trừ sâu, từ đó giảm thiểu tác động tiêu cực đến môi trường. Nghiên cứu của Vessey (2022) đã cho thấy rằng, việc áp dụng các sản phẩm vi sinh vật trong nông nghiệp không chỉ giúp cải thiện năng suất cây trồng mà còn làm giảm lượng khí thải nhà kính và ô nhiễm môi trường.

1.2. Tổng quan về vi sinh vật kích thích sinh trưởng

1.2.1. Khái niệm vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật

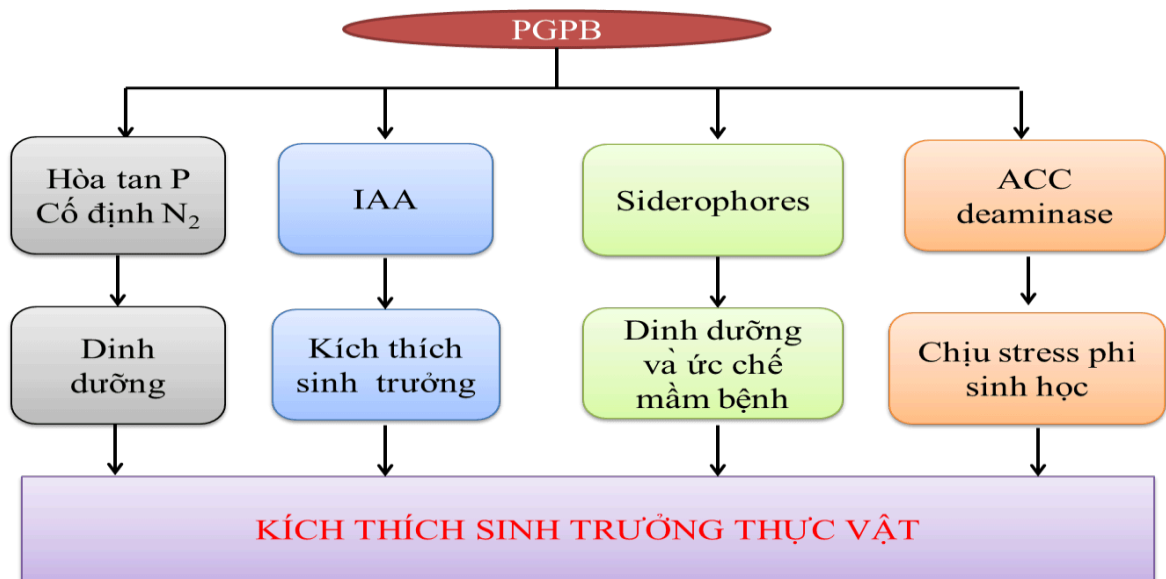
Vi sinh vật là nhóm sinh vật có kích thước rất nhỏ, thường chỉ có thể quan sát được dưới kính hiển vi, bao gồm các nhóm chính như vi khuẩn, vi nấm, vi tảo, động vật nguyên sinh và virus. Chúng tồn tại ở khắp mọi nơi trên

trái đất, từ các môi trường cực đoan như suối nước nóng, sa mạc khô cằn, đến các môi trường sống thông thường như đất, nước, không khí và bên trong cơ thể sinh vật khác (Phạm Văn Toàn, 2017). Mật độ, sự đa dạng về chủng loài vi sinh vật ở các loại đất có sự khác nhau. Chúng có thể phân bố tự do trong đất, vùng đất xung quanh rễ cây hoặc xâm nhập vào rễ (nội sinh). Vi sinh vật sống trong vùng rễ thường có mật độ lớn hơn các vùng khác có quan hệ mật thiết với cây trồng, sử dụng các chất tiết ra của rễ làm nguồn dinh dưỡng đồng thời tham gia vào các quá trình chuyển hóa vật chất trong rễ cây góp phần cung cấp hoặc nâng cao hiệu quả sử dụng dinh dưỡng của cây trồng. Các vi sinh vật cư trú trong vùng rễ cây trồng đã được khai thác và ứng dụng như một thành phần quan trọng trong phân bón vi sinh, nhờ vào vai trò tích cực trong việc thúc đẩy sự sinh trưởng và phát triển của thực vật. Những vi sinh vật này có khả năng hỗ trợ cây trồng thích nghi hiệu quả hơn với các điều kiện môi trường bất lợi thông qua cơ chế hòa tan phosphat khó tan, cố định nitơ trong khí quyển, và tổng hợp các chất điều hòa sinh trưởng như indole-3-acetic acid, gibberellin, cytokinin. Ngoài ra, chúng còn tạo ra các hợp chất thứ cấp có thể tăng cường sức chống chịu của cây trước tác động bất lợi của môi trường, chẳng hạn như ethylene (Nguyễn Quốc Khương và cs., 2021).

Tùy thuộc vào điều kiện của đất mà sự tương tác giữa vi sinh vật đất và cây có thể có lợi, có hại hoặc trung tính. Thậm chí khi thay đổi điều kiện đất thì tác dụng của vi sinh vật với cây trồng cũng thay đổi theo. Vi sinh vật sống tự do trong đất, có khả năng xâm nhập và định cư trong vùng rễ của cây trồng, có thể cải thiện sự sinh trưởng và năng suất của cây thông qua nhiều cơ chế sinh học khác nhau, bao gồm: cố định đạm, hòa tan phosphat, tổng hợp các hormone thực vật như auxin, gibberellin, cytokinin, tăng cường khả năng chống chịu stress sinh học và phi sinh học của cây trồng được gọi chung là vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật (PGPB) (Orozco và cs., 2021).

1.2.2. Đặc điểm của vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật

Vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật có nhiều đặc điểm giúp cải thiện sự phát triển của cây trồng một cách trực tiếp hoặc gián tiếp. Tác động gián tiếp thể hiện khi những vi sinh vật làm giảm hoặc ngăn chặn một số tác động có hại của mầm bệnh (thường là nấm). Tác động trực tiếp là do vi sinh vật tạo điều kiện thuận lợi cho cây trồng thu nhận các chất dinh dưỡng có sẵn trong môi trường như: sắt, nitơ và phosphate hòa tan. Nhóm vi sinh vật này còn có khả năng làm thay đổi nồng độ hormone, điều hòa quá trình tăng trưởng ở thực vật (cytokinin, auxin, và ethylene), nhờ đó cây trồng có thể hấp thu và sử dụng một cách có hiệu quả. Một số đặc điểm quan trọng của PGPB được trình bày ở Hình 1.1.



Hình 1.1. Đặc điểm của vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật

(Nguồn: Orozco và cs., 2021)

Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh rằng vi sinh vật có vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy sinh trưởng và phát triển cây trồng, góp phần giảm thiểu nhu cầu sử dụng phân bón hóa học, đồng thời nâng cao năng suất và chất lượng nông sản. Trong những năm gần đây, xu hướng ứng dụng nhóm vi khuẩn thúc đẩy sinh trưởng thực vật (PGPB) như một giải pháp thay thế

cho các hóa chất nông nghiệp truyền thống ngày càng được quan tâm. Việc này không chỉ giúp giảm sự lệ thuộc vào phân bón hóa học và thuốc bảo vệ thực vật, tiết kiệm chi phí sản xuất, mà còn mang lại lợi ích về môi trường. PGPB còn hỗ trợ tăng cường khả năng chống chịu của cây trồng trước các điều kiện bất lợi do tác động của biến đổi khí hậu, qua đó góp phần phát triển nền nông nghiệp theo hướng bền vững (Nguyễn Xuân Vũ, 2022).

1.2.2.1. Khả năng cố định nitơ

Tất cả sinh vật đều cần nitơ để tổng hợp các phân tử sinh học như protein và axit nucleic. Tuy nhiên, nguồn nitơ chính trong tự nhiên là nitơ khí quyển (N_2) thì hầu hết các sinh vật sống không sử dụng được. Cố định nitơ sinh học là quá trình khử N_2 thành amoniac (NH_3) thông qua các vi sinh vật cố định nitơ nhờ đó mà thực vật có thể hấp thụ được nguồn dinh dưỡng nitơ tự nhiên. Vi sinh vật cố định nitơ có thể ở trạng thái cộng sinh (như hình thành các nốt sần rễ cây đặc biệt là cây họ đậu) hoặc không cộng sinh (sống tự do trong đất). Các vi sinh vật cố định nitơ thực hiện quá trình cố định nitơ nhờ phức hệ enzyme nitrogenase với sự tham gia của ATP (Nachiket và cs., 2010). Vi sinh vật cố định nitơ thuộc nhiều chi khác nhau như: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter* và *Klebsiella* ...

Klebsiella oxytoca M5a1 là chủng vi khuẩn cố định nitơ đầu tiên mà tại đó các gen liên quan đến quá trình tổng hợp nitơ và hoạt động của enzyme nitrogenase đã được xác định và mô tả rõ ràng. Trong hệ gen của chủng này, có tổng cộng 20 gen *nif* được sắp xếp trong một vùng nhiễm sắc thể dài khoảng 24 kb, được tổ chức thành 8 operon khác nhau gồm: *nifJ*, *nifHDKTY*, *nifENX*, *nifUSVWZ*, *nifM*, *nifF*, *nifLA*, và *nifBQ*. Gen *nifD* và *nifK* chịu trách

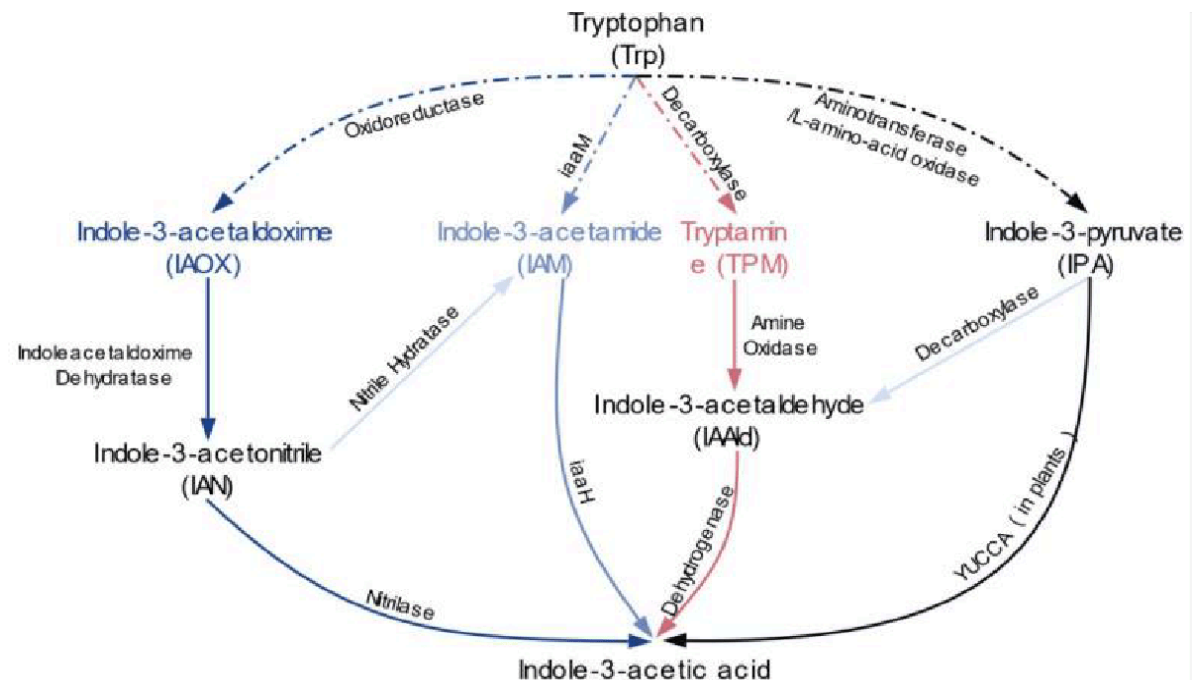
nhệm mã hóa cho FeMo-protein, còn gen *nifH* mã hóa cho Fe-protein, đều là những thành phần thiết yếu của phức hệ nitrogenase (Jesmi và cs., 2017).

Một số loài trong chi *Bacillus* có khả năng cố định nitơ như *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. aerophilus*, *B. flexus* và *B. oceanisediminis*. Cơ sở phân tử của quá trình cố định nitơ ở các loài *Bacillus* dị dưỡng này đã được chứng minh là nhờ vào sự có mặt của gen *NifH* (Jesmi và cs., 2017). Theo kết quả nghiên cứu của Văn Thị Phương Như và Cao Ngọc Diệp (2014) đã chứng minh rằng, sử dụng 02 chủng cố định nitơ phân lập từ rễ lúa (*Azospirillum amazonense* và *Burkholderia kururiensis*) có thể cung cấp 50% đạm sinh học cho nhu cầu sinh trưởng và phát triển của cây lúa, cải thiện chất lượng hạt và chất lượng đất trồng lúa ở thành phố Tuy Hòa, tỉnh Phú Yên. Kết quả phân tích gen cho thấy cả hai chủng này đều mang gen *NifH*.

1.2.2.2. Khả năng sinh tổng hợp IAA

Axit indole-3-acetic (IAA) là hormone kích thích sự phát triển ở thực vật, thuộc nhóm auxin, là nhóm có tác dụng sinh lý mạnh nhất. IAA ảnh hưởng đến sự phân chia, kéo dài và biệt hóa tế bào; kích thích sự nảy mầm của hạt và củ; tăng tỷ lệ phát triển xylem và rễ; kiểm soát các quá trình sinh trưởng sinh dưỡng; hình thành rễ bên; sự ra hoa; ảnh hưởng đến quá trình quang hợp, hình thành sắc tố, sinh tổng hợp các chất chuyển hóa khác nhau và chống lại các điều kiện bất lợi. IAA đóng vai trò như một chất điều hòa sinh trưởng, có khả năng kích thích quá trình kéo dài tế bào thông qua việc điều chỉnh một số yếu tố sinh lý như tăng tính thấm của màng tế bào, thúc đẩy hấp thu nước, làm giảm áp lực thành tế bào và thúc đẩy quá trình tổng hợp cấu trúc thành tế bào. IAA còn ngăn chặn và trì hoãn hiện tượng sinh lý của lá, thúc đẩy sự ra hoa, tạo quả (Zhao, 2010).

Kết quả phân tích ở các loài vi sinh vật khác nhau cho thấy sự tương đồng giữa con đường sinh tổng hợp IAA ở vi sinh vật và thực vật. IAA thường được tổng hợp theo hai con đường là phụ thuộc tryptophan và không phụ thuộc tryptophan. Ở vi sinh vật con đường tổng hợp IAA không phụ thuộc tryptophan còn chưa rõ ràng. Con đường tổng hợp IAA phụ thuộc tryptophan có 4 con đường được phân loại dựa trên hợp chất trung gian trong quá trình chuyển hóa bao gồm indole-3-pyruvate (IPA), tryptamine (TPM), indole-3-acetonitrile (IAN) và indole-3-acetamide (IAM) (Hình 1.2)



Hình 1.2. Con đường sinh tổng hợp IAA (Zhang, 2023)

1.2.2.3. Khả năng hòa tan phosphate

Phospho (P) là một trong những nguyên tố thiết yếu cho quá trình sinh trưởng và phát triển của cây trồng, chiếm khoảng 0,2% khối lượng khô của cây. Photpho được xếp vị trí thứ hai (sau nitơ) trong số các chất dinh dưỡng phổ biến, có ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của cây trồng. Thông thường, P bị cố định dưới các dạng khó hòa tan khác nhau trong đất, dẫn đến hàm lượng lân mà cây trồng hấp thu được là rất thấp (Mardamootoo và cs., 2021). Cây trồng chỉ có thể hấp thu phospho ở dạng muối hòa tan. Trong đất nguyên tố

này tồn tại chủ yếu ở dạng muối phosphate không tan của sắt, nhôm và canxi. Hàm lượng phospho trung bình trong đất chiếm 0,05%, tuy nhiên chỉ có khoảng 0,1% lượng này là cây trồng có khả năng sử dụng được. Trong quá trình canh tác, khoảng 70-90% lượng phospho ở dạng phosphate được giữ lại thông qua liên kết với Ca^{2+} để tạo thành canxi phosphate trong đá vôi, trong đất hoặc với Al^{3+} , Fe^{3+} để tạo thành nhôm phosphate (AlPO_4), sắt phosphate (FePO_4) không tan trong đất chua (Sharma và cs., 2013).

Một số vi sinh vật có khả năng hòa tan và khoáng hóa phosphate khó tan để cung cấp cho quá trình sinh trưởng và phát triển ở cây trồng. Trong môi trường tự nhiên, nhiều vi sinh vật trong đất và rễ có hiệu quả trong việc giải phóng phosphate từ phosphate không tan trong đất thông qua quá trình hòa tan và khoáng hóa (Satyaprakash và cs., 2017). Các vi sinh vật này làm tăng tính khả dụng sinh học của phosphate không tan để thực vật sử dụng. Nhóm vi sinh vật này được gọi là vi sinh vật hòa tan phosphate chủ yếu gồm vi sinh vật, nấm, xạ khuẩn và tảo. Theo Văn Thị Phương Như và Cao Ngọc Điệp (2014) cho biết, hai chủng vi khuẩn *P. putida* TAL01 và *B. subtilis* TAL04 hòa tan phosphate khó tan đã cung cấp 50% lân hữu dụng cho cây lúa. Trên đất cây trồng cạn, khả năng hòa tan lân từ lân can xi của vi khuẩn nội sinh phân lập từ cây ngô là 51,3 mg/l và từ rễ cây mía là 73,9-86,4 mg/l (Nguyễn Quốc Khương và cs., 2020). Kết quả giải trình tự toàn bộ hệ gen của chủng *S. tamaricis* DM10 và *M. pelagius* C7 đã xác định được các gen liên quan đến khả năng kích thích sinh trưởng (khả năng phân giải phosphate, tổng hợp ACC deaminase và sinh siderophores), khả năng chịu mặn và khả năng nội sinh (Vũ Văn Dũng, 2023).

Sử dụng vi khuẩn hòa tan phosphate để phục hồi đất bạc màu và khôi phục năng suất của đất sản xuất nông nghiệp. Chủng *B. thuringiensis* có khả năng hòa tan phosphate cao làm tăng chiều dài của rễ lúa trong phòng thí nghiệm. Khi sử dụng kết hợp hai chủng *Azotobacter chroococcum* và *B.*

subtilis năng suất lúa mì được cải thiện đáng kể (Bhattacharyya và Jha., 2022).

1.2.2.4. Khả năng sinh ACC deaminase

Khả năng sản sinh enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCD) là một đặc tính quan trọng của các vi khuẩn thúc đẩy sinh trưởng thực vật (PGPB), góp phần hỗ trợ cây trồng phát triển và tăng khả năng thích nghi với các điều kiện stress phi sinh học như hạn hán hoặc nhiễm mặn. Ethylene - một hormone thực vật có vai trò ức chế sinh trưởng - thường được cây tiết ra khi phải đối mặt với các tác nhân bất lợi từ môi trường như nhiệt độ khắc nghiệt, khô hạn, nồng độ muối cao, kim loại nặng hoặc các chất ô nhiễm hữu cơ. Việc tăng nồng độ ethylene dưới tác động của stress sẽ làm giảm sự phát triển của thân và rễ cây.

Hiện tượng này được gọi là stress ethylene. Thực vật phản ứng với stress bằng cách sản xuất hợp chất axit 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic (ACC), tiền chất của ethylene. ACC được cây trồng tiết vào trong đất ở vị trí xung quanh vùng rễ và được hệ thống rễ hấp thụ lại một lần nữa trước khi chuyển thành 1 ethylene. Cơ chế để vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật làm giảm stress là làm giảm nồng độ ethylene thông qua việc thủy phân tiền chất là ACC bằng ACC deaminase. Vi sinh vật kích thích tăng trưởng thực vật chứa ACC deaminase có thể phân giải ACC thành amoniac và α -ketobutyrate, làm giảm hàm lượng ethylene bên trong cây. Chính vì vậy, một số chủng PGPB có chứa enzyme ACC deaminase được đánh giá là có tiềm năng trong việc giảm thiểu tác động tiêu cực của các yếu tố stress phi sinh học lên cây trồng. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, việc thực vật cộng sinh với các vi khuẩn này có thể nâng cao khả năng chống chịu trước nhiều dạng stress môi trường như nhiễm mặn, khô hạn, ngập úng và cả sự tấn công của mầm bệnh.

Gen *acdS* mã hóa ACC deaminase đã được phát hiện trong một số loài vi sinh vật và nấm. Gần đây, ACC deaminase đã được tìm thấy trong nhiều loại vi sinh vật gram âm, vi sinh vật gram dương đặc biệt là vi sinh vật nội sinh (Saikia và cs., 2018).

1.2.2.5. Khả năng sinh siderophores

Siderophores là các phân tử hữu cơ nhỏ được tạo ra bởi các vi sinh vật trong điều kiện hạn chế sắt, hỗ trợ tăng cường quá trình hấp thu sắt. Các vi sinh vật tạo ra một loạt các siderophores, hầu hết là catecholate (enterobactin), một số ít là carboxylate (rhizobactin) và hydroxamate (ferrioxamine) (Miethke và cs., 2007). Tuy nhiên, cũng có một số loại siderophores của vi sinh vật có chứa hỗn hợp các nhóm chức pyoverdine (Isabelle và cs., 2020). Một số loài vi sinh vật có khả năng kìm hãm hoặc tiêu diệt nấm bệnh bằng cách sử dụng các siderophores tự sinh.

Nghiên cứu của Rungin và cs. (2012) cũng chỉ ra rằng, khi cây lúa được xử lý bằng chủng xạ khuẩn nội sinh *Streptomyces* có khả năng sản sinh siderophores, sinh khối của rễ và chồi tăng đáng kể so với đối chứng, chủ yếu nhờ vào việc cải thiện khả năng hấp thu sắt (Fe).

1.3. Vi sinh vật cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA

1.3.1. Vi sinh vật có khả năng cố định nitơ

Vi sinh vật cố định nitơ đóng vai trò quan trọng trong chu trình nitơ tự nhiên, chuyển đổi nitơ khí quyển (N_2) thành các dạng hữu cơ có thể sử dụng được như amonium (NH_4^+). Các vi sinh vật này có thể sống tự do trong đất hoặc cộng sinh với thực vật. Vai trò của chúng rất quan trọng trong nông nghiệp và sinh thái học vì chúng giúp cung cấp nguồn nitơ cho cây trồng mà không cần sử dụng phân bón hóa học.

Vi sinh vật cố định nitơ được chia làm 3 nhóm: vi sinh vật cố định nitơ sống cộng sinh, vi sinh vật cố định nitơ sống tự do và vi sinh vật cố định nitơ tương tác với thực vật ký chủ. Tuy nhiên, ranh giới giữa ba nhóm vi sinh vật

cố định nitơ, đặc biệt là giữa nhóm sống tự do và nhóm có tương tác với thực vật, vẫn chưa được xác định một cách rõ ràng. Trong một số trường hợp, cùng một loài vi sinh vật có thể được phân loại vào nhiều nhóm khác nhau do đặc điểm sinh học đa dạng và khả năng thích nghi linh hoạt với môi trường sống.

Vi sinh vật cố định nitơ sống cộng sinh là những chủng vi sinh vật thiết lập mối quan hệ cộng sinh với thực vật ký chủ theo cơ chế hai bên cùng có lợi. Trong mối quan hệ này, vi sinh vật thực hiện trao đổi chất dinh dưỡng với cây trồng và gây ra những biến đổi cấu trúc mô tại vị trí cư trú, điển hình là sự hình thành nốt sần ở rễ các loài cây họ Đậu. Cộng sinh được xem là dạng tương tác chặt chẽ giữa vi sinh vật (được gọi là sinh vật cộng sinh) và thực vật. Phần lớn các vi sinh vật cố định nitơ cộng sinh là vi khuẩn Gram âm, có khả năng hình thành nốt sần ở rễ cây họ Đậu; bên cạnh đó, một số thuộc nhóm xạ khuẩn chi *Frankia* (Gram dương), có thể tạo nốt sần trên rễ cây thân gỗ, cây hai lá mầm và cây bụi. Trước đây, các vi khuẩn cộng sinh với cây họ Đậu được xếp chung trong chi *Rhizobium*, do đó thường được gọi chung là *Rhizobia* - các vi sinh vật nốt rễ. Tuy nhiên, theo phân loại hiện đại, nhóm vi sinh vật này được chia thành nhiều chi khác nhau, chủ yếu bao gồm *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (nay là *Ensifer*), *Mesorhizobium* và *Bradyrhizobium* (MacLean và cs., 2007).

Vi sinh vật cố định nitơ sống tự do (không cộng sinh) là những vi sinh vật tương tác thực vật cố định đạm nhưng không xâm nhập vào một loại cây chủ theo hướng cộng sinh chuyên biệt. Trong số này quan trọng nhất là các loài thuộc chi *Azobacter*, *Pseudomonas* và *Clostridium*. Vi sinh vật cố định đạm tương tác là những vi sinh vật tham gia vào quá trình trao đổi chất dinh dưỡng với thực vật nhưng không làm thay đổi cấu trúc rễ của thực vật.

Các vi sinh vật cố định nitơ tương tác bao gồm từ những vi sinh vật sống tự do trong vùng lân cận rễ cây thực vật đến các vi sinh vật sống nội sinh trong mô tế bào thực vật. Để quá trình cố định nitơ tương tác diễn ra, cần đáp ứng các điều kiện sau:

1. Thực vật ký chủ;
2. Vi sinh vật cố định nitơ;
3. Chất nền từ thực vật;
4. Môi trường thích hợp để enzyme nitrogenase hoạt động;
5. Quá trình chuyển nitơ đã được cố định từ vi sinh vật sang cây trồng.

Một số vi sinh vật điển hình tham gia quá trình cố định nitơ tương tác bao gồm: *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Gluconoacetobacter*, *Herbaspirillum* và *Klebsiella*.

Vi sinh vật cố định nitơ không chỉ có khả năng chuyển hóa nitơ từ khí quyển thành dạng dễ hấp thu, cung cấp nguồn đạm tự nhiên cho cây trồng, mà còn thể hiện nhiều chức năng sinh học có lợi khác. Chúng có thể thúc đẩy sinh trưởng thực vật thông qua việc tổng hợp các enzyme như ACC deaminase và các hormone sinh trưởng thực vật (phytohormone) như auxin, cytokinin và gibberellin. Ngoài ra, các vi sinh vật này còn góp phần bảo vệ cây trước sự tấn công của mầm bệnh thông qua cơ chế cạnh tranh dinh dưỡng và không gian sống, cũng như sản sinh các hợp chất kháng sinh, enzyme thủy phân hoặc kích hoạt hệ thống phòng vệ tự nhiên của cây ký chủ.

Với những lợi ích đa dạng, vi sinh vật cố định nitơ đang được xem là một trong những giải pháp sinh học hiệu quả cho nền nông nghiệp hiện đại. Ngày càng có nhiều nghiên cứu tập trung làm rõ vai trò và cơ chế hoạt động của nhóm vi sinh vật này, góp phần định hình các chiến lược canh tác bền vững trong sản xuất nông nghiệp.

*** Các nhóm vi sinh vật cố định nitơ**

a. Vi sinh vật cố định nitơ tự do hiếu khí

Nhóm này gồm hai chi chính là *Beijerinckia sp* và *Azotobacter sp*.

- *Beijerinckia sp*.

Được phân lập bởi Starkey năm 1939, *Beijerinckia sp* là loại có đặc điểm giống với *Azotobacter sp*. Tế bào có hình dạng thay đổi như hình cầu, hình

que, hình bầu dục. *Beijerincki* là vi sinh vật gram âm, không sinh bào tử. Có khả năng sống tốt trong môi trường axit (pH=3). Vi sinh vật có khả năng cố định được 16 - 20 mg N khi đồng hóa hết 1g dinh dưỡng carbon. Ngoài khả năng cố định N chúng còn có khả năng tổng hợp các chất kích thích sinh trưởng cho cây trồng.

- *Azotobacter sp.*

Là vi sinh vật gram âm, không sinh bào tử có khả năng cố định N tự do. Khi chưa trưởng thành tế bào thường có hình que, sinh sản bằng cách phân cắt, di chuyển nhờ tiêm mao. Khi trưởng thành mất khả năng di chuyển, kích thước thu nhỏ thành dạng cầu được bao bọc bởi một lớp nhầy.

Khuẩn lạc của *Azotobacter* có dạng cầu lồi, nhẵn bóng, có khi nhăn nheo. Các nòi phân lập từ tự nhiên có khả năng cố định 10 - 15mg N khi tiêu thụ hết 1g dinh dưỡng Carbon. Một số nòi tuyển chọn có khả năng cố định tới 30mg/1g dinh dưỡng carbon.

Trong đất, *Azotobacter* tập trung ở vùng đất xung quanh rễ cây. Ngoài khả năng cung cấp dinh dưỡng N cho cây nó còn có khả năng kích thích nảy mầm, kích thích sinh trưởng thường phổ biến các nòi sau:

+ *Azotobacter chroococcum*: kích thước tế bào 2,0 x 3,1 micromet, có khả năng di động khi còn non. Khi già hình thành nang xác. Khuẩn lạc có màu nâu hoặc đen khi về già, không khuếch tán ra môi trường.

+ *Azotobacter beijerinckii*: có kích thước 2,4 x 4,6 micromet. Không có khả năng di động và hình thành nang xác. Khuẩn lạc khi già có màu nâu sáng, sắc tố không khuếch tán ra môi trường nuôi cấy.

+ *Azotobacter vinelandii*: tế bào có kích thước 1,5 x 3,4 micromet, có khả năng di động và hình thành nang xác. Khuẩn lạc màu lục huỳnh quang, sắc tố khuếch tán vào môi trường.

+ *Azotobacter agilis*: tế bào có kích thước 2,8 x 3,3 micromet, có khả năng di động, không hình thành nang xác, khuẩn lạc màu vàng lục huỳnh quang, sắc tố khuếch tán vào môi trường.

b. Vi sinh vật cố định nitơ tự do kỵ khí Clostridium

Clostridium được phát hiện lần đầu tiên bởi Vinogradski (1893). Vi sinh vật *Clostridium* có kích thước 2,5 - 7,5 x 0,7 - 1,3 micromet, có thể đứng riêng rẽ hoặc kẹp đôi thành chuỗi ngắn. Bào tử hình bầu dục, có khả năng chịu được nhiệt độ cao và khô hạn. *Clostridium* có khả năng tích lũy được 10 - 15mg N phân tử khi đồng hóa hết 1g đường Carbon.

c. Các vi sinh vật sống cộng sinh với cây họ đậu

Vi sinh vật cố định nitơ cộng sinh với cây họ đậu còn gọi là vi sinh vật nốt sần. Chúng hình thành các nốt sần với rễ cây họ đậu như cây đậu tương, lạc, điền thanh, muồng, cốt khí, trinh nữ, ... chúng sử dụng dinh dưỡng carbon của cây và cố định N không khí để sử dụng và cung cấp một phần cho cây chủ, gồm:

- Rhizobium

Năm 1868, nhà khoa học Hà Lan M. W. Beijerinck đã phân lập được loài vi sinh vật sống cộng sinh trong nốt sần ở rễ một cây thuộc bộ đậu, ông đã đặt tên là *Basilusradicicola*.

Năm 1889, vi sinh vật này được xếp vào chi *Rhizobium* (B. Frank, 1989). Trên môi trường đặc, chúng có khuẩn lạc trơn bóng, nhầy, khi còn non có khả năng di động nhờ tiêm mao, khi tế bào già trở nên bất động.

Rhizobium thuộc loại hảo khí ưa pH trung tính hoặc kiềm (pH từ 6,5 - 7,5), nhiệt độ thích hợp 24 - 26°C. Chúng xâm nhiễm vào rễ cây họ đậu thông qua lông hút, đôi khi qua vết thương ở vỏ rễ. Dưới ảnh hưởng của vi sinh vật, rễ tiết ra enzyme polygalacturonase phân huỷ thành lông hút tạo điều kiện cho

vi sinh vật xâm nhập vào rễ. Theo tính toán của các nhà khoa học nhóm vi sinh vật này có khả năng cung cấp cho cây 80 -120kg N/ ha.

- *Bradyrhizobium*

Vi sinh vật hình que, kích thước trung bình 0,5 - 0,9 x 1,2 - 3,0 μm , thường chứa chất dự trữ PHB. Trên môi trường đặc, khuẩn lạc của chúng có dạng trơn, bóng, nhầy, không màu.

Bradyrhizobium là vi sinh vật hiếu khí, tuy nhiên chúng có thể phát triển được ngay trong trường hợp chỉ có một áp lực oxy rất thấp khoảng 0,001 atm. Chúng phát triển thích hợp ở pH= 6,5 - 7,5. Nhiệt độ phát triển thích hợp là 24 - 26°C, nhiệt độ 37°C sự phát triển của chúng bị cản trở một cách rõ rệt. Trong *Bradyrhizobia*, các gen 16S rRNA được biết là không có đủ sự đa dạng trình tự để nhận biết rõ ràng các loài khác nhau (Kaneko và cs. 2010). Các nghiên cứu của Martínez-Romero và cs. (2010) khi phân tích toàn bộ bộ gen của chi *Bradyrhizobium* sử dụng nhận dạng nucleotide trung bình (ANI) và sự phát sinh loài cho thấy chi này về cơ bản là đơn ngành với bảy nhóm lớn trong phân loài này bao gồm vi khuẩn nốt sần cố định đạm cũng như một số chủng sống tự do.

- *Azorhizobium*

Azorhizobium là một giống vi khuẩn mới được đề xuất thuộc họ *Rhizobiaceae* với đại diện duy nhất là *Azorhizobium caulinodans* (Dreyfus và cs., 1988). Vi khuẩn này có khả năng cố định đạm trong điều kiện cộng sinh với thực vật họ đậu, đặc biệt là *Sesbania rostrata*. Khác với các loài vi khuẩn cố định đạm thông thường như *Rhizobium* hay *Bradyrhizobium*, *A. caulinodans* không chỉ hình thành nốt sần ở rễ mà còn có thể tạo nốt sần trên thân cây chủ.

Nhờ khả năng cố định đạm mạnh mẽ, *Azorhizobium caulinodans* có tiềm năng ứng dụng trong các mô hình nông nghiệp bền vững, đặc biệt là ở các hệ

sinh thái đất ngập nước hoặc vùng canh tác lúa nước. Việc sử dụng *S. rostrata* như một cây phân xanh có thể giúp giảm nhu cầu sử dụng phân đạm hóa học, từ đó bảo vệ môi trường và giảm chi phí sản xuất (Elmerich và cs., 2000).

d. Các vi sinh vật cố định nitơ khác

- Azospirillum

Phát hiện năm 1974, là vi sinh vật Gram âm, sống tự do, đường kính 1µm, dài 2,1 - 3,8µm chuyển động trong môi trường lỏng bởi một tiêm mao dài ở đầu (polan flagellum), trong môi trường đặc ở 30°C nhiều tiêm mao bên (lateral flagellum) ngắn hơn cũng được thành lập. Vi khuẩn thuộc chi *Azospirillum* xâm chiếm rễ của các loại ngũ cốc và cỏ quan trọng, đồng thời thúc đẩy sự phát triển của cây trồng bằng một số cơ chế, nhất là quá trình tổng hợp phytohormone (Tatusov và cs., 2001; MacDonald và cs., 2010). Bên cạnh tiềm năng là phân bón sinh học, một số chủng cũng có thể có lợi cho sức khỏe cây trồng thông qua kiểm soát sinh học đối với thực vật ký sinh (Alneberg và cs., 2010) hoặc vi khuẩn gây bệnh (Frank và cs., 2016), hoặc bằng cách tạo ra khả năng kháng bệnh (Bashan và cs., 2003). Để có bằng chứng thuyết phục cho việc sử dụng *Azospirillum*, các nghiên cứu di truyền học chủ yếu tập trung vào các gen liên quan đến quá trình cố định đạm, tổng hợp auxin và các đặc tính liên quan đến sự sống sót trong vùng rễ (Tatusov và cs., 2001; MacDonald và cs., 2010; Steenhoudt và cs., 2000). Các nghiên cứu tiên phong đã chỉ ra rằng bộ gen của *Azospirillum* được cấu thành từ nhiều bản sao và kích thước của chúng khác nhau giữa các loài từ 4,8 Mbp đến 9,7 Mbp (Miché và cs., 2000; Bashan và cs., 2002).

Trong những năm gần đây người ta phát hiện nhiều nhóm vi sinh vật này sống ở trong vùng rễ, trong rễ cây, thân cây và lá các cây không thuộc họ đậu như lúa, ngô, mía và một số loại cỏ. *Azospirillum* tăng sinh ở cả trong điều

kiện hiếu khí và kỵ khí với sự hiện diện hoặc không có hợp chất nitơ trong môi trường, nhưng thích hợp là vi hiếu khí. Nhiệt độ tối ưu từ 30 - 37°C. Một số dòng *Azospirillum* là những vi sinh vật tự dưỡng không bắt buộc. Vi sinh vật *Azospirillum* phát triển tốt trên muối của những acid hữu cơ như malate, succinate, hay pyruvate. Fructose và những đường đôi khác cũng có thể được vi sinh vật sử dụng như là nguồn carbon. Một số dòng *Azospirillum* cần biotin cho sự phát triển của chúng.

Ngoài khả năng cố định nitơ chúng còn có khả năng khử nitrat, chống lại vi sinh vật gây bệnh thối lá ở cây dâu tằm. Theo Eckert (2001), chi *Azospirillum* có 7 loài là: *A. brasilense*; *A. lipoferum*; *A. amazonense*; *A. irakense*; *A. halopraeferens*; *A. largimobile* và *A. doebereineae*.

Một số báo cáo gần đây cho thấy vi sinh vật này có thể tiết ra những kích thích tố tăng trưởng như: IAA (Indole - 3 - acetic acid), IBA (Indole - 3 - butyric acid), ABA (abscisic acid) và cytokynins. Những kích thích tố đó làm tăng chiều dài rễ, tăng thể tích rễ và số lượng rễ. Từ đó, chúng làm tăng khả năng hấp thu khoáng chất và nước, tăng khả năng sinh trưởng và phát triển cũng như tăng năng suất của cây. Ngoài ra, chúng còn giúp cho cây chống chịu được điều kiện khô hạn.

- *Burkholderia*.

Vi sinh vật *Burkholderia* thuộc vi sinh vật gram âm, có hình dạng hình que, đường kính khoảng 1µm, chúng có thể di chuyển nhờ các chiên mao ở đầu.

Burkholderia sinh trưởng và phát triển trong điều kiện kỵ khí hoặc hiếu khí, nhưng trong môi trường ít khí oxy thì phát triển tốt nhất, chúng phát triển sâu trong môi trường nuôi cấy từ 1 - 4mm. Trong môi trường nuôi cấy chúng

tạo thành các khuẩn lạc màu trắng hoặc hơi vàng, đường kính khoảng 2 - 4mm, tròn, phẳng hoặc dài.

Vi khuẩn *Burkholderia Vietnamiensis* lần đầu tiên được phát hiện sống cộng sinh trong rễ cây lúa tại Việt Nam vào năm 1995 (Gillis và cs., 1995). Đến năm 2000, loài vi khuẩn này đã được xác định có khả năng cố định đạm sinh học, góp phần nâng cao năng suất cây lúa (Van và cs., 2000). Một số chủng *Burkholderia Vietnamiensis* phân lập từ vùng rễ lúa tại Kiên Giang thể hiện hoạt tính nitrogenase cao thông qua phản ứng khử acetylene, dao động trong khoảng từ 0,226 đến 0,238 mM (Ngô Thanh Phong và cs., 2010). Cũng theo nghiên cứu của Trần Nguyễn Diệu Hiền (2011), dòng vi khuẩn *Burkholderia Vietnamiensis* có khả năng cung cấp từ 25-75% nhu cầu đạm sinh học cho sự sinh trưởng và phát triển của giống lúa cao sản OM6976 trong điều kiện trồng chậu, và cung cấp khoảng 50% đạm sinh học cho giống lúa này khi canh tác trên đất phèn tại nông trường Sông Hậu, huyện Cờ Đỏ, thành phố Cần Thơ (Ngô Thanh Phong, 2012).

Chế phẩm sinh học sản xuất từ dòng vi sinh vật cố định đạm *Burkholderia Vietnamiensis* BV3 sau ba tháng bảo quản vẫn duy trì hiệu quả, có thể thay thế 50% lượng đạm hóa học, giúp đạt năng suất 7,71 tấn/ha trên đất chua phèn tại Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang. Việc sử dụng chế phẩm sinh học cho giống lúa OM6976 cho phép tiết kiệm đến 103,5 kg urê/ha mà vẫn duy trì các chỉ tiêu nông học quan trọng như năng suất lúa, khối lượng 1.000 hạt, chiều dài bông, tỷ lệ hạt chắc trên bông và chiều cao cây, tương đương với việc bón hoàn toàn bằng đạm hóa học (207 kg urê/ha) (Phạm Thị Thủy và Ngô Thanh Phong, 2018).

1.3.2. Vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp IAA

Indole-3-acetic acid (IAA) là một trong những hormone thực vật phổ biến nhất của lớp auxin, thúc đẩy sự tăng trưởng và phát triển của thực vật (Bunsangiam và cs., 2021). IAA cũng tăng cường sự hấp thu chất dinh dưỡng

bằng cách tạo ra rễ dài hơn và tăng số lượng lông hút ở rễ (Mohite, 2013). Chính vì vậy, các nguồn dưỡng chất thay thế có nguồn gốc sinh học có thể giảm thiểu việc sử dụng phân hóa học, mà vi sinh vật là một trong những nguồn tiềm năng. Vi khuẩn có nhiều tác động đến cây trồng trong việc hỗ trợ sinh trưởng hoặc đối kháng sinh học để phòng bệnh (Ke và cs., 2021). Vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp IAA đã thu hút sự quan tâm lớn trong nghiên cứu nông nghiệp và sinh học do tiềm năng ứng dụng trong cải thiện năng suất cây trồng và tăng cường khả năng chịu stress của thực vật (Müller và cs., 2021).

Hoàng Minh Tân và Nguyễn Quang Thạch (1993) cho biết, tác động của IAA phụ thuộc vào dạng tế bào, ở các nồng độ khác nhau tùy thuộc vào loại phân sinh mô, IAA kích thích đồng thời sự giãn dài trục lá mầm, ngăn cản sự sinh trưởng của rễ chính. IAA thường được dùng như một chất điều hòa quá trình sinh học, giúp kích thích kéo dài tế bào bằng cách thay đổi nhất định như tính thấm lọc, tăng tính thấm nước, giảm áp lực thành tế bào và tăng tổng hợp thành tế bào. IAA còn ngăn chặn và trì hoãn hiện tượng sinh lý của lá, thúc đẩy sự ra hoa, tạo quả (Trần Bảo Trâm và cs., 2017). Theo Nguyễn Minh Chơn (2004), trong thân IAA kích thích sự sinh trưởng trên mặt đáy của thân và làm cho thân nghiêng về phía trên. Khi cắt chóp rễ thì khả năng đáp ứng của rễ với trọng lực bị mất đi và khi đặt chóp rễ trở lại thì tính địa hướng động được phục hồi.

Một nghiên cứu của Myo và cs. (2019) cho thấy, sản lượng IAA tối đa đạt được trong điều kiện tối ưu là 82,363 $\mu\text{g/mL}$ khi có sự hiện diện của 2 g/L tryptophan sau 6 ngày ủ. Việc tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy đã giúp tăng gần 4 lần khả năng tiết IAA của tế bào NKZ-259. Kết quả nghiên cứu cho thấy *S. fradiae* NKZ-259 có tiềm năng lớn trong việc thúc đẩy sinh trưởng thực vật và sản xuất IAA.

Như vậy, cùng với nitơ các vi sinh vật đất cũng có khả năng sản sinh ra IAA - một loại hooc môn nhóm auxin, đóng vai trò quan trọng cho điều hòa sinh trưởng ở thực vật. IAA còn ngăn chặn và trì hoãn hiện tượng sinh lý của

lá, thúc đẩy sự ra hoa, tạo quả, có một số nhóm vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp IAA từ tiền chất L-tryptophan. Ở thực vật, IAA nội sinh được sản sinh thông qua phản ứng decarboxyl hóa và transamin từ tiền chất tryptophan và nồng độ IAA sản sinh ra phụ thuộc vào hàm lượng tryptophan bổ sung. Tuy nhiên, trong những điều kiện không thuận lợi, lượng IAA có nguồn gốc ngoại sinh (được sinh tổng hợp bởi các vi sinh vật vùng rễ) sẽ được sử dụng để cân bằng nội tiết cho cây, tạo điều kiện thuận lợi cho sự tăng trưởng thực vật.

1.3.3. Vi sinh vật đồng thời có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA

Có nhiều nghiên cứu đã chứng minh được rằng, một số chủng vi sinh vật có cả khả năng đồng thời cố định nitơ và khả năng sinh tổng hợp IAA, đây là nguồn vi sinh vật quan trọng đối với nền nông nghiệp hiện đại. Nhóm vi sinh vật nổi bật có thể kể đến là các vi sinh vật vùng rễ kích thích tăng trưởng thực vật như *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*,...

Một số chủng *Rhizobium* từ cây đậu xanh không chỉ cố định nitơ mà còn sinh tổng hợp IAA, góp phần tăng trưởng mạnh mẽ và năng suất cao hơn so với các cây không được xử lý. Theo Bhattacharyya và cs. (2022) cho biết, các loài vi sinh vật *Azospirillum* có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA đã giúp tăng cường sự phát triển của cây ngô trong điều kiện đất nghèo dinh dưỡng.

1.3.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA

Khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA của vi sinh vật là hai quá trình sinh học quan trọng có ảnh hưởng lớn đến sự phát triển và năng suất của cây trồng. Vi sinh vật cố định nitơ có thể biến đổi khí nitơ (N_2) trong không khí thành amonium (NH_4^+), một dạng nitơ dễ hấp thụ cho cây. Trong khi đó, IAA là một hormone thực vật quan trọng trong điều hòa sự phát triển và phân chia tế bào. Các yếu tố di truyền, tương tác với cây chủ, môi trường và chất

dinh dưỡng đều đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh các quá trình này.

1.3.4.1. Yếu tố di truyền

Yếu tố di truyền là một trong những yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến khả năng cố định nitơ. Các gen *nif* (*nitrogen fixation*) đóng vai trò chủ chốt trong quá trình này. Sự biểu hiện và hoạt động của các gen này có thể bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác nhau như loại vi sinh vật, môi trường sống và tương tác với cây chủ, các dòng vi sinh vật *Rhizobium* có sự khác biệt đáng kể về khả năng cố định nitơ do sự biến đổi trong các gen *nifH* và *nifD*.

Giống như khả năng cố định nitơ, sinh tổng hợp IAA cũng bị ảnh hưởng mạnh mẽ bởi yếu tố di truyền. Các gen *ipdC*, *iaaM* và *iaaH* là những gen quan trọng tham gia vào con đường sinh tổng hợp IAA. Nghiên cứu của Spaepen và Vanderleyden (2010) đã xác định rằng, sự biểu hiện của các gen này có thể được điều chỉnh bởi các yếu tố môi trường và tương tác với cây chủ.

1.3.4.2. Tương tác với cây chủ

Tương tác giữa vi sinh vật cố định nitơ và cây chủ là yếu tố quyết định cho hiệu quả cố định nitơ. Sự hình thành và phát triển của nốt sần rễ là một quá trình phức tạp, bao gồm các bước nhận diện và tương tác giữa vi sinh vật và cây chủ. Theo nghiên cứu của Oldroyd (2019), sự giao tiếp này bao gồm các tín hiệu hóa học như flavonoid từ cây và nod factors từ vi sinh vật.

Vi sinh vật sinh tổng hợp IAA thường tương tác với cây chủ để kích thích sự phát triển của cây. IAA có thể ảnh hưởng đến sự kéo dài và phân chia tế bào, từ đó thúc đẩy sự phát triển của rễ và chồi.

1.3.4.3. Yếu tố môi trường

Các yếu tố môi trường như pH, nhiệt độ, độ ẩm và lượng oxy cũng ảnh hưởng lớn đến khả năng cố định nitơ. pH thấp có thể ức chế hoạt động của enzyme nitrogenase, enzyme chính tham gia vào quá trình cố định nitơ. Ngoài

ra, nồng độ oxy cao cũng có thể gây ức chế cho quá trình này vì enzyme nitrogenase rất nhạy cảm với oxy.

Môi trường cũng đóng vai trò quan trọng trong sinh tổng hợp IAA. Nhiệt độ, pH, và ánh sáng là những yếu tố môi trường có thể ảnh hưởng đến quá trình này, nhiệt độ cao có thể tăng cường khả năng sinh tổng hợp IAA của vi sinh vật *Pseudomonas fluorescens*.

1.3.4.4. Chất dinh dưỡng

Sự hiện diện của các chất dinh dưỡng như photpho, kali, và sắt có thể ảnh hưởng đến khả năng cố định nitơ. Sắt là một yếu tố quan trọng vì nó là thành phần cấu tạo của enzyme nitrogenase, bổ sung sắt vào môi trường nuôi cấy vi sinh vật *Rhizobium* có thể tăng cường hiệu quả cố định nitơ.

Sự hiện diện của các chất dinh dưỡng như carbon, nitơ, và các vi chất dinh dưỡng khác có thể ảnh hưởng đến sinh tổng hợp IAA. Carbon, đặc biệt là glucose, được coi là nguồn năng lượng chính cho quá trình sinh tổng hợp này, bổ sung glucose vào môi trường nuôi cấy vi sinh vật đã làm tăng đáng kể mức độ IAA được sản xuất.

1.3.5. Ứng dụng phân tích di truyền trong tuyển chọn vi sinh vật

1.3.5.1. Kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction)

Kỹ thuật PCR được Kary Mullis đã phát minh vào năm 1985 khi làm việc với tư cách là một nhà hóa học tại Cetus Corporation, một công ty công nghệ sinh học ở Emeryville, California. PCR (Polymerase Chain Reaction) là kỹ thuật sinh học phân tử nhằm tạo ra hàng triệu hoặc hàng tỉ bản sao trình tự ADN cụ thể trong ống nghiệm. Phương pháp này sử dụng các đoạn ADN nhân tạo ngắn (gọi là mồi hay primer) nhằm đánh dấu một đoạn cần khuếch đại trên bộ gen. Sau đó, người ta thực hiện nhân đôi nhiều lần nhằm tạo ra bản sao đoạn trình tự đó với số lượng lớn.

Sử dụng để khuếch đại các đoạn DNA mục tiêu từ vi sinh vật, giúp xác định và phân loại một số chủng vi sinh vật dựa trên trình tự DNA của chúng.

Các primer đặc hiệu được thiết kế để khuếch đại các gene mục tiêu như 16S rRNA cho vi sinh vật hoặc ITS cho nấm.

1.3.5.2. Kỹ thuật giải trình tự DNA

Giải trình tự DNA cho phép xác định chính xác trình tự nucleotide của gene mục tiêu hoặc toàn bộ genome của vi sinh vật. Kỹ thuật này giúp phát hiện các đột biến và xác định mối quan hệ di truyền giữa một số chủng vi sinh vật.

- Tách chiết DNA tổng số một số chủng vi khuẩn tiềm năng: Nuôi cấy một số chủng vi khuẩn tuyển chọn có khả năng cố định nitơ phân tử và sinh tổng hợp IAA cao trên môi trường Ashby ở 30°C trong 24-72h, ly tâm thu cặn tế bào. Sử dụng cặn tế bào của một số chủng vi khuẩn tuyển chọn để tách chiết DNA bằng 2 phương pháp, so sánh hiệu quả từ đó lựa chọn phương pháp tách chiết DNA phù hợp, gồm:

+ Tách chiết DNA tổng số bằng hóa chất theo phương pháp của Wilson.

Sản phẩm DNA tổng số được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,0%.

+ Tách chiết DNA tổng số bằng bộ kit tách chiết DNA. Quy trình được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Tinh sạch sản phẩm DNA tổng số: Sản phẩm DNA tổng số được tinh sạch sử dụng bộ kit tinh sạch DNA. Quy trình được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm DNA sau tinh sạch được kiểm tra bằng điện di

trên gel agarose và so sánh với sản phẩm DNA tổng số trước khi tinh sạch.

1.3.5.3. Phân tích đa dạng di truyền dựa vào đoạn gene 16S rRNA

Phân tích đa dạng di truyền dựa vào đoạn gene 16S rRNA là một phương pháp phổ biến trong sinh học phân tử để xác định và phân loại vi sinh vật. Gene 16S rRNA là một thành phần của tiểu đơn vị 30S trong ribosome của vi khuẩn, có trình tự bảo thủ cao nhưng cũng chứa các vùng biến đổi, giúp phân biệt các loài vi sinh vật khác nhau. Kỹ thuật này thường sử dụng phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction) để khuếch đại đoạn gene 16S rRNA, sau đó tiến hành giải trình tự và so sánh với cơ sở dữ liệu để xác định sự đa dạng vi sinh vật trong mẫu nghiên cứu.

Phân tích đa dạng di truyền dựa vào đoạn gene 16S rDNA đã được áp dụng ở khá nhiều các kỹ thuật sinh học phân tử. Kỹ thuật SSCP phân tích đa hình các phân tử DNA sợi đơn bằng kỹ thuật điện di. Kỹ thuật này dựa trên cơ sở làm biến tính các sản phẩm PCR đoạn gene mục tiêu thành các sợi đơn DNA. Sau đó, đưa chúng vào điện trường như phương pháp điện di trên gel thông thường nhưng ở điều kiện không biến tính (Schwieger và Tebbe, 1998). Kỹ thuật PCR-RFLP vùng gene 16S rDNA được khuếch đại bằng những cặp mồi chuyên biệt cho từng loài vi sinh vật hoặc bằng những cặp mồi tổng cho hầu hết các giống vi khuẩn. Kỹ thuật này giúp việc xác định đa dạng di truyền của các dòng vi sinh vật trở nên đơn giản và nhanh chóng hơn (Thái Thành Được, 2023).

Một số nghiên cứu về đa dạng di truyền vi sinh vật dựa vào vùng gene 16S rDNA và kỹ thuật PCR-RFLP đã được báo cáo. Theo Chauhan và cs. (2011), cũng đã sử dụng gene 16S rRNA (tương ứng vị trí 519-bp đến 926-bp) từ nguồn DNA phân lập từ đất vùng rẫy cây ngô. Khuếch đại 274 trình tự thu được rồi thực hiện so sánh với trình tự tương đồng. Theo nghiên cứu của Galkiewicz và Kellogg (2008), sử dụng các cặp mồi tổng là 8F, 27F hay 63F là mồi xuôi và 1492R hay 1542R mồi ngược. Cặp mồi 27F và 1492R được sử dụng trong phân tích đa dạng gene 16S rRNA, khuếch đại đoạn gene 1500 bp của các vi sinh vật đất vùng rẫy ngô. Các dòng vi sinh vật được xác định là *Klebsiella* sp. Br1, *Klebsiella pneumoniae* Fr1, *Bacillus pumilus* S1r1, *Acinetobacter* sp. S3r2 và *Bacillus subtilis* UPMB10. Tất cả đều có khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA (Kuan và cs., 2016). Đối với các vi sinh vật nội sinh, theo nghiên cứu của Relman và cs. (1992) các mồi khuếch đại bằng có kích thước khoảng 904 bp khi điện di sản phẩm PCR đoạn gene 16S rRNA bởi cặp mồi p515FPL và p13B. Theo nghiên cứu của Zinniel và cs. (2002) sử dụng cặp mồi p515FPL, p13B và kết hợp 1 mồi PCR-1 phân tích 853 dòng vi sinh vật nội sinh chủ yếu là cây trồng trong đó có cây ngô.

Nghiên cứu của Nguyễn Thị Pha và cs. (2012) sử dụng cặp mồi tổng là 27F và 1495R khuếch đại gene 16S rDNA của 16 dòng vi sinh vật đất vùng rẫy lúa. Nghiên cứu Đặng Thị Ngọc Thanh và Cao Ngọc Diệp (2014) sử dụng cặp mồi 8F và 1492R và cặp mồi p515FPL và p13B đã được sử dụng để khuếch đại gene 16S rRNA của các vi sinh vật vùng rẫy và vi sinh vật nội sinh cây bắp, nghiên cứu này tập trung vào việc phân lập, đặc trưng và xác định các vi sinh vật nội sinh trong cây ngô. Kết quả cho thấy sự đa dạng của các vi sinh vật nội sinh có khả năng cố định đạm, hòa tan phosphate và tổng hợp IAA, với tiềm năng ứng dụng làm phân bón sinh học cho sản xuất ngô bền vững trên đất Acrisols nghèo dinh dưỡng. Đặc biệt, kết quả nghiên cứu của Trần Trọng Hiếu và Nguyễn Hữu Hiệp (2016) khảo sát đa dạng của 2 dòng vi sinh vật với cặp mồi là 27F và 1495R. Dòng NH11 đồng hình với *Klebsiella pneumoniae strain* ZJ-02 và TH10 đồng hình với trình tự *Bacillus megaterium strain* LP35_L05. Kết quả cho thấy các dòng vi sinh vật này có khả năng cố định đạm, tổng hợp IAA và hòa tan lân khó tan, đồng thời một số dòng còn thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với các vi sinh vật gây bệnh như *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus*. Hai dòng

vi sinh vật được xác định danh tính là *Klebsiella pneumoniae* và *Bacillus megaterium* thông qua phân tích trình tự gen 16S rRNA.

1.3.5.4. Giải trình tự thế hệ mới (NGS):

Giải trình tự thế hệ mới (Next-Generation Sequencing - NGS) là một phương pháp tiên tiến trong lĩnh vực sinh học phân tử, cho phép giải trình tự DNA với tốc độ nhanh, độ chính xác cao và khả năng phân tích toàn bộ genome hoặc các đoạn DNA dài. Công nghệ NGS vượt trội hơn so với các phương pháp truyền thống như Sanger sequencing nhờ khả năng xử lý dữ liệu song song trên quy mô lớn, từ đó đáp ứng nhu cầu nghiên cứu phức tạp và đòi hỏi độ chính xác cao trong khoa học hiện đại.

Nghiên cứu của Wang và cs. (2021) đã sử dụng công nghệ giải trình tự thế hệ mới để phân tích genome của một số chủng vi sinh vật kháng kháng sinh được phân lập từ bệnh nhân nhiễm trùng. Kết quả cho thấy sự hiện diện của nhiều gene kháng thuốc, bao gồm các gene mã hóa enzyme β -lactamase và các bơm efflux, đóng vai trò quan trọng trong cơ chế kháng kháng sinh. Nghiên cứu này cung cấp cái nhìn sâu sắc về sự lan truyền của các gene kháng thuốc và đề xuất các biện pháp kiểm soát hiệu quả.

*** Hạn chế của phương pháp Sanger và sự khắc phục bởi NGS**

Phương pháp giải trình tự Sanger, được phát triển vào những năm 1970, là tiêu chuẩn vàng trong nhiều thập kỷ. Tuy nhiên, nó có một số hạn chế:

- *Hiệu suất thấp*: Sanger chỉ cho phép giải trình tự từng đoạn DNA ngắn, thường dưới 1.000 base pairs, và không phù hợp cho việc giải mã toàn bộ bộ gen.

- *Chi phí cao và thời gian dài*: Việc giải trình tự các bộ gen lớn bằng Sanger đòi hỏi nhiều thời gian và chi phí, do phải thực hiện nhiều phản ứng riêng lẻ.

- *Khả năng phát hiện biến thể hạn chế*: Sanger khó phát hiện các biến thể hiếm hoặc đột biến có tần suất thấp trong quần thể tế bào.

*** NGS đã khắc phục những hạn chế này bằng cách:**

- *Giải trình tự song song*: Cho phép phân tích hàng triệu đoạn DNA cùng lúc, tăng hiệu suất và giảm thời gian.

- *Chi phí giảm*: Công nghệ NGS đã giảm đáng kể chi phí trên mỗi base được giải trình tự, làm cho việc giải mã toàn bộ bộ gen trở nên khả thi về mặt kinh tế.

- *Phát hiện biến thể nhạy*: NGS có khả năng phát hiện các biến thể hiếm và đột biến với độ nhạy cao, hữu ích trong nghiên cứu ung thư và các bệnh di truyền.

*** Ứng dụng của NGS trong Metagenomics**

Metagenomics là nghiên cứu về vật liệu di truyền được lấy trực tiếp từ mẫu môi trường, cho phép phân tích cộng đồng vi sinh vật mà không cần nuôi cấy. NGS đã thúc đẩy sự phát triển của metagenomics bằng cách:

- *Phân tích đa dạng vi sinh vật*: Giúp xác định và định lượng các loài vi sinh vật trong môi trường phức tạp, như đất, nước, hoặc hệ vi sinh vật đường ruột.

- *Khám phá gene và chức năng mới*: Phát hiện các gene mới và hiểu rõ hơn về chức năng sinh học của cộng đồng vi sinh vật.

- *Nghiên cứu hệ vi sinh vật liên quan đến sức khỏe*: Phân tích hệ vi sinh vật trong cơ thể người để hiểu mối liên hệ với các bệnh như béo phì, tiểu đường, và rối loạn tiêu hóa.

*** Tiến bộ gần đây trong NGS**: Các tiến bộ gần đây trong NGS bao gồm:

- *Giải trình tự đơn phân tử*: Công nghệ như PacBio và Oxford Nanopore cho phép giải trình tự các phân tử DNA đơn lẻ, cung cấp độ dài đọc dài và giảm sai số.

- *Giải trình tự RNA*: RNA-Seq cho phép phân tích biểu hiện gene và khám phá các biến thể RNA, hữu ích trong nghiên cứu biểu sinh và ung thư.

- *Giải trình tự epigenome*: Phân tích các biến đổi epigenetic như methyl hóa DNA, giúp hiểu rõ hơn về cơ chế điều hòa gene.

Giải trình tự thế hệ mới (NGS) đã khắc phục nhiều hạn chế của phương pháp Sanger, mang lại khả năng giải mã toàn bộ bộ gen với hiệu suất cao và chi phí thấp. NGS đã mở ra nhiều ứng dụng trong metagenomics, giúp hiểu rõ hơn về đa dạng vi sinh vật và mối liên hệ với sức khỏe con người. Với những tiến bộ liên tục, NGS tiếp tục là công cụ quan trọng trong nghiên cứu sinh học và y học hiện đại.

1.4. Tổng quan về phân hữu cơ vi sinh

Phân hữu cơ vi sinh là loại phân được sản xuất từ nguyên liệu hữu cơ có chứa ít nhất một chủng vi sinh vật sống có ích với mật độ phù hợp với quy chuẩn kỹ thuật đã ban hành. Phân phải đảm bảo một số chỉ tiêu: ẩm độ đối với phân bón dạng bột $\leq 30\%$; hàm lượng hữu cơ tổng số $\geq 15\%$; mật độ mỗi chủng vi sinh vật có ích $\geq 1 \times 10^6$ CFU/g. Sự kết hợp của phân bón hữu cơ truyền thống với các vi sinh vật có lợi có tác dụng nâng cao hiệu quả sử dụng dinh dưỡng và cải thiện sức khỏe đất (Phạm Văn Toàn, 2017).

Dựa theo thành phần, hàm lượng dưỡng chất, phân bón hữu cơ vi sinh có 7 loại, cụ thể như sau:

- Phân hữu cơ vi sinh cố định đạm
- Phân hữu cơ vi sinh phân giải lân
- Phân hữu cơ vi sinh phân giải kali/silic
- Phân hữu cơ vi sinh phân giải chất hữu cơ/cellulose
- Phân hữu cơ vi sinh ức chế các vi sinh vật gây bệnh
- Phân hữu cơ vi sinh cung cấp khoáng chất, vi lượng
- Phân hữu cơ vi sinh sản xuất các chất kích thích sinh trưởng

Hiệu quả của vi sinh vật trong việc làm tăng khả năng sinh trưởng và phát triển cây trồng, tiết kiệm phân bón hóa học cũng như tăng năng suất, chất

lượng nông sản đã được khẳng định ở nhiều công trình nghiên cứu của nhiều nước trên thế giới. Các sản phẩm phân bón như phân bón vi sinh vật cố định nitơ, phân giải photphat khó tan, chế phẩm vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật, chế phẩm vi sinh vật phòng trừ bệnh cây trồng đã được nghiên cứu từ nhiều năm có ý nghĩa quan trọng trong việc bảo vệ môi trường và xây dựng nền nông nghiệp bền vững. Phân hữu cơ vi sinh hoạt động dựa vào sinh vật sống, giúp thúc đẩy tăng trưởng của cây và chuyển hóa các chất dinh dưỡng từ khó tiêu thành dạng dễ tiêu. Các nhóm sinh vật chủ yếu bao gồm sinh vật cộng sinh, hội sinh, tự do và nội sinh. Tác dụng chính của các sản phẩm phân hữu cơ vi sinh là thúc đẩy quá trình cố định nitơ, quá trình chuyển hóa chất dinh dưỡng (P, K, Zn, S...), kích thích sinh trưởng thực vật, chống lại các stress sinh học và phi sinh học (Yadav, 2017).

Theo nghiên cứu về phân hữu cơ vi sinh (Shiuan-Yuh Chien, 2017) đã chỉ ra rằng, những lợi ích thu được từ việc sử dụng các sản phẩm này trong sản xuất nông nghiệp khá toàn diện, bao gồm: làm tăng hàm lượng các chất dinh dưỡng trong đất (vi sinh vật cố định nitơ), tăng hàm lượng các chất dinh dưỡng dễ tiêu trong đất (vi sinh vật phân giải phosphate khó tan, nấm rễ...), thúc đẩy sinh trưởng và hút thu thức ăn của rễ, ảnh hưởng tích cực với tình trạng bệnh cây, tăng cường quá trình phân giải và chuyển hóa chất hữu cơ, làm suy giảm các chất ô nhiễm hay chất độc trong đất và cải thiện tính chất đất, đặc biệt là tính chất vật lý. Kết hợp bón phân vermicompost với sản phẩm chứa nấm rễ (*Glomus mosseae* và *Piriformospora indica*) cho cây cỏ ngọt (*Stevia rebaudiana* Bertoni) giúp tăng năng suất và hàm lượng các chất N, P, K trong lá, đồng thời làm tăng hàm lượng P trong đất (Raziye Zare Hoseini và cs., 2015). Cây đậu Hà Lan cũng sinh trưởng tốt hơn, các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất hạt cao hơn khi được bón phân hữu cơ vi sinh chứa vi sinh vật *Rhizobium* ở mức 30g/kg kết hợp với 25N, 40P₂O₅ và 60 K₂O cho 1 ha (Insaf Khan và cs., 2017). Vamadeva Angadi và cs. (2017) cho biết, tại Ấn Độ, việc sử dụng phân hữu cơ vi sinh (*Azospirillum* + vi sinh

vật phân giải P ở mức 2,5kg/ha) kết hợp với bón phân khoáng tạo ra ảnh hưởng rất tích cực đến sinh trưởng và năng suất cà chua.

Tại Việt Nam sản xuất phân bón sinh học được giám sát và cấp phép bởi nhiều cơ quan quản lý nhà nước. Một số chủng được sản xuất phân bón chủ yếu là *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Anthrobacter*, *Flavobacterium*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Candida*, *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Aspergillus*. Tuy nhiên, những nghiên cứu về vi khuẩn cố định đạm còn rất ít. Tình hình sản xuất phân vi sinh ở nước ta vẫn chưa đáp ứng đủ nhu cầu thực tiễn sản xuất của nền nông nghiệp, do quy mô sản xuất nhỏ, chất lượng sản phẩm chưa hoàn thiện và ổn định.

Để sản xuất phân bón hữu cơ vi sinh tốt, phải có chủng vi sinh vật có hoạt tính sinh học cao, đa hoạt tính, khả năng tồn tại lớn. Vì vậy, việc phân lập, tuyển chọn đánh giá hoạt tính của một số chủng vi sinh vật là việc làm không thể thiếu trong quy trình sản xuất chế phẩm phân bón vi sinh vật cũng như phân hữu cơ vi sinh (Nguyễn Xuân Thành và cs., 2003).

Phân bón có chứa vi sinh vật cố định nitơ luôn được quan tâm nghiên cứu và đẩy mạnh sản xuất, ứng dụng cho cây trồng nông - lâm nghiệp. Với mục đích tiếp tục tìm kiếm trong tự nhiên một số chủng *Azotobacter* có nhiều hoạt tính sinh học quý, đặc biệt là có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA với hàm lượng cao, có khả năng thích ứng rộng. Sử dụng phân hữu cơ vi sinh ở Việt Nam còn rất nhiều hạn chế vì nhiều nguyên nhân khác nhau, trong đó đáng kể nhất là kinh phí dành cho nghiên cứu và phát triển phân hữu cơ vi sinh còn thiếu; trang thiết bị dành cho nghiên cứu và sản xuất phân hữu cơ vi sinh chưa được đồng bộ, hiện đại; phân hữu cơ vi sinh chưa hấp dẫn nông dân vì hiệu quả chậm hơn so với việc sử dụng phân khoáng (Nguyen Văn Suc, 2006); Nguyen Thu Ha và Nguyen Thu Van (2017). Các sản phẩm phân hữu cơ vi sinh phổ biến nhất trên thị trường Việt Nam hiện nay gồm một số sản

phẩm phân vi sinh vật, phân bón chứa axit humic, axit fulvic, một số loại phân hữu cơ vi sinh nhập khẩu chứa axit amin và phân trùn quế.

Bảng 1.1. Một số chủng vi sinh vật phổ biến được sử dụng sản xuất phân hữu cơ vi sinh thương mại ở Châu Á và Việt Nam

* Vi sinh vật cố định nitơ	*Vi sinh vật phân giải lân và các chất khoáng khó tan
<i>Rhizobium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
<i>Azotobacter</i>	<i>Bacillus polymyxa</i>
<i>Azospirillum</i>	<i>Bacillus circulans</i>
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>Pseudomonas striata</i>
*Vi sinh vật huy động Kali	<i>Aspergillus awamori</i>
<i>Fraturia aurantia</i>	<i>Penicillium digitatum</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida</i>
<i>Bacillus circulans</i>	* Vi sinh vật khác
<i>Paenibacillus</i>	<i>Trichoderma</i>
<i>Burkholdera</i>	<i>Flavobacterium</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Streptomyces</i>

Nguồn: (Yadav, 2017)

1.5. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước về vi sinh vật đồng thời cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA ứng dụng trong sản xuất phân hữu cơ vi sinh

1.5.1. Các nghiên cứu trên thế giới

Trên thế giới nhiều nghiên cứu đã chứng minh được rằng, một số chủng vi sinh vật có khả năng đồng thời cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA, đây là nguồn vi sinh vật quan trọng đối với nền nông nghiệp hiện đại. Nhóm vi khuẩn nổi bật có thể kể đến là các vi sinh vật vùng rễ kích thích tăng trưởng thực vật như *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* (Kumar và cs., 2023).

Kết quả nhóm nghiên cứu của Samina và George (2006) xác định sự ảnh hưởng của 3 dòng vi sinh vật *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans* và *Azospirillum lipoferum* lên sự phát triển của cây ngô thông qua việc kiểm tra khả năng cố định nitơ và khả năng sản sinh IAA. Kết quả cho thấy khả năng sản xuất IAA của *Azospirillum brasilense* N8 sản sinh ra lượng IAA cao nhất 16,8 µg/mL, *Azospirillum lipoferum* N7 sinh tổng hợp ra 6,5 µg/mL IAA; trong khi hai chủng *Pseudomonas putida* CQ179 và *Gluconacetobacter azotocaptans* DS1 sinh tổng hợp IAA ít hơn, lần lượt là 105 và 106 ng/mL. Đồng thời, phân tích trình tự gen cho thấy sự có mặt của gen *nifD* (gen mã hóa cho enzyme nitrogenase có vai trò cố định nitơ) một số chủng vi sinh vật *Azospirillum brasilense* N8, *Azospirillum lipoferum* N7 và *Gluconacetobacter azotocaptans* DS1; với khả năng cố định nitơ tự do từ 6,6 đến 120 nmol/giờ. Kết quả khảo sát trên cây ngô bằng việc kết hợp cả ba chủng có khả năng cố định nitơ và sản sinh IAA cho thấy, chúng có tác động tốt trong việc thúc đẩy sinh trưởng ở cây ngô nhanh hơn khoảng 15-20% về chiều dài thân và chiều dài bộ rễ so với đối chứng (không sử dụng một số chủng vi sinh vật ở trên). Nghiên cứu của (Mirzahi và cs., 2013) cho biết, *Azospirillum* giúp tăng năng suất lúa từ 32 - 81% ở điều kiện nhà lưới. Zhang và cs. (2023) khẳng định một số chủng vi sinh vật như *Bacillus* và *Pseudomonas* cải thiện sức khỏe đất và tăng sức đề kháng của cây.

Với mục tiêu sàng lọc một số chủng vi sinh vật vùng rễ, hỗ trợ cây trồng sinh trưởng Rodrigues và cs. (2016) đã tuyển chọn được tuyển chọn được 21 chủng có khả năng cố định nitơ (từ 8 đến 24 µg/ml tùy thuộc vào lượng tryptophan sử dụng) và 47 chủng sản sinh IAA (từ 64,3 đến 127,84 µg/ml). Trong đó *Klebsiella* spp. (KFA 1.3, KFA 1.2, KRC 2.2 và KRB 1.2), *Pantoea* sp. KRZ5 và *Enterobacter* spp. (KRZ6 và KRZ23) có cả khả năng sinh tổng hợp IAA và cố định nitơ. Một số chủng vi sinh vật này được bổ sung vào vùng rễ của cây ngô với mật độ 10⁵ CFU/g đất đối với mỗi chủng. Kết quả cho thấy chúng có vai trò làm tăng diện tích lá ngô từ 35,54 đến 46,96 cm²

(trong khi diện tích lá của lô đối chứng là 31,58 cm²).

Công trình nghiên cứu của Giassi và cs. (2016) tiến hành đánh giá vai trò của nhóm vi sinh vật vùng rễ hỗ trợ cây cam sinh trưởng. Nhóm tác giả đã tuyển chọn được 30 chủng vi sinh vật đất bao gồm 11 chủng thuộc chi *Bacillus* và 19 chủng thuộc *Actinobacteria*. Trong đó 06 chủng có tiềm năng ứng dụng trong nông nghiệp với khả năng sinh tổng hợp IAA và cố định nitơ (nitơ tổng số) tương ứng *Bacillus* sp. BM24 là 21,07 µg/ml và 41,36 µg/ml; *Bacillus* sp. CPMO5 (30,34 và 41,08 µg/ml); *Bacillus* sp. BM16 (20,17 và 17,69 µg/ml); *Bacillus* sp. CPMO2 (19,43 và 45,09 µg/ml); *Bacillus* sp. BM17 (16,03 và 56,5 µg/ml) và *Actinobacteria* sp. ACT11 (0,73 và 61,54 µg/ml). Đánh giá vai trò của một số chủng tiềm năng này đối với sinh trưởng cây cam cho thấy (i) về chiều cao thân dao động từ 15,58 đến 22,56 cm so với đối chứng là 11,9 cm; (ii) tổng số lá trên cây từ 13,2 đến 16,4 lá (đối chứng là 12,0 lá); (iii) đường kính mầm từ 0,34 đến 0,38 cm (đối chứng là 0,29 cm). Tuy nhiên, khi sử dụng tất cả một số chủng này với nhau thì không có hiệu quả vượt trội so với sử dụng riêng lẻ từng chủng vi sinh vật đối với cây cam; cụ thể khi kết hợp tất cả một số chủng vi sinh vật trên với nhau thì chiều cao cây là 15,28 cm, số lá/cây là 13,4 và đường kính mầm là 0,37 cm.

Một nghiên cứu khác của Anjali Chauhan và cs. (2017), tuyển chọn được chủng *Aneurinibacillus aneurinilyticus* CKMV1 vùng rễ với khả năng cố định nitơ 202,91 nmol/giờ và sản sinh IAA khoảng 8,1 µg/mL) sau 72 giờ nuôi cấy. Khi tiến hành ủ hạt cà chua với chủng CKMV1 cho kết quả nảy mầm của hạt đạt 88,7%, trong khi đối chứng (không sử dụng chủng CKMV1) là 60,8%. Thêm nữa khi theo dõi sinh trưởng của cây cà chua cũng cho thấy chủng CKMV1 có tác động hiệu quả đối với cà chua. Cụ thể chủng CKMV1 giúp tăng chiều dài rễ và chồi mầm lần lượt là 22,6 và 13,8% so với đối chứng.

Với mục tiêu nghiên cứu là tuyển chọn và định lượng nhóm vi sinh vật có vai trò thúc đẩy sinh trưởng ở cây mía, Li và cs. (2017) đã tuyển chọn

được 30 chủng vi sinh vật thuộc chi *Pseudomonas*. Kết quả khảo sát cho thấy cả 30 chủng *Pseudomonas* spp. đều có mang gen *nifD* (gen mã hóa cho enzyme nitrogenase) và sản sinh IAA. Trong đó sinh tổng hợp IAA dao động từ 13,12 đến 312,07 $\mu\text{g/mL}$ trong môi trường có bổ sung tryptophan với nồng độ khác nhau và lượng nitơ được cố định 6,16 đến 108,30 $\mu\text{mol/ml}$. Nhóm nghiên cứu của Gusti Ayu Kade Sutariati và cs. (2020), đã đánh giá sự tác động của vi sinh vật có khả năng cố định đạm, tổng hợp hoocmon sinh trưởng có ảnh hưởng trực tiếp hay gián tiếp đến việc tăng trưởng của cây, kể cả sinh trưởng của hạt. Nhóm nghiên cứu đã đánh giá thông qua việc lây nhiễm nhóm nội vi sinh vật *Rhizobacteria* vào hạt lúa thông qua quá trình ủ sinh học (tất cả một số chủng *Rhizobacteria* thử nghiệm đều có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA). Kết quả cho thấy xử lý hạt giống bằng nội vi sinh vật *rhizobacteria* làm tăng chiều dài rễ của hạt lúa lên đến 140% so với hạt không xử lý.

Theo Grand View Research (2014), một công ty nghiên cứu thị trường và tư vấn Quốc tế có trụ sở đóng tại San Francisco Hoa Kỳ, tổng giá trị thương mại phân bón toàn cầu năm 2014 đạt 420 triệu USD và dự kiến sẽ đạt 1,3 tỷ USD vào năm 2020 với mức tăng trưởng tương đương khoảng 15,4 %. Cũng theo Grand View Research (2014), hai loại phân bón hữu cơ vi sinh chính đang được thương mại trên toàn cầu là phân vi sinh vật cố định nitơ và phân vi sinh vật phân giải lân. Các loại phân hữu cơ vi sinh vật khác (phân hữu cơ vi sinh vật phân giải kali, phân vi sinh vật kích trưởng thực vật, phân vi sinh vật đa chức năng...) chỉ chiếm tỷ lệ thấp, khoảng 8%. Theo thống kê của Trung tâm nghiên cứu Công nghiệp công nghệ sinh học, thuộc Viện Nghiên cứu kinh tế Đài Loan (2014), quy mô thị trường phân hữu cơ vi sinh toàn cầu mới đạt 0,6 tỷ USD (Su-San Chang, 2017).

Phân bón hữu cơ vi sinh vật được sử dụng cho nhiều đối tượng cây trồng tại nhiều quốc gia trên thế giới và được đánh giá có hiệu quả kinh tế, xã hội và môi trường cao. Theo FAO (1984) cố định nitơ cộng sinh giữa vi sinh vật nốt sần và cây lạc hàng năm cung cấp thêm cho đất và cây trồng 72-124kgN/ha. Sản phẩm phân bón hữu cơ vi sinh vật cố định nitơ từ *Azospirillum* được nghiên cứu và đưa vào sử dụng tại nhiều nước trên thế giới.

Theo Zhang và cs. (2023), việc sử dụng các sản phẩm vi sinh vật như *Bacillus* và *Pseudomonas* đã giúp cải thiện sức khỏe đất, tăng khả năng chống chịu của cây lúa đối với các bệnh hại và điều kiện bất lợi. Tại Indonesia, phân bón hữu cơ vi sinh cũng được sử dụng rộng rãi trong canh tác lúa. Theo nghiên cứu của Setiawan và cs. (2023), việc sử dụng các loại vi sinh vật hữu ích như *Rhizobium* và *Mycorrhiza* giúp tăng cường sự phát triển của cây lúa, cải thiện khả năng hấp thụ dinh dưỡng và nước.

Với cây ngô sử dụng phân bón hữu cơ vi sinh vật giúp tăng cường khả năng chống chịu của cây ngô đối với các điều kiện khắc nghiệt như hạn hán và sâu bệnh, việc sử dụng phân bón hữu cơ vi sinh vật giúp tăng năng suất ngô lên 15-25%, đồng thời cải thiện chất lượng hạt ngô, phân bón hữu cơ vi sinh vật không chỉ cải thiện năng suất mà còn giúp tăng cường hàm lượng dinh dưỡng trong hạt ngô, từ đó mang lại lợi ích về sức khỏe cho người tiêu dùng Müller và cs. (2021).

Tại Ấn Độ, nghiên cứu của Patel và cs. (2022) cũng cho thấy kết quả tương tự với việc tăng năng suất ngô lên đến 18%. Nghiên cứu của Ochieng (2022) cho thấy rằng phân bón hữu cơ vi sinh vật giúp tăng khả năng chịu hạn của cây ngô và cải thiện chất lượng đất.

1.5.2. Các nghiên cứu tại Việt Nam

Tuyển chọn một số chủng vi sinh vật có triển vọng với hoạt tính cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA hướng tới sản xuất phân bón sinh học cho cây mía, Đỗ Kim Nhung và Vũ Thành Công (2011) đã khảo sát khả năng sinh tổng hợp indol acetic acid (IAA) và cố định đạm của vi sinh vật *Gluconacetobacter* sp.

và *Azospirillum* sp. được phân lập từ cây mía nhằm sản xuất phân bón vi sinh. Trong số 12 dòng vi sinh vật *Azospirillum* sp. và 14 dòng vi sinh vật *Gluconacetobacter* sp. đã được khảo sát thì có 2 dòng vi sinh vật A1 và G10 vừa có khả năng tổng hợp IAA vừa có khả năng cố định đạm đạt ở mức cao. Lượng IAA của dòng A1 đạt (17,748 µg/ml); G10 (2,710 µg/ml) và lượng đạm A1 đạt (8,098 µg/ml); G10 (8,772 µg/ml).

Theo nghiên cứu của Nguyễn Anh Huy và Nguyễn Hữu Hiệp (2018) cho biết phân hữu cơ vi sinh có chứa chủng *Azospirillum* sp. ở điều kiện ngoài đồng ruộng giúp làm tăng năng suất lúa 10 - 30%.

Từ mẫu đất vùng rẫy lúa của 4 giống lúa khác nhau thu tại tỉnh Cần Thơ và Trà Vinh, Nguyễn Thị Phương Oanh và cs., (2013) đã phân lập được 56 chủng vi sinh vật có khả năng cố định đạm, trong đó 15 chủng có khả năng cố định đạm cao được chọn để tiếp tục khảo sát khả năng tổng hợp IAA. 5 chủng vi sinh vật TV2C1, TV3A4, TV2B7, CTA3 và CTB3 vừa có khả năng cố định đạm ở mức cao (trên 4,1 mg/l), vừa có khả năng tổng hợp IAA tốt. Lượng IAA tổng hợp được của 5 chủng vi sinh vật này biến động từ 28,6293 µg/ml (TV2C1) đến 42,1351 µg/ml (TV2B7).

Nguyễn Thị Thu Hằng và Nguyễn Thị Thủy (2015) đã nghiên cứu phân lập và tuyển chọn được 2 chủng vi sinh vật *Azotobacter* từ 20 mẫu đất trồng lúa ở Sơn Tây và Xuân Mai, Hà Nội có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA. Theo đó, 2 chủng *Azotobacter* tuyển chọn được ký hiệu AZT1 và AZT7, vừa có khả năng cố định nitơ phân tử trong không khí thành nitơ dạng ammonium (NH_4^+), vừa có khả năng sinh IAA với hàm lượng cao. Trong môi trường Ashby lỏng bổ sung 2% glucose, pH 7, nuôi cấy ở 30°C trong 72 giờ, chủng AZT1 và AZT7 có khả năng cố định nitơ tương ứng là 3,36 mg/l và 3,32 mg/l, sinh tổng hợp IAA với hàm lượng tương ứng 10,11 µg/ml và 12,87 µg/ml. Ngoài khả năng cố định nitơ và sinh IAA, hai chủng AZT1 và AZT7 còn có hoạt tính phosphatase và cellulase.

Cùng nghiên cứu về một số chủng *Azotobacter*, Trần Thị Xuân Phương và cs. (2017) đã phân lập được 56 chủng vi sinh vật *Azotobacter* từ 19 mẫu đất trồng lúa tại Thừa Thiên Huế và đã tuyển chọn được 3 chủng HC21, HC24, TT13 có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA mạnh. Đặc điểm hình thái của 3 chủng: Sau khi tiến hành nhuộm Gram thì cả ba chủng đều là vi sinh vật Gram (-). Chủng HC21 và HC24 có đặc điểm tế bào hình cầu, có khả năng di động. Đặc điểm tế bào của chủng TT13 là hình tròn và có khả năng di động. Thăm dò điều kiện tối ưu cho sự sinh trưởng và phát triển của 3 chủng vi sinh vật trong môi trường Ashby dịch thể kết quả thu được: Chủng HC21 sinh trưởng và phát triển tốt với nguồn carbon là glucose, nhiệt độ là 28°C, pH = 7; chủng HC24 sinh trưởng và phát triển tốt với nguồn carbon là saccharose, nhiệt độ là 30°C, pH = 7,5; chủng TT13 sinh trưởng và phát triển tốt với nguồn carbon là glucose, nhiệt độ là 30°C, pH = 7. Một số chủng vi sinh vật *Azotobacter* tuyển chọn đều có khả năng kích thích sự sinh trưởng và phát triển của cây lúa trong điều kiện in vitro trong đó chủng HC21 có ảnh hưởng tốt nhất. Ngô Thanh Phong và cs. (2011), nghiên cứu của chủng vi khuẩn nốt rỗ và vi khuẩn *Pseudomonas* spp. trên lúa cao sản trồng trên đất phù sa Cần Thơ với kết quả các dòng vi khuẩn hữu hiệu có thể kích thích sự phát triển và gia tăng năng suất lúa cao sản. Ngô Thanh Phong và cs. (2011) đã nghiên cứu xác định mức độ thay thế phân đạm của vi khuẩn *Pseudomonas* sp. BT1 và BT2 với cây lúa cao sản trồng trong chậu. Chủng riêng lẻ *Pseudomonas* sp. BT1 hoặc *Pseudomonas* sp. BT2 cho cây lúa cao sản OM2517 trồng trong chậu đã thay thế được đến 50%N. Chủng phối hợp giữa *Pseudomonas* sp. BT1 và *Pseudomonas* sp. BT2 cho cây lúa cao sản OM2517 trồng trong chậu có khả năng thay thế đến 75%N (chỉ cần bón 25%N). Trong trường hợp thay thế 50%N (chỉ bón 50%N) thì năng suất lúa trong chậu có thể tăng lên 23,9% so với đối chứng.

Phân bón vi sinh có chứa chủng *Azotobacter* kết hợp với chế phẩm *Trichoderma* bón cho lúa đã được triển khai trên mô hình khảo nghiệm. Ngoài ra, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus* với mật độ 5×10^6 CFU/g được kết hợp với nhau bổ sung vào phân hữu cơ vi sinh đa chủng. Một số chủng vi sinh *Rhizobium*/*Azotobacter*/*Azospirillum* và *Bacillus* có mật độ tế bào 10^6 CFU/g được ứng dụng để sản xuất các sản phẩm phân hữu cơ vi sinh hỗn hợp cố định nitơ và phân giải lân, và phân hữu cơ vi sinh chức năng. Đây là sản phẩm nghiên cứu của Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam sản xuất để bón phân cho cây lúa. Mặt khác, sản phẩm phân bón hữu cơ vi sinh Sông Gianh với chủng *Azotobacter* (3×10^6 CFU/g) đã được sử dụng trên cây lúa ở quy mô diện rộng, với lượng phân bón 30-35 kg/sào, với năng xuất lúa tăng 13%.

Theo Nguyễn Thị Thu Hằng và Nguyễn Thị Thuý (2015) cho biết, nhiều chủng vi sinh vật đã được phân lập và ứng dụng sản xuất phân bón hữu cơ vi sinh thành công sử dụng cho cây ngô, tiêu biểu là vi sinh vật cố định nitơ như *Azotobacter*. Nồng độ loại vi sinh này sử dụng trong phân bón hữu cơ thường là 5×10^6 CFU/g.

Trong điều kiện biến đổi khí hậu và sự nóng lên toàn cầu thì xâm nhập mặn là một trong những vấn đề cấp thiết của ngành nông nghiệp vì nó tác động trực tiếp đến năng suất và chất lượng nông sản. Việc tìm ra một số chủng vi sinh vật có khả năng chịu mặn đồng thời có hoạt tính sinh học cố định đạm và sinh tổng hợp IAA là một trong những giải pháp phù hợp hiện nay và cần được khuyến khích. Nguyễn Anh Huy và Nguyễn Hữu Hiệp (2018) đã phân lập được 116 chủng vi sinh vật chịu mặn được phân lập trên môi trường Burk có bổ sung muối 10‰. Tất cả 116 chủng vi sinh vật đều có khả năng tổng hợp ammonium (NH_4^+) và tổng hợp indole acetic acid (IAA). Trong đó, 2 chủng PL2 và PL9 vừa có khả năng cố định đạm vừa có khả năng

tổng hợp IAA cao: PL2 tổng hợp (NH_4^+) đạt 3,73 $\mu\text{g/ml}$, IAA đạt 45,31 $\mu\text{g/ml}$; chủng PL9 tổng hợp (NH_4^+) đạt 2,71 $\mu\text{g/ml}$, IAA đạt 46,46 $\mu\text{g/ml}$. Hai chủng vi sinh vật được nhận diện bằng phương pháp so sánh trình tự vùng gen 16S rDNA, kết quả chủng PL2 được xác định tương đồng chủng *Bacillus megaterium* và chủng PL9 được xác định tương đồng chủng *Burkholderia cenocepacia*.

Ở Việt Nam, nhiều thí nghiệm đã được thực hiện chứng minh rằng sử dụng phân bón hữu cơ vi sinh góp phần tăng năng suất cây trồng (lúa, ngô, rau các loại, đậu đỗ, chè, cây lâm nghiệp...) và độ phì đất, đồng thời tiết kiệm phân khoáng (Nguyễn Kim Vũ, 1995); (Phạm Văn Toàn, 2002); Nguyễn Văn Thao và cs. (2015) đã nghiên cứu sản xuất phân hữu cơ vi sinh từ hỗn hợp bã nấm, phân gà và thử nghiệm thành công trên cây rau cải chíp. Kết quả thí nghiệm cho thấy, sử dụng phân hữu cơ vi sinh này giúp năng suất thực thu cao hơn so với trường hợp bón phân chuồng và không bón phân hữu cơ. Thử nghiệm phân trùn quế trong sản xuất lúa ĐTL2 theo hướng hữu cơ tại Hà Nội đã nhận thấy, bón 10 tấn phân trùn quế giúp thu được năng suất lúa cao nhất. Năng suất lúa tăng dần khi tăng lượng phân trùn quế từ mức 2 tấn/ha đến 10 tấn/ha. (Nguyễn Thị Ngọc Dinh và cs., 2015); Nguyễn Thu Hà và cs. (2016) đã chỉ ra rằng, với sự có mặt của trùn quế trong quá trình ủ vật liệu hữu cơ (quá trình composting) sự chuyển hóa các hợp chất hữu cơ chứa N được thúc đẩy nhanh chóng, nhờ vậy hàm lượng N tổng số và N thủy phân tăng lên rõ rệt so với công thức đối chứng không có trùn quế (cao hơn 1,91 và 2,27 lần).

Từ những năm 2004, GS.TS Trần Kim Quy cùng các cộng sự tại Viện Công nghệ Hóa sinh ứng dụng TP. Hồ Chí Minh đã tập trung nghiên cứu với mục tiêu tìm công nghệ xử lý rác sinh hoạt để sản xuất phân hữu cơ phù hợp với điều kiện Việt Nam. Sau hơn 10 năm nghiên cứu, nhóm tác giả đã tìm ra những vi sinh vật có ích để xử lý rác và xây dựng quy trình sản xuất phân hữu cơ vi sinh. Giải pháp của nhóm nghiên cứu với quy trình sản xuất phân hữu

cơ vi sinh từ chất thải rắn sinh hoạt đã đạt giải Nhất tại cuộc thi sáng chế năm 2018 do Bộ Khoa học và Công nghệ phối hợp với Tổ chức Sở hữu trí tuệ thế giới (WIPO), Cơ quan Sở hữu trí tuệ Hàn Quốc (KIPO) và Ban Khoa giáo, Đài Truyền hình Việt Nam tổ chức Cuộc thi Sáng chế 2018 với thông điệp “Sáng tạo công nghệ cho cuộc sống hàng ngày”, thu hút được đông đảo tổ chức, cá nhân tham gia và nhận được sự đánh giá cao của WIPO và KIPO (Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển truyền thông KH&CN, 2019).

Theo Phạm Văn Toàn (2004), khi sử dụng phân hữu cơ vi sinh đa chủng chức năng có khả năng gia tăng sinh khối và năng suất cây trồng ngay cả khi giảm 10-30% lượng dinh dưỡng khoáng N, P. Kết quả khảo nghiệm cũng xác định vi sinh vật chức năng có tác dụng tăng năng suất và giảm tỷ lệ bệnh vùng rễ trung bình 36,58% và 77,48% đối với khoai tây; 19,73% và 62,57% đối với lạc, 16,42% và 77,63% đối với cà chua, tăng 13,5% năng suất đối với tiêu.

Nghiên cứu của Đỗ Anh Tuấn và Vũ Đình Chính (2019) các loại phân bón hữu cơ vi sinh khác nhau có tác động không đồng nhất đến các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển của hai giống đậu tương D140 và DT96. Kết quả theo dõi cho thấy, trên cả hai giống, việc sử dụng phân hữu cơ vi sinh Sông Gianh và Quế Lâm 1 giúp cây đậu tương đạt được các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển vượt trội so với các loại phân còn lại. Đồng thời, các loại phân hữu cơ vi sinh này cũng tạo ra sự khác biệt rõ rệt về các yếu tố cấu thành năng suất và hiệu quả kinh tế trên hai giống đậu tương nghiên cứu. Cụ thể, khi sử dụng phân hữu cơ vi sinh Sông Gianh, giống D140 đạt năng suất 23,15 tạ/ha với lợi nhuận thuần đạt 13.447.000 đồng, trong khi giống DT96 đạt năng suất 24,11 tạ/ha, cho lợi nhuận thuần 15.367.000 đồng. Đối với phân hữu cơ vi sinh Quế Lâm 1, năng suất thu được ở giống D140 là 23,05 tạ/ha (lãi thuần 10.997.000 đồng) và ở giống DT96 là 24,85 tạ/ha (lãi thuần 14.597.000 đồng).

Nghiên cứu về sự tương tác giữa vi sinh vật cố định đạm và phân giải lân, Nguyễn Hữu Hiệp và Hà Danh Đức (2009) đã công bố: các vi sinh vật

này dù ở dạng hỗn hợp hay riêng rẽ từng chủng khi bón vào đất trồng lạc thì vi sinh vật giúp cây lạc tăng chiều cao so với đối chứng không bón chế phẩm vi sinh vật. Hàm lượng đạm và lân của cây lạc được bón chế phẩm vi sinh vật đều cao hơn nghiệm thức đối chứng, đồng thời khẳng định nếu sử dụng chế phẩm ở dạng hỗn hợp vi sinh vật sẽ giúp thay thế khoảng 50 kg N/ha và 60 kg P_2O_5 /ha. Kết quả nghiên cứu của Nguyen Hoang Anh và cs. (2025), loại phân bón sinh học mới chứa các chủng vi sinh vật cố định nitơ *Rhodobacter sphaeroides* giúp cải thiện các chỉ tiêu sinh trưởng như chiều cao cây, chiều dài bông, số bông/cụm, số hạt/bông, tỷ lệ hạt chắc và năng suất hạt so với đối chứng, thay thế được 25% lượng phân đạm hóa học.

Đối với phân bón hữu cơ đa chủng đa chức năng có nghiên cứu của Lê Như Kiều và cs. (2011), nhóm tác giả đã sử dụng 4 chủng vi sinh vật có ích và an toàn sinh học, đó là một số chủng A11 có khả năng cố định nitơ, chủng KT7 có khả năng kích thích sinh trưởng thực vật, chủng PI6 có khả năng phân giải lân, chủng ĐK 14 có khả năng ức chế nấm gây bệnh thối cổ rễ nghiên cứu trên đối tượng cây chè. Kết quả là chế phẩm vi sinh vật đa chủng đã làm giảm tỷ lệ chết ở cây chè lên đến 50,6%.

Việc tận dụng phế phụ phẩm của sản xuất nông nghiệp xuất phân bón hữu cơ vi sinh đã được nhiều nhà khoa quan tâm và nghiên cứu. Nghiên cứu của Dương Đức Hiếu và cs. (2012) về sản xuất phân hữu cơ sinh học từ phế phẩm mạt cưa sau thu hoạch nấm và chất thải chăn nuôi cho kết quả tỷ lệ phối trộn mạt cưa: phân lợn (1:1) và mạt cưa: phân gà (1: 1,5) cho sản phẩm phân bón với thông số gồm: tỷ lệ C/N = 15 - 17; độ ẩm 48 - 49%; carbon hữu cơ = 25 - 34%; nitơ tổng = 1,5 - 2,2%; phosphor tổng = 0,7 - 1,5; axit humic = 5,1 - 5,9% và vi sinh vật hữu ích *Trichoderma* T1 $> 10^7$ CFU/g và *Azotobacter* $< 10^5$ CFU/g. Nghiên cứu của sử dụng bã nấm và phân gà kết hợp với vi sinh vật có khả năng amon hóa đồng thời có chức năng kìm hãm sự phát triển của *E. coli* và *Salmonella* của Nguyễn Văn Thao và cs. (2015) cho kết quả sau 30

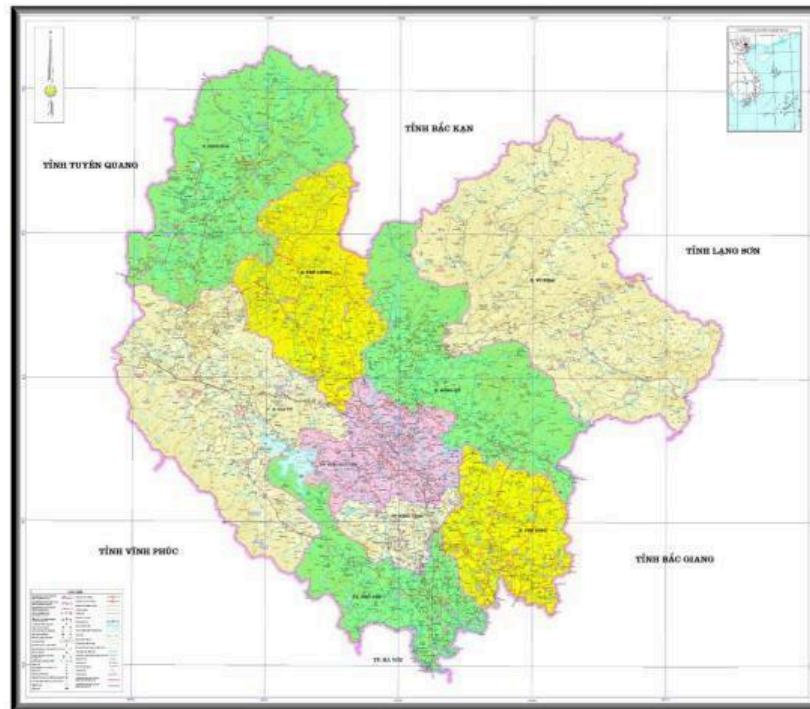
ngày ủ, bón cho cây cải chíp (*Brassica rapa ssp. Chinensis*) giúp cây có năng suất thực thu đạt 1,18 kg/m², cao hơn 38,8% so với công thức bón phân chuồng và không bón phân hữu cơ.

Nguyễn Thị Hằng Nga và cs. (2016) sản xuất chế phẩm vi sinh vật để xử lý phế thải rắn sau chế biến tinh bột sắn làm phân hữu cơ sinh học. Trong đó sử dụng chất mang là than bùn chiếm 90%, mật số vi sinh vật có khả năng cố định đạm sau khi ủ lên đến 10⁷ CFU/g. Nguyễn Thị Phương và cs. (2018), nghiên cứu về sản xuất và đánh giá hiệu quả phân hữu cơ vi sinh từ bùn thải nhà máy sản xuất bia và nhà máy chế biến thủy sản trên năng suất cây rau. Nghiên cứu đã thực hiện các thí nghiệm ủ phân từ các nguồn bùn thải bia và thủy sản với bùn mía tỷ lệ 20: 80. Kết quả cho thấy phân hữu cơ vi sinh sau ủ đạt chất lượng cao với 2,83 - 2,85% N; 5,6 - 6,63% P₂O₅; 2,1 - 2,11% K₂O và 35,21 - 40,98% C. Hàm lượng kim loại nặng, mật độ *Salmonella* và *Escherichia coli* đều đạt dưới ngưỡng cho phép. Mật độ *Trichoderma* sau ủ đạt tiêu chuẩn với 7,14x10⁷ - 7,82x10⁷ CFU/g. Năng suất cây rau tăng có ý nghĩa thống kê ở tất cả các thí nghiệm.

Hiện nay trên thị trường có một số sản phẩm phân bón hữu cơ vi sinh đang được triển khai sử dụng như sản phẩm phân hữu cơ vi sinh Sông Gianh với một số chủng vi sinh vật hữu ích như *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum* có tác dụng giúp cây trồng hấp thu nhanh các chất dinh dưỡng, kích thích bộ rễ phát triển mạnh và năng suất cao ở cây trồng. Kết quả áp dụng phân hữu cơ vi sinh của Sông Gianh đến sinh trưởng, phát triển và năng suất giống lúa Japonica ĐS3 tại huyện Hoằng Hoá, tỉnh Thanh Hóa cho năng suất thực thu 7,32 tấn/ha và hiệu quả kinh tế đạt cao nhất là 20,50 triệu đồng/ha (Nguyễn Thị Vân và cs., 2011). Theo Vũ Văn Thức (2024) cho biết, hàng năm, nhu cầu sử dụng phân bón tại Việt Nam là rất lớn, trên 11 triệu tấn/năm, trong đó phân bón hóa học chiếm khoảng 75% gấp ba lần mức trung bình toàn cầu.

1.6. Thực trạng phát triển cây trồng ngô, lúa và ứng dụng công nghệ sinh học trong sản xuất nông nghiệp tại tỉnh Thái Nguyên

Đất đai của Thái Nguyên chủ yếu là đồi núi (chiếm đến 85,80% tổng diện tích tự nhiên). Diện tích đất đã sử dụng là 246.513 ha (chiếm 69,22% diện tích quỹ đất tự nhiên), đất chưa sử dụng là 109.669 ha (chiếm 30,78%). Trong tổng số đất chưa sử dụng có 1.714 ha đất có khả năng sản xuất nông nghiệp và 41.250 ha đất có khả năng sản xuất lâm nghiệp, diện tích đất phì nhiêu, màu mỡ, đầy đủ dinh dưỡng và chủ động hệ thống tưới tiêu đều được sử dụng gieo trồng lúa nước và cây ngô.



Hình 1.3. Sơ đồ phạm vi, ranh giới tỉnh Thái Nguyên

(Nguồn: Báo cáo tổng hợp quy hoạch tỉnh Thái Nguyên thời kỳ 2021-2030, tầm nhìn đến năm 2050)

Theo báo cáo của Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn tỉnh Thái Nguyên (nay là Sở Nông nghiệp và Môi trường tỉnh Thái Nguyên) (2024) nhằm hoàn thành các chỉ tiêu phát triển sản xuất nông, lâm nghiệp và thủy sản năm 2024 góp phần thực hiện hoàn thành các mục tiêu, nhiệm vụ tại Nghị quyết số 10-NQ/TW ngày 21/10/2019 và Nghị quyết của Hội đồng nhân dân tỉnh số 15/2020/NQ-HĐND ngày 11/12/2020 thông qua đề án phát triển sản

phẩm nông nghiệp chủ lực tỉnh Thái Nguyên 2021-2025. Kế hoạch năm 2024 giá trị sản xuất nông, lâm nghiệp, thủy sản tăng 3,5% trở lên trong đó: Tổng sản lượng lương thực 434.790 tấn bao gồm 363.620 tấn thóc, 71.170 tấn ngô. Để đạt được chỉ tiêu trên nhiệm vụ trong trồng trọt:

Cây lúa: Diện tích gieo trồng 66.260 ha, năng suất 5,488 tấn/ha, sản lượng 363.620 tấn, trong đó: vụ Xuân 28.130 ha, sản lượng 157.120 tấn; vụ mùa 38.130 ha, sản lượng 206.500 tấn.

Cây ngô: Diện tích gieo trồng 14.590 ha, năng suất 4,878 tấn/ha, sản lượng 71.170 tấn. Trong đó: vụ Đông - xuân năm 2023-2024: 10.320 ha, sản lượng 50.030 tấn; vụ mùa 4.270 ha, sản lượng 17.210 tấn.

Trong bối cảnh xu hướng toàn cầu hướng tới nông nghiệp bền vững và giảm thiểu tác động tiêu cực đến môi trường, việc sử dụng phân bón hữu cơ vi sinh đã trở thành một giải pháp quan trọng. Phân bón hữu cơ vi sinh không chỉ giúp cải thiện chất lượng đất mà còn tăng năng suất và chất lượng nông sản, đồng thời giảm thiểu sự phụ thuộc vào phân bón hóa học. Trong những năm gần đây, tỉnh Thái Nguyên đã đẩy mạnh ứng dụng công nghệ sinh học vào sản xuất nông nghiệp, đặc biệt là trong việc sử dụng phân bón hữu cơ sinh học, chế phẩm vi sinh và thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) sinh học đối với các loại cây trồng như rau màu, cây chè và cây lương thực. Theo bản tin khuyến nông của Trung tâm khuyến nông, Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn tỉnh Thái Nguyên (nay là sở Nông nghiệp và Môi trường Thái Nguyên) số 01 năm 2024, diện tích sử dụng phân bón hữu cơ vi sinh tại tỉnh đã tăng đáng kể trong những năm gần đây. Năm 2023, diện tích đất nông nghiệp sử dụng phân bón hữu cơ vi sinh đạt khoảng 15% tổng diện tích đất canh tác. Theo báo cáo số 264/BC-KHCN của Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Thái Nguyên ngày 29/11/2024:

Đối với cây chè – cây chủ lực của Tỉnh

Tỉnh Thái Nguyên đã triển khai nhiều đề tài nghiên cứu và mô hình thực nghiệm sử dụng phân bón hữu cơ sinh học, chế phẩm vi sinh trong sản xuất chè, cụ thể:

- Đề tài nghiên cứu ứng dụng chế phẩm sinh học khử rêu và phòng trừ bệnh trong sản xuất chè theo tiêu chuẩn hữu cơ, gắn với chuỗi giá trị. Mô hình được triển khai trên diện tích 10ha tại xã Phúc Trù (TP. Thái Nguyên) và xã Văn Hán (Đồng Hỷ) và đã được cấp chứng nhận sản phẩm hữu cơ theo TCVN 11041-6:2018. Mô hình giúp nâng cao chất lượng, sản lượng chè và tăng thu nhập từ 15–20% so với phương pháp canh tác thông thường.

- Đề tài nghiên cứu và sử dụng chế phẩm vi sinh xử lý dư lượng thuốc BVTV trong đất trồng chè. Kết quả đạt được: Tổ hợp 6 chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy các loại thuốc BVTV thuộc nhóm lân hữu cơ, Clo hữu cơ và carbamate; sản xuất được 1.000 kg chế phẩm vi sinh (mật độ 10^8 CFU/g); xây dựng 3 mô hình xử lý đất tồn dư thuốc BVTV, giảm đến 80% dư lượng hoạt chất độc hại.

- Đề tài nghiên cứu phân bón lá vi lượng sinh học như nano đồng, oligochitosan, xanthan và vi lượng đất hiếm. Các công thức bón phân kết hợp này đã được chứng minh tăng hàm lượng chất hòa tan, tanin và đậm tổng số trong sản phẩm chè.

Đối với rau màu và cây trồng ngắn ngày

Tại nhiều hợp tác xã và nông hộ, tỉnh đã triển khai các mô hình sản xuất rau an toàn có sử dụng phân bón hữu cơ sinh học và chế phẩm vi sinh.

- Hợp tác xã nông sản an toàn Ôn Lương (Phú Lương) sản xuất hơn 100 tấn phân hữu cơ vi sinh mỗi năm từ phụ phẩm nông nghiệp như rơm rạ, phân gà... cung cấp cho vùng trồng rau và chè liên kết.

- HTX chăn nuôi bò và dịch vụ sản xuất nông nghiệp Nga My (Phú Bình) sản xuất hơn 100 tấn phân trùn quế mỗi năm từ phân bò. Phân này được cung cấp cho các HTX sản xuất rau an toàn, cây ăn quả và chè.

Các mô hình này không chỉ góp phần giảm lượng phân hóa học mà còn cải thiện kết cấu đất, nâng cao độ phì nhiêu, tăng khả năng giữ nước và cải thiện độ tơi xốp cho đất.

Đối với cây lúa và cây ngô

Mặc dù các mô hình sử dụng phân bón hữu cơ sinh học cho lúa và ngô chưa được phổ biến rộng, nhưng bước đầu đã có nhiều tín hiệu tích cực:

- Tại xã Kim Phượng (Định Hóa), Phú Lương và Đồng Hỷ, mô hình sản xuất lúa hữu cơ đã được triển khai trên diện tích 250 ha với hơn 1.353 hộ tham gia. Các hộ được tập huấn và hỗ trợ phân bón hữu cơ vi sinh, thuốc BVTV sinh học. Năng suất lúa hữu cơ đạt khoảng 58–60 tạ/ha, giá bán cao hơn từ 20–30% so với lúa thông thường.

- Các địa phương như Đồng Hỷ và TP. Thái Nguyên cũng đã thử nghiệm mô hình ngô chuyển gen kết hợp sử dụng phân bón hữu cơ sinh học. Kết quả sơ bộ cho thấy tăng năng suất 12–15%, giảm sâu bệnh và hạn chế tồn dư hóa chất.

Sử dụng phân bón hữu cơ vi sinh tại Thái Nguyên đang dần trở thành một xu hướng quan trọng trong sản xuất nông nghiệp hữu cơ, phát triển bền vững theo đề án phát triển sản xuất và sử dụng phân bón hữu cơ đến năm 2030 tầm nhìn đến năm 2050 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (nay là Bộ Nông nghiệp và Môi trường) tại Quyết định số 5190/QĐ-BNN-BVTV ngày 07/12/2023, trong đó nhấn mạnh thúc đẩy sản xuất các chế phẩm sinh học, vi sinh vật sử dụng trong sản xuất phân bón hữu cơ, đến năm 2030 sản xuất phân bón hữu cơ lên 5 triệu tấn/năm, sử dụng phân bón hữu cơ chiếm tối thiểu 30% so với tổng lượng phân bón sử dụng trong sản xuất nông nghiệp

Mặc dù còn nhiều khó khăn và thách thức, nhưng với những lợi ích rõ rệt và triển vọng tích cực về ứng dụng công nghệ sinh học đóng vai trò quan

trọng trong việc cải thiện chất lượng đất, tăng năng suất và chất lượng nông sản, đồng thời bảo vệ môi trường. Việc nâng cao nhận thức, hỗ trợ tài chính và kỹ thuật, phát triển công nghệ và xây dựng chuỗi cung ứng bền vững là những giải pháp cần thiết để thúc đẩy việc sử dụng các sản phẩm sinh học trên địa bàn tỉnh Thái Nguyên.

1.7. Nhận xét rút ra từ nghiên cứu tổng quan

Trong nông nghiệp hiện đại, việc thay thế dần phân bón hóa học bằng các giải pháp sinh học an toàn và bền vững là yêu cầu tất yếu. Phân hữu cơ vi sinh đặc biệt là những sản phẩm chứa các chủng vi sinh vật có khả năng cố định nitơ (N_2) và sinh tổng hợp indole-3-acetic acid (IAA) đang được chứng minh là có tiềm năng lớn trong cải thiện năng suất, chất lượng nông sản và bảo vệ môi trường.

Tại Việt Nam, hiệu quả của phân bón hữu cơ vi sinh cũng được nhiều nhà khoa học xác nhận, trong đó Ngô Thanh Phong và cs. (2011); Văn Thị Phương Như và Cao Ngọc Điệp (2014) đã chứng minh sử dụng phân hữu cơ vi sinh có thể thay thế 50 - 75% lượng phân đạm trong canh tác, cải thiện chất lượng hạt và giúp tăng năng suất 23,9%. Phạm Văn Toàn (2017), cho biết sử dụng phân HCVS đa chủng, chức năng có khả năng gia tăng sinh khối và năng suất cây trồng ngay cả khi giảm 10 - 30% lượng dinh dưỡng khoáng N, P.

Azospirillum và *Azotobacter* là các vi sinh vật sống hội sinh và tự do trong vùng rễ cây trồng có khả năng cố định nitơ và tổng hợp kích thích sinh trưởng thực vật (Orr và cs., 2011, Phạm Văn Toàn, 2017). Theo Trần Văn Chí và cs. (2024), việc ứng dụng các vi sinh vật cố định nitơ, tổng hợp IAA có hoạt lực cao đã góp phần nâng cao năng suất cây trồng cho địa phương. Nguyễn Thị Thu Hằng và Nguyễn Thị Thủy (2015) đã phân lập thành công một số chủng *Azotobacter* phục vụ sản xuất phân HCVS cho cây ngô và xác

định mật độ tối ưu khi bón khoảng 5×10^6 CFU/g. Zhang và cs. (2023) nhấn mạnh vai trò của các vi sinh vật hữu ích trong việc cải thiện sức khỏe đất và tăng sức đề kháng của cây trồng. Tại Ấn Độ, Pawar và Suryawanshi (2022) khẳng định sử dụng phân bón sinh học từ vi sinh vật có thể thay thế phân bón hóa học để giúp tăng sản lượng cây lúa. Với cây ngô, Patel và cs. (2022) ghi nhận mức tăng năng suất ngô tới 18%.

Trong lộ trình định hướng đến năm 2050, Việt Nam phấn đấu trở thành quốc gia tỷ lệ sử dụng phân bón hữu cơ đạt 50% diện tích canh tác Đảng và Nhà nước đã ban hành nhiều chính sách nhằm thúc đẩy sản xuất và sử dụng phân bón hữu cơ như Quyết định số 885/QĐ-TTg ngày 23/6/2020 của Thủ tướng Chính phủ, theo đó tăng tỷ lệ sản phẩm phân bón hữu cơ trong tổng sản phẩm phân bón lên 15% năm 2025; Quyết định 5190/QĐ-BNN-BVTV ngày 07/12/2023 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (nay là Bộ Nông nghiệp và Môi trường) với mục tiêu đến 2030 sản xuất phân bón hữu cơ của các cơ sở sản xuất đủ điều kiện lên 5 triệu tấn/năm, sử dụng phân bón hữu cơ chiếm tối thiểu 30% so với tổng lượng phân bón sử dụng trong sản xuất nông nghiệp. Do vậy với ý nghĩa thực tiễn trên đề tài ***“Nghiên cứu vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và tổng hợp IAA cho một số cây trồng tại Thái Nguyên”*** góp phần bảo vệ môi trường, giảm thiểu sự phụ thuộc vào phân bón hóa học, tiết kiệm chi phí sản xuất cho người nông dân.

Chương 2

NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

a. Đối tượng nghiên cứu

- Một số chủng vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA được phân lập từ các đối tượng: đất trồng (lúa, cà chua, ngô, lạc, chè), rễ lạc, rễ đậu tương tại 10 địa phương: Thái Nguyên, Tuyên Quang, Yên Bái, Vĩnh Phúc, Cao Bằng, Hà Giang, Hà Nội, Bắc Cạn, Lạng Sơn và Bắc Giang.

- Giống lúa SUMO - giống lúa thuần, trồng nhiều ở Thái Nguyên, thời gian sinh trưởng: 105–110 ngày, được cung cấp bởi Công ty Cổ phần tư vấn và Đầu tư phát triển Nông nghiệp Việt Nam.

- Giống ngô lai đơn F1 biến đổi gen NK4300, đang được trồng phổ biến ở Thái Nguyên, cung cấp bởi Công ty Cổ phần tư vấn và Đầu tư phát triển Nông nghiệp Việt Nam.

b. Phạm vi nghiên cứu

- Phạm vi không gian: Phân lập, tuyển chọn, định danh một số chủng vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA từ các đối tượng: đất trồng, rễ cây tại một số tỉnh/ thành phố Hà Nội, trung du, miền núi phía Bắc. Các thí nghiệm sinh lý, hóa sinh và sinh học được triển khai tại phòng thí nghiệm công nghệ lên men, phòng thí nghiệm sinh học phân tử - Trường Đại học Nông lâm, Đại học Thái Nguyên. Các thí nghiệm đồng ruộng được triển khai tại xã Hợp Thành và xã Kha Sơn, tỉnh Thái Nguyên.

- Phạm vi thời gian: Số liệu điều tra thứ cấp, các kết quả nghiên cứu, đánh giá hiệu quả được thực hiện trong giai đoạn 2021 - 2024.

2.2. Nội dung nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA

+ Phân lập một số chủng vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA.

- + Sàng lọc một số chủng tiềm năng về hoạt tính cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA.
- + Xác định đặc điểm hình thái một số chủng vi sinh vật đã qua sàng lọc.
- + Định danh một số chủng vi sinh vật dựa trên giải trình tự gen 16SrRNA.
- + Nghiên cứu khả năng tương tác giữa một số chủng đã sàng lọc.

2.2.2. Nghiên cứu đặc điểm sinh học của một số chủng tuyển chọn

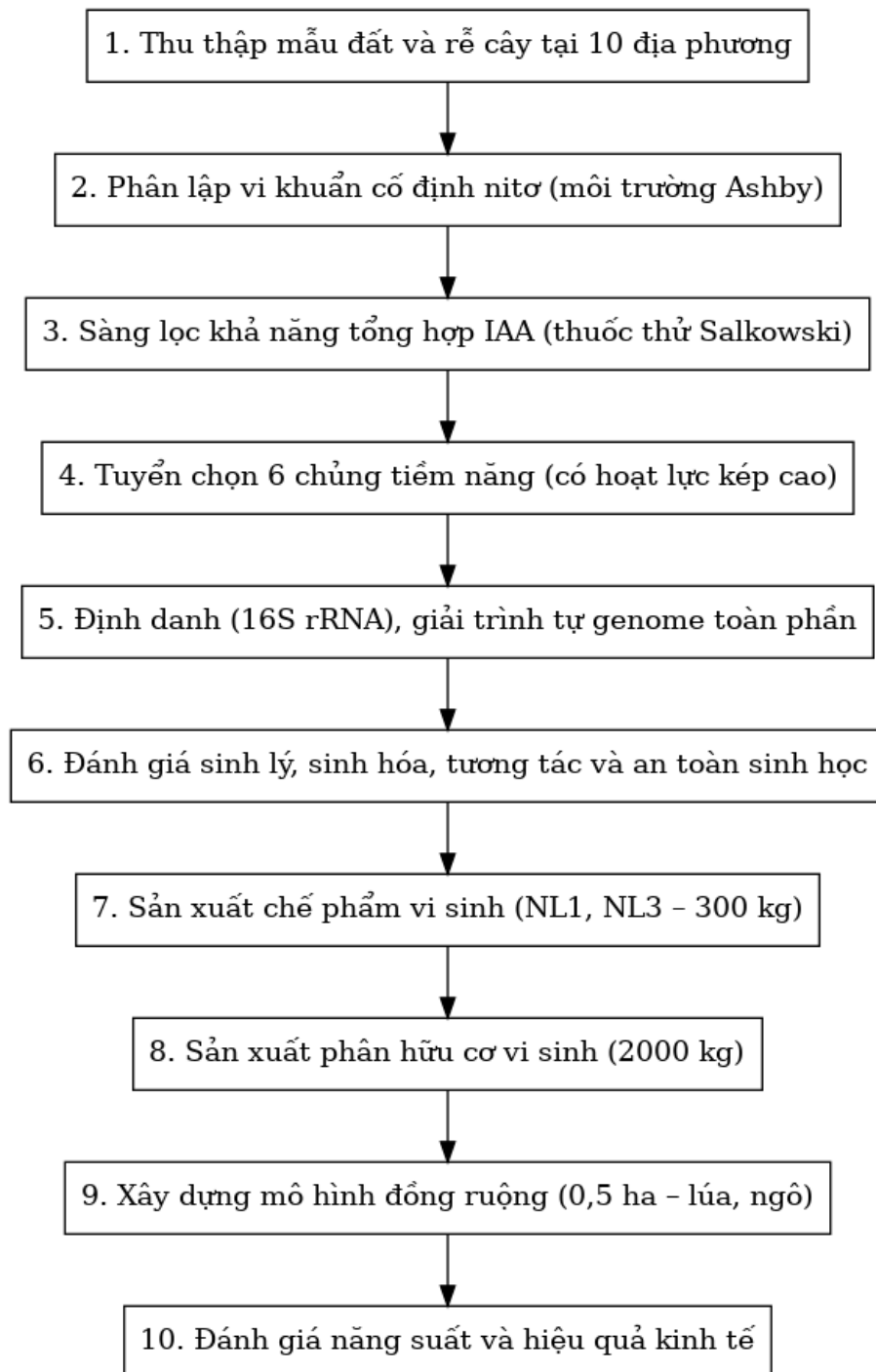
- + Đánh giá đặc điểm sinh lý của một số chủng vi sinh vật đã được tuyển chọn.
- + Tối ưu điều kiện (thời gian, nhiệt độ, pH) nuôi tăng sinh một số chủng tuyển chọn.
- + Đánh giá đặc điểm sinh hóa của một số chủng vi sinh vật đã được tuyển chọn.
- + Đánh giá đặc điểm di truyền của một số chủng tuyển chọn.
- + Đánh giá an toàn sinh học của 2 chủng vi sinh vật tuyển chọn.

2.2.3. Sản xuất phân hữu cơ vi sinh từ một số chủng vi sinh vật tuyển chọn

- + Sản xuất chế phẩm vi sinh.
- + Sản xuất phân hữu cơ vi sinh.
- + Nghiên cứu ảnh hưởng của liều lượng sử dụng phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa và cây ngô.

2.2.4. 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)

- + Đánh giá năng suất mô hình sử dụng phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa và ngô.
- + Đánh giá hiệu quả kinh tế mô hình sử dụng phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa và ngô.



Hình 2.1. Sơ đồ khái quát quy trình nghiên cứu của luận án

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật có khả năng cố định Nito và sinh tổng hợp IAA

2.3.1.1. Thu thập số liệu thứ cấp

Tiến hành thu thập các tài liệu có sẵn từ các cơ quan quản lý trong tỉnh Thái Nguyên như: Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (nay là Sở Nông nghiệp và Môi trường), Sở Khoa học và Công nghệ, Chi cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật, Trung tâm khuyến nông tỉnh Thái Nguyên. Các số liệu thu thập bao gồm:

- Bản đồ vị trí địa lý tỉnh Thái Nguyên năm 2023 tỷ lệ 1/100.000
- Điều kiện tự nhiên, kinh tế xã hội của tỉnh Thái Nguyên
- Thực trạng các cây trồng nông nghiệp: cây lúa, cây ngô tỉnh Thái Nguyên

2.3.1.2. Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật có khả năng cố định nito và sinh tổng hợp IAA

** Phương pháp thu mẫu:*

+ Đối với mẫu đất trồng lúa và hoa màu: lấy mẫu đất tuân theo hướng dẫn của Tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN 7538 - 6:2010). Mẫu đất sau khi được lấy đưa vào túi zip nylon, zip kín lại và đánh dấu từng mẫu rõ ràng, rãnh mạch, thể hiện được thời gian, địa điểm khu vực lấy mẫu. Các mẫu được đưa vào hộp chứa mẫu đảm bảo tránh các tác nhân ánh sáng, điều kiện môi trường khắc nghiệt và được chuyển về phòng thí nghiệm.

+ Đối với rễ có nốt sần cây họ đậu: lựa chọn và cắt lấy những đoạn rễ có nốt sần của cây họ đậu, khử trùng bề mặt bằng cồn (70%) trong 3 phút,

hypocloride 1% trong 3 phút, hydrogen peroxide trong 3 phút và rửa lại với nước cất vô trùng 4 lần (Nguyễn Thị Minh Thu và cs., 2017). Các mẫu được cho vào túi đưa vào túi Zip liong, zip kín lại, ghi thông tin về mẫu và vận chuyển về phòng thí nghiệm như mẫu đất.

Phân lập một số chủng vi sinh vật từ các mẫu thu thập trên môi trường chọn lọc cho khả năng cố định nitơ phân tử và tổng hợp IAA.

Sử dụng phương pháp Koch để phân lập vi sinh vật có khả năng cố định nitơ trên môi trường Ashby thạch đĩa, cụ thể:

- + Xử lý mẫu rễ: lấy 10g mẫu rễ, nghiền nhỏ với 10 ml nước cất vô trùng.
- + Xử lý mẫu đất: hòa tan 10g mẫu đất trong 90 ml nước cất vô trùng
- + Chuẩn bị môi trường phân lập: Môi trường thạch Ashby (g/L):
 Manitol: 20, K_2HPO_4 : 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,2; NaCl: 0,2; K_2SO_4 : 0,1; $CaCO_3$: 5; nước cất 1 lít, được khử trùng đổ vào các đĩa petri và các ống tạo thạch nghiêng, để nguội trong tủ nuôi, sau 48 giờ nếu môi trường không bị nhiễm thì có thể dùng để cấy vi sinh vật.
- + Cấy vi sinh vật: Dùng que cấy đầu tròn nhúng vào dung dịch của đất và rễ đã được xử lý ở trên, cấy ria lên môi trường thạch đĩa Ashby đã chuẩn bị sẵn, nuôi ủ ở $30^\circ C$ trong 24 -72h cho đến khi hình thành khuẩn lạc.

+ Phân lập: Dùng que cấy tách các khuẩn lạc riêng rẽ trong đĩa thạch cấy vào các ống thạch nghiêng có môi trường Ashby đã chuẩn bị sẵn, nuôi ủ ở 30°C trong 24-72h cho đến khi vi sinh vật mọc đều theo các đường cấy thì đem cất giữ bảo quản lạnh.

2.3.1.3. Phân tích chỉ tiêu chất lượng

- *Phân tích định tính:*

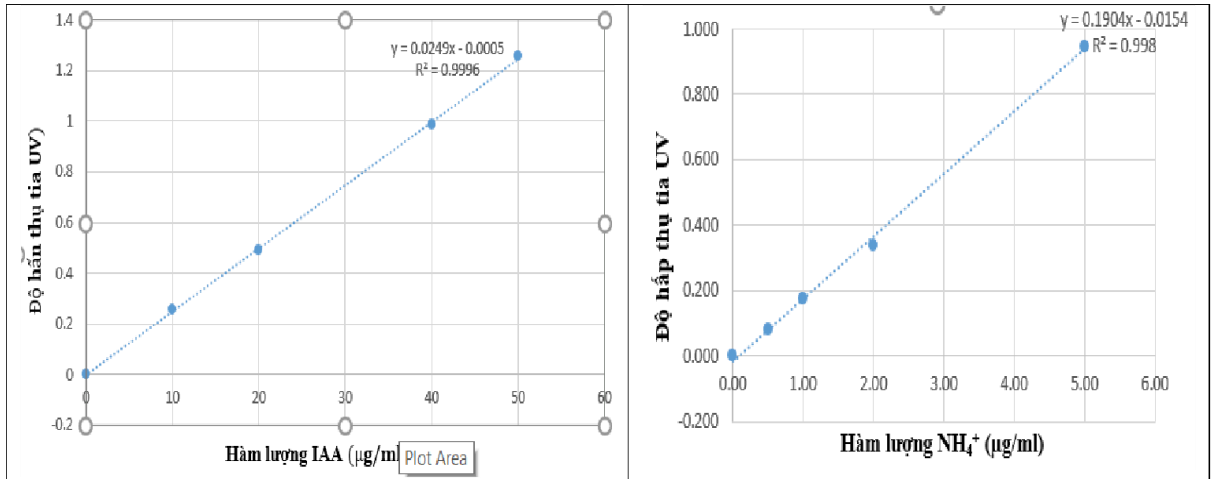
+ Phương pháp xác định nitơ

Sử dụng phương pháp Koch để phân lập vi khuẩn có khả năng cố định N trên môi trường Ashby thạch đĩa. Đếm số lượng tế bào vi khuẩn bằng phương pháp đếm gián tiếp thông qua số lượng khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch đĩa. Quan sát hình thái tế bào bằng phương pháp nhuộm đơn (Phạm Thị Ngọc Lan, 2012).

+ Phương pháp xác định khả năng sinh tổng hợp IAA

Định tính khả năng sinh tổng hợp IAA của vi khuẩn bằng cách bổ sung thuốc thử Salkowski vào dịch nuôi cấy một số chủng vi khuẩn, dịch nuôi sẽ chuyển sang màu đỏ nếu có IAA (TCVN10784:2015)

- *Phân tích định lượng:* Vi khuẩn được nuôi trong môi trường lỏng Ashby có bổ sung 0,1% tryptophan, nuôi lắc 180 vòng/phút ở 30°C trong 6 ngày. Hàm lượng IAA thô sinh ra trong dịch nuôi được xác định bằng phương pháp phản ứng màu với thuốc thử Salkowski tạo ra sản phẩm có màu, so màu trên máy quang phổ ở bước sóng 530 nm. Dựa vào đồ thị chuẩn IAA (hình 2.2) sẽ xác định được hàm lượng IAA (Glickmann và Dessaux, 1995).



Hình 2.2. Đồ thị chuẩn IAA

Hình 2.3. Đồ thị chuẩn NH_4^+

Phương pháp định lượng khả năng cố định nitơ (NH_4^+): Nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường nuôi cấy Ashby lỏng, nuôi lắc 180 vòng/phút ở 30°C trong 6 ngày. Ly tâm thu dịch trong và xác định nồng độ NH_4^+ được cố định bởi chủng vi khuẩn trong dịch nuôi bằng phương pháp so màu với thuốc thử Nessler (Nguyễn Thị Thu Hằng và Nguyễn Thị Thủy, 2015), sử dụng đường chuẩn ammonium (hình 2.3).

Xác định đặc điểm sinh hóa của chủng tuyển chọn bằng kit API (ZYM, 32GN, 20NE) của Biomérieux được hướng dẫn bởi nhà sản xuất.

2.3.1.4. Nghiên cứu đặc điểm hình thái tế bào, khuẩn lạc và tính chất nhuộm Gram

Phương pháp tiến hành theo Nguyễn Thị Thu Hằng và Nguyễn Thị Thủy (2015). Hoạt hóa và nhân giống một số chủng đã được phân lập trong các ống nghiệm chứa 5 - 10 ml môi trường Ashby lỏng, nuôi lắc ở 30°C cho đến khi tạo dịch huyền phù có mật độ vi sinh vật đạt 10^8 CFU/ml. Hút 100 µl dịch huyền phù cấy trải đều trên môi trường Ashby thạch đĩa, ủ ở 30°C trong 72 giờ. Khi khuẩn lạc phát triển trên bề mặt đĩa thạch, tiến hành quan sát và miêu tả hình thái khuẩn lạc gồm màu sắc, hình dạng, dạng bìa khuẩn lạc, độ nổi và kích thước khuẩn lạc được mô tả theo phương pháp của Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Thị Mộng Huyền (2015). Sau đó làm tiêu bản soi dưới kính

hiển vi để quan sát và mô tả hình thái tế bào của vi sinh vật. Nhuộm Gram theo phương pháp của Phạm Thị Ngọc Lan (2012), quan sát dưới kính hiển vi để kết luận chủng vi sinh vật nghiên cứu là Gram âm hay Gram dương.

2.3.1.5. Phương pháp tách chiết DNA tổng số của vi khuẩn

Chủng tuyển chọn 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, được rửa 03 lần bằng nước cất vô trùng. DNA tổng số được tiến hành tách chiết theo phương pháp của Sambrook và Russell (2001), được mô tả ngắn gọn như sau: 10 mg tế bào được hòa trong 0,5 ml đệm TE, tiếp đến 20 µl dung dịch SDS 10% (Sodium dodecyl sulfate) và 10 µl proteinase K (20 mg/ml) được bổ sung và trộn đều, ủ 30°C trong 30 phút. Tiếp đến, 15 µl lysozyme (10 mg/ml) và 5 µl ribonuclease (5 mg/ml) được trộn đều vào mẫu, ủ tiếp trong 60 phút. Tiếp đến, 100 µl NaCl 5M và 80 µl CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) 10% NaCl (1:1 v/v) được bổ sung, ủ trong 10 phút ở 65°C. Hỗn hợp dung môi phenol/chloroform/iso-amyl alcohol (25/24/1, v/v/v) được bổ sung bằng với thể tích mẫu và khuấy đảo nhẹ trong 3 phút. DNA tổng số được thu nhận bằng cách bổ sung hai lần thể tích ethanol lạnh (-20°C) và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút.

2.3.1.6. Định danh đến loài chủng vi sinh vật dựa vào trình tự gen 16SrRNA

Sử dụng cặp mồi 27F AGAGTTTGATCMTGGCTCAG và 1492R TACGGYTACCTTGTTACGACTT (Lane, 1991) để nhân trình tự gen 16S rRNA của chủng tuyển chọn, với thành phần và điều kiện cho phản ứng PCR theo mô tả của Klindworth và cs. (2013). Trình tự gen 16S rRNA của chủng tuyển chọn được đọc trình tự thông qua hệ thống Applied Biosystems 3730 xl DNA analyzer sử dụng Big Dye terminator cycle sequencing kit v.3.1 (Macrogen, Hàn Quốc). Trình tự gen 16S rRNA của chủng tuyển chọn được so sánh với dữ liệu công bố trên EzTaxon (Chun và cs., 2007). Thiết lập cây

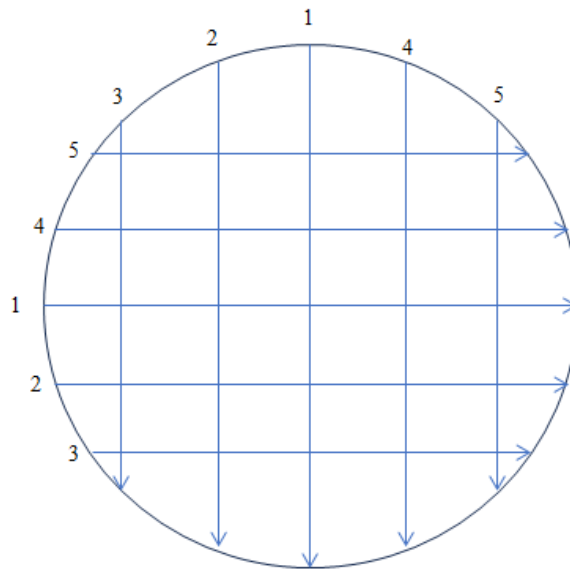
phả hệ từ các dữ liệu khoảng cách tiến hóa (evolution distance) theo Chun và cs. (2007) bằng cách sử dụng phương pháp Neighbor-joining (Kumar và cs., 2016). Tỷ lệ tương đồng về trình tự gen lớn hơn 98% và của chủng nào lớn nhất sẽ được lựa chọn là gần nhất. Đồng thời, vị trí phân loại của chủng phân lập được xây dựng bằng phần mềm MEGA 7.

2.3.1.7. Giải trình tự hệ gen vi sinh vật

DNA tổng số của một số chủng tuyển chọn sau khi tách chiết, tinh sạch được gửi đi giải trình tự hệ gen tại đơn vị cung cấp dịch vụ giải hệ gen KTEST. Việc giải trình tự hệ gen đã được thực hiện thông qua sử dụng công nghệ Illumina (Bennett, Solexa, 2004). Thư viện shotgun đã được xây dựng và giải trình tự bằng cách sử dụng nền tảng Illumina HiSeq 2000 đã tạo ra 7.620.202 Mb. Thông tin chi tiết về việc xây dựng và sắp xếp thư viện theo phương pháp mô tả tại trang web DOE-JGI (<http://www.jgi.doe.gov/>). Trình tự lắp ráp hệ gen của một số chủng NL1, NL3 từ trình tự Illumina và chuẩn bị thư viện đã được loại bỏ bằng cách chuyển tất cả dữ liệu trình tự Illumina thông qua DUK, chương trình lọc được phát triển bởi DOE-JGI (Mingkun và cs., 2015). Các lần đọc Illumina được lọc trước tiên được tập hợp bằng cách sử dụng Velvet (phiên bản 1.2.07) (Zerbino và Birney, 2008) và 1-3 kb mô phỏng các lần đọc kết thúc được ghép nối đã được tạo từ các đường viền Velvet bằng cách sử dụng wgsim (phiên bản 0.3.0) (<https://github.com/lh3/wgsim>). Các lần đọc Illumina sau đó được lắp ráp với các cặp đọc mô phỏng bằng cách sử dụng Allpaths-LG (phiên bản r46652) (Gnerre và MacCallum, 2011).

2.3.1.8. Đánh giá khả năng tương tác của một số chủng vi sinh vật

Một số chủng tiềm năng được thử hoạt tính đối kháng lẫn nhau bằng phương pháp cấy vạch cắt nhau trên cùng một đĩa môi trường thạch như miêu tả tại hình, nuôi ở 30°C trong 48 giờ (Hoa Thị Minh Tú và cs., 2021).



Hình 2.4. Cách cấy vạch trên đĩa thạch

2.3.2. Đánh giá đặc điểm sinh học của một số chủng tuyển chọn

2.3.2.1. Đánh giá đặc điểm sinh lý của một số chủng vi sinh vật đã được tuyển chọn

- Hoạt hóa chủng giống: Một số chủng giống tuyển chọn bảo quản trong điều kiện lạnh được hoạt hóa bằng nuôi cấy trong ống nghiệm chứa 5ml môi trường thạch LB (g/L): peptone: 10, cao nấm men: 5, NaCl: 5, nước 1 lít, pH $7,0 \pm 0,2$ ở 30°C trong 24h (Đỗ Quang Trung và cs., 2022).

- Cấy chuyển dịch nuôi cấy vi sinh vật đã hoạt hóa sang các ống nghiệm chứa 5ml môi trường lỏng Ashby. Mỗi ống nghiệm cấy chuyển 200 μl dịch huyền phù. Nuôi cấy lắc ở 30°C . Xác định mật độ tế bào trong dịch nuôi cấy sau 1, 2, 3,9 ngày nuôi cấy bằng phương pháp đo giá trị OD ở bước sóng 610 nm, đồng thời xác định mật độ tế bào bằng kỹ thuật cấy trải đĩa thạch theo TCVN 9716:2013. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, lấy giá trị trung bình. Từ mật độ tế bào thu được xây dựng đường cong sinh trưởng theo thời gian của quần thể vi sinh vật.

2.3.2.2. Tối ưu điều kiện (thời gian, nhiệt độ, pH) nuôi một số chủng tuyển chọn

- Hoạt hóa giống trong môi trường LB như miêu tả ở trên sau 24 giờ cấy chuyển vào bình tam giác có sẵn môi trường Ashby lỏng, nuôi lắc 120 vòng/phút ở các mức nhiệt độ khác nhau (28°C - 42°C (bước nhảy 2°C)) nuôi trong 5 ngày. Xác định mật độ tế bào bằng phương pháp đo OD ở bước sóng 610 nm từ đó xác định được nhiệt độ phù hợp cho sự sinh trưởng của một số chủng tuyển chọn. Thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần.

- Đánh giá ảnh hưởng của pH nuôi cấy: Hoạt hóa giống như mô tả ở trên và nhân sinh khối một số chủng tuyển chọn trên môi trường Ashby lỏng, nuôi lắc 120 vòng/phút ở mức nhiệt độ phù hợp đã khảo sát ở trên, pH được thiết kế ở các mức nhau dao động từ pH 4 đến pH 9 (bước nhảy 0,5) trong 5 ngày. Xác định mật độ tế bào bằng phương pháp đo OD ở bước sóng 610 nm từ đó xác định được pH phù hợp cho sự sinh trưởng của một số chủng tuyển chọn. Thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần.

- Tối ưu hóa điều kiện (thời gian, nhiệt độ, pH) nuôi cấy 2 chủng: sử dụng phần mềm design expert (DX 7.1.5), thiết kế thử nghiệm bằng mô hình

Box-Behnken và phân tích mô hình bằng ANOVA để xác định tương tác giữa các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nuôi cấy một số chủng tuyển chọn.

2.3.2.3. *Đánh giá đặc điểm sinh hóa của một số chủng vi sinh vật đã được tuyển chọn*

Bao gồm: khả năng lên men các loại đường thay thế (D-arabinose, D-xylose, D-fructose, lactose và shaccharose...), thử nghiệm khả năng sinh indole, sinh catalase, khả năng oxy hóa khử, thử nghiệm KIA, TSI.

- Xác định khả năng lên men các loại đường của một số chủng tuyển chọn sử dụng bộ kit API. Quy trình được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Thử nghiệm khả năng oxy hóa - lên men, thử nghiệm khả năng sinh catalase, khả năng sinh oxydase, phản ứng Methyl đỏ, phản ứng Voges-Proskauer, khả năng sinh indole, thử nghiệm KIA, TSI của một số chủng tuyển chọn theo hướng dẫn ban hành kèm theo Quyết định số 1539/QĐ-BYT ngày 20/4/2017 của Bộ trưởng Bộ Y tế.

2.3.2.4. *Đánh giá đặc điểm di truyền của một số chủng tuyển chọn*

a. Phân tích sơ bộ cấu trúc hệ gen của vi sinh vật

Dữ liệu giải trình tự thô được tinh sạch bằng công cụ fastp v0.23.1 (Chen và cs., 2018). Các nucleotide có chất lượng giải không tốt, không đáng tin cậy hoặc không xác định được (nucleotide loại N) sẽ bị loại bỏ dựa vào giá trị Phred-score ghi nhận ở từng nucleotide. Các read sau khi được “tinh sạch” sẽ được lắp ráp de novo bằng công cụ Unicycler v0.4.8 (Ryan và cs., 2017) và pipeline flye-medaka-polca (Krasnov và cs., 2020). Kết quả từ 2 phương pháp sẽ được so sánh và chọn ra assembly tốt nhất để chú giải. Chất lượng lắp ráp de novo được đánh giá thông qua công cụ Quast v5.2.0 (Gurevich và cs., 2013) và việc sắp giống cột cục bộ các read lên các contig lắp ráp được. Điều

này cho phép phát hiện các vùng có giá trị độ phủ sâu thấp bất thường so với các vùng lân cận, đây là các vùng cần được lưu ý trong kết quả lắp ráp. Cuối cùng, công cụ check M v1.2.1 (Parks và cs., 2015) được dùng để kiểm tra chất lượng và độ hoàn chỉnh của kết quả lắp ráp. Bản lắp ráp sau đó sẽ được chú giải bằng hệ chú giải PATRIC v3.6.12 (Davis và cs., 2020) với CSDL chuyên biệt cho chi vi khuẩn mục tiêu. PATRIC sử dụng bộ công cụ RASTtk để chú giải các trình tự contig. PATRIC còn liên kết với các database KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) để chú giải mở rộng chức năng và con đường chuyển hóa (Wattam và cs., 2014).

Để xác định sự hiện diện của các gene liên quan đến con đường cố định nitrogen và sinh tổng hợp Indole 3 acetic acid (IAA), các gene chức năng được mã hóa lên cơ sở dữ liệu trao đổi chất KEGG bằng công cụ KEGG Mapper tool của PATRIC thông qua mã KEGG được PATRIC chú giải (Kanehisa và cs., 2016). Dữ liệu thu được bao gồm sơ đồ con đường chuyển hóa và file fasta tương ứng chứa trình tự các gene mã hóa coenzyme, cofactor và enzyme liên quan.

b. Xác định gen chức năng liên quan đến cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA

Căn cứ vào thông tin hệ gen đã giải trình tự để phân tích trình tự các gen, vị trí gen, trình tự promoter, bằng các phần mềm tin sinh học chuyên dụng. Trên cơ sở đó, tiến hành xác định sự hiện diện của các gen chức năng bằng phương pháp PCR.

Kiểm tra sự có mặt của các gen liên quan đến khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA bằng phản ứng PCR:

- Tách chiết và tinh sạch DNA tổng số bằng phương pháp như đã mô tả ở trên.

Thiết kế các cặp mồi đặc hiệu với các vùng gen chức năng để nhận diện sự có mặt của các gen chức năng bằng phản ứng PCR (mỗi gen ít nhất một cặp mồi đặc hiệu). Dựa trên trình tự các gen liên quan đến khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA, chúng tôi tiến hành thiết kế các cặp mồi đặc hiệu

để khuếch đại vùng gen liên quan bằng các công cụ tin sinh Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Mỗi có chiều dài 20 nucleotide theo chiều 5'-3' xuôi và ngược khuếch đại vùng gen cố định nito và sinh tổng hợp IAA có kích thước từ 236 bp đến 873 bp ở một số chủng vi khuẩn tương ứng (bảng 3.3). Trình tự mỗi được kiểm tra độ đặc hiệu bằng công cụ BLAST trên ngân hàng gen NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Phản ứng PCR được thực hiện ở thể tích 20 µl sử dụng kit EZ PCR mix của hãng Phusa với quy trình theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Phusagenomics.com/product). Chu trình phản ứng PCR được thực hiện ở 35 chu kỳ bao gồm các bước: 94°C/40s; 55°C/30s; 72°C/30s.

Bảng 2.1. Thành phần phản ứng PCR

STT	Thành phần	Thể tích
1	EZ PCR mix	14 µl
2	Primer for	1 µl
3	Primer rev	1 µl
4	DNA	1 µl
5	dH ₂ O	3 µl
Total		20 µl

Sản phẩm PCR được điện di trên gel Agarose 1% sử dụng thang DNA chuẩn GeneRuler DNA ladder mix.

2.3.2.5. *Đánh giá an toàn sinh học của 2 chủng vi sinh vật tuyển chọn*

Trong nghiên cứu này, mức độ an toàn sinh học 02 chủng vi khuẩn được xác định đồng thời các dữ liệu sau:

(i) Kết quả lại hệ genome và nhận diện trình tự gen 16S rRNA:

Trình tự 16S rRNA của một số chủng vi sinh vật tuyển chọn so sánh trình tự gen 16S rRNA với các dữ liệu chủng/loài chuẩn đã công bố trên EzBioCloud Database (<https://www.ezbiocloud.net/>) về mức độ đảm bảo an

toàn sinh học. Từ đó kết luận đánh giá tỷ lệ % tương đồng của chủng tuyển chọn với một số chủng có sẵn đã được công bố về mức độ đảm bảo an toàn sinh học.

Đồng thời, genome của chủng vi sinh vật tiềm năng được lai DDH (DNA-DNA hybridization) với trình tự genome của chủng chuẩn gần nhất thông qua phần mềm GGDC v3.0 (Genome-to-Genome Distance Calculator v3.0) (<https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>). Dựa vào kết quả lai DDH để phân loại tới loài (Jan và cs., 2013) cụ thể: (i) Nếu giá trị DDH > 70%: Loài đã công bố; (ii) Nếu giá trị DDH < 70%: Loài/chỉ mới theo (Auch và cs., 2010).

(ii) Xác định độc tố thông qua genome:

Độc tố của các chủng vi khuẩn (nếu có) được xác định thông qua phân tích trình tự genome sử dụng dữ liệu TAdfinder 2.0 (<https://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/TADB3/TAdfinder.php>) (Shao và cs., 2011) để đánh giá an toàn sinh học cho các chủng vi khuẩn nghiên cứu. Nếu chủng vi khuẩn sản sinh độc tố sẽ được so sánh với dữ liệu GRAS (Generally Recognized As Safe) (<https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/gras-substances-scogs-database>).

2.3.3. Sản xuất phân hữu cơ vi sinh từ một số chủng vi sinh vật tuyển chọn

2.3.3.1. Sản xuất chế phẩm vi sinh

Chế phẩm vi sinh được sản xuất theo quy trình mã số MREC-QTCN-2022-02 của Trung tâm Môi trường Tài nguyên Miền núi ban hành theo quyết định số 32/QĐ-TTMTTNMN ngày 28 tháng 03 năm 2023 về sản xuất chế phẩm vi sinh vật chứa một số chủng tuyển chọn, cụ thể:

a. Dụng cụ, thiết bị, nguyên vật liệu chính

- Dụng cụ, thiết bị : Nồi hấp, tủ ẩm, tủ cấy vi sinh, máy cất nước, cân điện tử, tủ lạnh, máy lắc ngang, máy đo OD (UV-VIS), máy ly tâm đến 10.000 vòng/phút, kính hiển vi, hệ thống lên men, máy sấy, hệ thống khay

Falcon 50 ml chứa môi trường dinh dưỡng - môi trường PGB dạng lỏng đã được thanh trùng ở 121°C trong 25 phút. Để ngang ống và nuôi lắc, tốc độ lắc đảm bảo 180-200 vòng/phút. Nuôi trong 5 ngày, khi dịch nuôi cấy thành dạng huyền phù, tiến hành đo độ đục (OD) bước sóng 610 nm để xác định mật độ tế bào đảm bảo $\geq 10^8$ CFU/ml thì quá trình hoạt hóa kết thúc.

Bước 2: Kiểm tra độ thuần và hoạt tính của chủng

- Sau khi thu được dịch huyền phù từ bước hoạt hóa giống gốc, tiến hành kiểm tra độ thuần và hoạt tính cố định nitơ của giống bằng cách cấy ria trên môi trường Ashby vô đạm thạch đĩa đã được thanh trùng ở 121°C trong 30 phút. Nếu các khuẩn lạc mọc riêng rẽ và chỉ có 1 kiểu hình, màu sắc duy nhất thì chủng mới đảm bảo độ thuần. Đồng thời sự phát triển của giống vi sinh vật trên đĩa thạch chứa môi trường Ashby vô đạm chứng tỏ chủng giống sau hoạt hóa vẫn giữ được hoạt tính cố định nitơ.

- Kiểm tra hoạt tính sinh tổng hợp IAA của chủng giống bằng cách hút 2 ml dịch huyền phù sau khi hoạt hóa giống cấy vào 100 ml môi trường Ashby lỏng có bổ sung 0,1% L-Tryptophan, môi trường được thanh trùng ở 121°C trong 25 phút và để nguội trước khi cấy. Nuôi lắc ở nhiệt độ phòng, tốc độ lắc khoảng 180-200 vòng/phút, nuôi trong 5 ngày đến khi tạo dịch huyền phù. Dem dịch huyền phù đi ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút, hút 2 ml phần dịch bên trên rồi bổ sung 8 ml thuốc thử Salkowskii. Nếu dịch huyền phù làm đổi màu thuốc thử (từ vàng sáng sang màu hồng đến đỏ đậm chứng tỏ chủng vẫn giữ được hoạt tính sinh tổng hợp IAA).

Bước 3: Nhân giống cấp 1

Hút dịch huyền phù trong ống Falcon sau kích hoạt giống cấy vào bình tam giác 250 ml chứa môi trường dinh dưỡng - môi trường PGB dạng lỏng đã được thanh trùng ở 121°C trong 25 phút, tỷ lệ giống được cấy khoảng 2% và nuôi lắc. Tốc độ lắc đảm bảo 180-200 vòng/phút. Nuôi trong 3 ngày, khi dịch nuôi cấy thành dạng huyền phù, tiến hành đo độ đục (OD) bước sóng 610 nm

để xác định mật độ tế bào đảm bảo $\geq 10^8$ CFU/ml thì giai đoạn nhân giống cấp 1 kết thúc.

Bước 4: Chuẩn bị môi trường lên men nhân sinh khối trong nồi lên men 10 lít/mẻ (nhân giống cấp 2)

- Chuẩn bị môi trường PGB gồm các thành phần như sau:

Glucose	10g
KH ₂ PO ₄	0,8g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25g
NaCl	0,1g
CaCO ₃	0,5g
Peptone	0,5g
Nước cất	1000ml

10 lít môi trường PGB được hòa vào trong nồi lên men dung tích 15 lít, chuẩn pH về 6,5 đối với chủng *Azospirillum* sp.; 7,0 đối với chủng *Azotobacter* sp.; bổ sung dầu phá bọt rồi tiến hành thanh trùng ở nhiệt độ 121°C trong 30 phút. Sau khi thời gian thanh trùng kết thúc, thực hiện quá trình làm mát đến nhiệt độ phòng.

Bước 5: lên men (nhân giống cấp 2)

- Cấy giống khởi động: Tỷ lệ giống khởi động với chủng *Azospirillum* sp. và *Azotobacter* sp là 2%.

- Kết nối nồi lên men với hệ thống sục khí và dần dần mở van cấp khí;

- Bắt đầu tiến hành nuôi tăng sinh với các thông số cần kiểm soát: nhiệt độ 32°C đối với chủng *Azospirillum* sp.; 32°C đối với chủng *Azotobacter* sp.. Lưu lượng không khí cấp vào nồi lên men 0,7 lít không khí/lít môi trường/phút đối với chủng *Azospirillum* sp. và 0,9 lít không khí/lít môi trường/phút đối với chủng *Azotobacter* sp.

- Thời gian nuôi chủng *Azospirillum* sp. là sau 75 giờ, kiểm tra mật độ sinh khối của vi sinh vật bằng cách lấy một lượng mẫu nhỏ đi đo OD ở bước

sóng 610 nm. Nếu mật độ tế bào đảm bảo khoảng $6,5 \times 10^8$ CFU/ml thì đạt yêu cầu và kết thúc giai đoạn nuôi tăng sinh.

- Thời gian nuôi chủng *Azotobacter* sp. là sau 69 giờ, kiểm tra mật độ sinh khối của vi sinh vật bằng cách lấy một lượng mẫu nhỏ đi đo OD ở bước sóng 610 nm. Nếu mật độ tế bào đảm bảo khoảng $14,5 \times 10^8$ CFU/ml thì đạt yêu cầu và kết thúc giai đoạn nuôi tăng sinh.

Bước 6: Chuẩn bị môi trường và dụng cụ lên men xốp

- 50 kg cám gạo được sàng kỹ để loại bỏ tạp chất
- Khay inox được rửa sạch, sấy khô
- Thanh trùng cám gạo và khay inox ở 121°C trong 30 phút
- Kết thúc thanh trùng, cám được đổ ra khay inox và để nguội đến nhiệt độ phòng chờ cấy giống.

Bước 7: Cấy giống và nuôi vi sinh vật trên môi trường xốp

- Với chủng *Azospirillum* sp. và *Azotobacter* sp. lượng dịch giống cấp 2 bơm để cấy vào môi trường cám trong các khay inox khoảng 100 ml/kg môi trường.

- Chuẩn độ ẩm: bổ sung thêm nước (đã thanh trùng) vào môi trường và trộn thật đều để ở mọi điểm trong canh trường đạt độ ẩm 50% với chủng *Azospirillum* sp. và *Azotobacter* sp., rồi đậy nắp của khay inox.

- Nhiệt độ nuôi ở nhiệt độ 31,7°C với chủng *Azospirillum* sp.; 32,1°C với *Azotobacter* sp.

- Thời gian nuôi: 72 giờ với chủng *Azospirillum* sp. và 69 giờ với chủng *Azotobacter* sp.

Bước 8: Sấy chế phẩm

Sau khi giai đoạn nuôi cấy xốp kết thúc, canh trường được đem sấy ở nhiệt độ 37°C cho đến khi độ ẩm của chế phẩm đạt dưới 14%.

Bước 9: Bao gói

Chế phẩm được cho vào bao gói loại bao bì làm từ vật liệu có tráng nhôm và có mép zip, mỗi gói chứa 500 gam chế phẩm

Bước 10: Bảo quản chế phẩm

Chế phẩm sau khi hoàn thiện và được bao gói sẽ được xếp vào thùng caron, bảo quản ở nhiệt độ phòng và định kỳ kiểm tra mật độ tế bào sống sót để đảm bảo giống sản xuất đạt yêu cầu.

2.3.3.2. Sản xuất phân hữu cơ vi sinh

Phân hữu cơ vi sinh được sản xuất 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 hữu cơ vi sinh được đánh giá dựa trên các tiêu chuẩn quy định tại TCVN 7185:2002 về phân hữu cơ vi sinh vật, bao gồm các chỉ tiêu:

- + Độ chín (hoại) cần thiết
- + Kích thước hạt
- + Độ ẩm (%)
- + pH
- + Mật độ vi sinh vật tuyển chọn (CFU/g)
- + Hàm lượng chất hữu cơ tổng số (%)
- + Hàm lượng nitơ tổng số (%)
- + Hàm lượng kali hữu hiệu (%)
- + Mật độ *Salmonella* trong 25 gam mẫu (CFU/g)
- + Hàm lượng chì (mg/kg)
- + Hàm lượng cadimi (mg/kg)
- + Hàm lượng crom (mg/kg)
- + Hàm lượng niken (mg/kg)
- + Hàm lượng thủy ngân (mg/kg)

*** Quy trình sản xuất phân hữu cơ vi sinh**

a. Dụng cụ, thiết bị, nguyên vật liệu chính

- Dụng cụ, thiết bị : Máy băm nghiền nguyên liệu, máy trộn, máy sàng, cào, xẻng, cuốc, cân, nhiệt kế, ẩm kế, pH kế, thùng nhựa, bạt PE, nhà ủ có máy che.

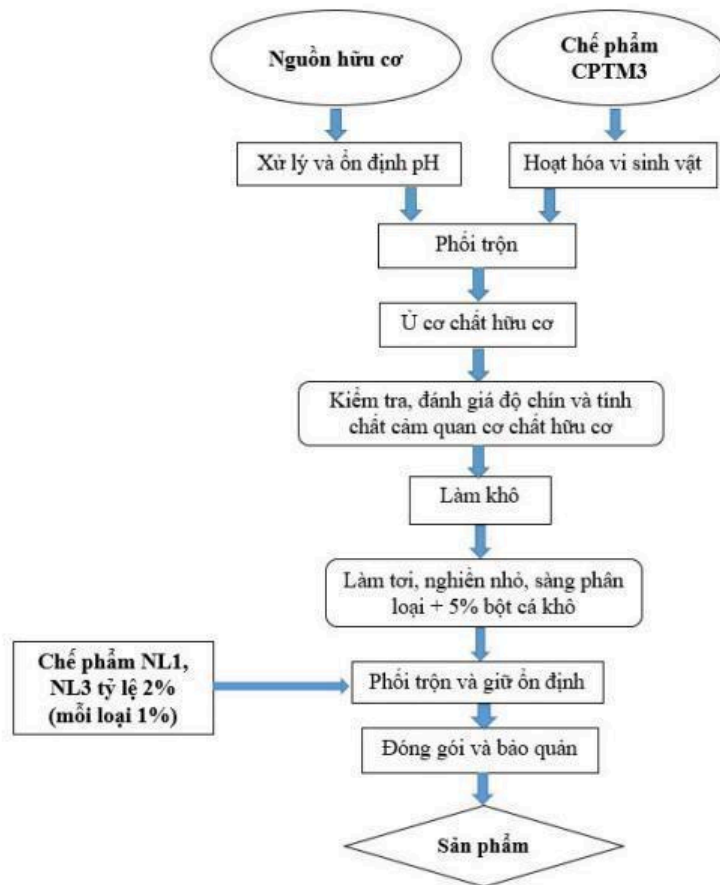
- Nguyên vật liệu chính :

+ Phân chuồng, than bùn, rơm rạ, bột cá, cám gạo, rỉ mật đường, nước sạch.

+ Chế phẩm thương mại (CPTM3) là chế phẩm có chứa các vi sinh vật phân giải xellulo có mật độ *Trichoderma.sp* $\geq 10^6$ CFU/g; *Bacillus.sp* $\geq 10^6$ CFU/g, *Streptomyces.sp* $\geq 10^6$ CFU/g.

+ Chế phẩm NL1 chứa chủng *Azospirillum sp.* $\geq 10^{10}$ CFU/g và NL3 chứa chủng *Azotobacter sp* $\geq 10^{10}$ CFU/g.

b. Sơ đồ quy trình sản xuất phân hữu cơ vi sinh chứa vi sinh vật cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA quy mô 400 kg/mẻ.



Hình 2.6. Sơ đồ quy trình sản xuất phân hữu cơ vi sinh chứa vi sinh vật cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA quy mô 400 kg/mẻ

c. Các bước sản xuất phân hữu cơ vi sinh chứa vi sinh vật cố định nito và sinh tổng hợp IAA quy mô 400 kg/mẻ

Bước 1: Thu gom nguyên liệu hữu cơ

Than bùn, phân chuồng và rơm rạ được thu gom và vận chuyển về địa điểm lựa chọn để ủ. Nơi ủ phải cao ráo, thoát nước, không gần đường đi lại. Sau đó, nguyên liệu được sàng lọc, loại bỏ đất, đá, rác vô cơ... và băm nhỏ để một số chủng vi sinh vật dễ dàng tiếp xúc và phân hủy. Đảm bảo khối lượng các nguyên liệu đưa vào ủ để thu hồi 400kg phân hữu cơ/mẻ như sau: Than bùn: 400 kg, phân chuồng: 200 kg, rơm rạ: 200 kg (tính theo độ ẩm chung của các nguyên liệu là 50%).

Bước 2: Xử lý và ổn định pH nguyên liệu

Kiểm tra pH của hỗn hợp nguyên liệu hữu cơ và sử dụng chất ổn định pH để đưa nguyên liệu về pH thích hợp cho vi sinh vật phát triển trong khoảng pH=6,0-8,0.

Bước 3: Hoạt hóa vi sinh vật trong chế phẩm phân hủy chất hữu cơ (CPTM3)

Vi sinh vật có trong chế phẩm phân giải chất hữu cơ (CPTM3) của Công ty TNHH Vật tư thương mại Hà Lan có một số chủng vi sinh (*Trichoderma.sp*, *Bacillus.sp*, *Streptomyces.sp*) có khả năng phân giải nhanh rơm rạ, phân chuồng, mùn.. được hoạt hóa bằng cách hòa tan trong nước sạch có bổ sung ri đường và 1 kg chế phẩm CPTM3 cho 2 m³ nguyên liệu ủ. Lượng nước tính toán sao cho vừa đủ để khi kết thúc quá trình phối trộn thì độ ẩm của khối phân ủ đạt khoảng 50%.

Bước 4: Phối trộn

Phối trộn than bùn, phân chuồng và rơm rạ (tỷ lệ 2:1:1) với dung dịch CPTM3 đã được hoạt hóa trong thiết bị, đảo trộn đều và đồng nhất. Bổ sung độ ẩm khối ủ để đạt khoảng 50%.

Bước 5: Ủ compost cơ chất hữu cơ

Sau phối trộn hỗn hợp nguyên liệu hữu cơ với chế phẩm phân hủy chất hữu cơ CPTM3, các vật liệu hữu cơ tiếp tục được đắp đống ủ theo kiểu hình thang, có chiều cao không quá 1 mét, bề rộng của đáy 1 mét, chiều dài đống ủ tùy theo kích thước của nhà ủ và lượng nguyên liệu sử dụng. Che đậy kín đống ủ bằng bạt nilon. Sau 2-3 ngày ủ, nhiệt độ đống ủ đã đạt trên 50°C. Các vi sinh vật phát triển mạnh sau 7-10 ngày ủ, trên bề mặt và trong đống ủ xuất hiện các sợi xạ khuẩn màu ghi sáng. Nhiệt độ đống ủ lúc này đạt trên 60°C thì cần tiến hành đảo trộn.

Tiến hành đảo trộn 3 lần: lần 1 sau 10 ngày, lần 2 sau 20 ngày và lần cuối sau 30 ngày kể từ thời điểm ủ. Trong quá trình đảo trộn, nếu thấy độ ẩm đống ủ bị giảm thì bổ sung nước bằng cách phun đều trên bề mặt và đảo trộn lại đống ủ.

Bước 6: Kiểm tra, đánh giá độ chín và tính chất cảm quan cơ chất hữu cơ

Sau 3 tuần ủ, nhiệt độ của đống ủ bắt đầu giảm xuống; sau 5-6 tuần ủ, nhiệt độ đống ủ tương đương với nhiệt độ môi trường. Khi kết thúc quá trình phân hủy, thể tích đống ủ giảm xuống một nửa so với ban đầu, phân ủ không còn nóng. Tiến hành đánh giá độ chín và các chỉ tiêu chất lượng của cơ chất hữu cơ.

- Độ chín được xác định bằng phương pháp đo nhiệt độ sản phẩm theo TCVN 7185-2002 hoặc phương pháp Plant test của Subrao, 1980. Tiến hành đo, ghi chép và theo dõi sự thay đổi về nhiệt độ trong thời gian 3 ngày liên tiếp, mỗi ngày đo một lần vào một thời điểm nhất định. Cơ chất hữu cơ bảo đảm độ chín khi nhiệt độ của khối cơ chất ủ không thay đổi trong suốt thời gian theo dõi.

- Thời gian xử lý cơ chất hữu cơ từ 6-8 tuần. Đánh giá cảm quan của cơ chất hữu cơ: dựa vào chỉ tiêu đánh giá như thành phần cơ giới (mùn, toi xóp), màu sắc (nâu đen) và mùi (không còn mùi hôi). Cơ chất hữu cơ có màu nâu sẫm là được.

Bước 7: Làm khô

Sử dụng nhiệt lượng từ mặt trời hoặc các biện pháp sấy khác nhau nhằm loại bỏ nước ra khỏi bán thành phẩm bằng các phương pháp phơi hoặc sấy nhẹ trong thời gian 3-4 giờ ở nhiệt độ không lớn hơn 40°C; độ ẩm đạt không vượt quá 30%.

Bước 8: Làm toí, nghiền nhỏ, sàng phân loại cơ chất hữu cơ

Sử dụng máy đánh toí tránh cho cơ chất có hiện tượng vón cục, đóng bánh... tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình nghiền sau này. Cơ chất hữu cơ tiếp tục được đưa vào máy nghiền để tạo ra kích thước đồng đều cho sản phẩm. Bán thành phẩm tiếp tục qua thiết bị sàng phân loại để loại bỏ tạp chất, đá, sỏi nhằm thu được sản phẩm cơ chất hữu cơ thô có kích thước đồng nhất theo yêu cầu và bổ sung 5% theo khối lượng bột cá khô.

Bước 9: Ủ cơ chất hữu cơ với hỗn hợp vi sinh vật đã được tuyển chọn

Hỗn hợp cơ chất hữu cơ sau khi xử lý từ than bùn + phân chuồng + rơm rạ theo tỷ lệ 2:1:1 được phối trộn với các loại chế phẩm vi sinh NL1 và NL3 tỷ lệ 2% (mỗi loại chế phẩm 1%).

Bước 10: Đóng gói và bảo quản sản phẩm

Sử dụng bao tải đũa có lót 01 lớp nilon bên trong. Cân định lượng sản phẩm (25 kg/bao) và may kín miệng bao, ghi ngày tháng năm sản xuất. Xếp các bao trong kho bảo quản đảm bảo đúng quy cách. Kho bảo quản sản phẩm phải được vệ sinh sạch sẽ, an toàn, phòng chống cháy nổ tốt, đảm bảo thoát nhiệt, ẩm, thông gió tốt, che chắn mưa và nắng. Định kỳ kiểm tra để theo dõi về mật độ tế bào vi sinh vật tuyển chọn (đảm bảo $\geq 10^6$ CFU/g).

2.3.3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của liều lượng phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa và cây ngô

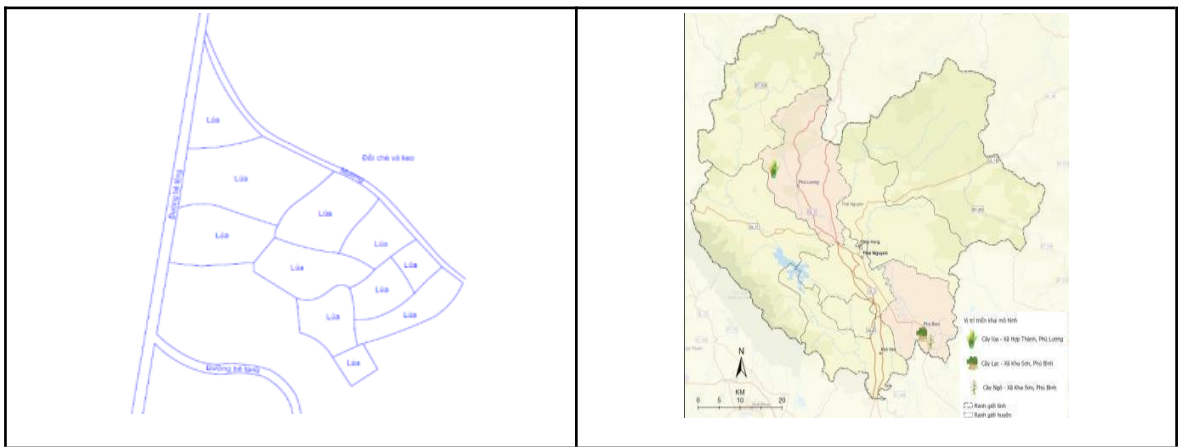
a. Nghiên cứu liều lượng phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa

** Thiết kế mô hình*

Mô hình được triển khai tại khu đất ruộng bằng, phẳng trung bình, chủ

động tưới của các hộ nông dân xã Hợp Thành, tỉnh Thái Nguyên. Người dân cùng tham gia thực hiện trực tiếp dưới sự giám sát và hướng dẫn kỹ thuật của nhóm nghiên cứu. Các diện tích triển khai mô hình trên cùng điều kiện (khí hậu, thời tiết, đất canh tác, ...) và chăm sóc (phân bón nền, nước tưới, BVTN, cây bừa,...) giống nhau.

Kỹ thuật bón phân, gieo trồng, chăm sóc, thu hoạch, hạch toán kinh tế thực hiện theo hướng dẫn của QCVN 01-55: 2011/BNNT đối với cây lúa. Sơ đồ triển khai mô hình được biểu thị tại hình 2.7.



Hình 2.7. Địa điểm và sơ đồ triển khai mô hình trồng lúa

- Giống lúa sử dụng cho các công thức: Giống lúa SUMO, là giống lúa thuần được người dân địa phương sử dụng rộng rãi, lúa có thời gian sinh trưởng từ 105-110 ngày, bằng thời gian sinh trưởng với các giống lúa thuần khác đang gieo cấy tại địa phương. Lúa có chiều cao cây trung bình (từ 115-120cm), cứng cây, bộ lá đứng có khả năng hồi xanh nhanh, đẻ nhánh khỏe, khả năng chống đổ, chống chịu sâu bệnh tốt. Chất lượng gạo giống lúa SUMO có màu sắc rất đẹp, dạng hạt gạo có màu trắng và bóng, cơm ngon, vị đậm. Là giống được UBND Tỉnh Thái Nguyên lựa chọn vào bộ chủng giống theo phương án sản xuất nông nghiệp hàng năm theo quyết định số 4130/QĐ-UBND Tỉnh Thái Nguyên ngày 27/12/2021.

** Bố trí thí nghiệm diện hẹp trên đồng ruộng cho cây lúa*

- Thí nghiệm xác định liều lượng phân hữu cơ gồm 5 công thức, gồm CT1, CT2, CT3, CT4 tương ứng với 4 mức liều lượng phân bón hữu cơ vi sinh từ kết quả nghiên cứu với liều lượng dùng khác nhau: 1 tấn; 1,5 tấn; 2,0 tấn; 2,5 tấn/ha và công thức đối chứng không sử dụng phân hữu cơ vi sinh, sử dụng phân chuồng theo phương pháp truyền thống của người nông dân và theo quy chuẩn khảo nghiệm (lượng dùng 8.000 kg/ha).

- Thí nghiệm bố trí theo khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh (RCB) 5 công thức với 3 lần nhắc lại, diện tích mỗi ô thí nghiệm là 30 m² (3m x 10m), khoảng cách giữa các ô là 0,4 m. Thí nghiệm được bố trí thử nghiệm trên 2 vụ lúa (vụ xuân và vụ mùa)

- Các loại phân bón nền theo đúng liều lượng được hướng dẫn tại quyết định số 726/QĐ-BNN-KN, ngày 24/2/2022 của Bộ Nông nghiệp và PTNT: 90 N + 70 P₂O₅ + 70 K₂O.

Bảng 2.2. Lượng phân bón trên các công thức

Đơn vị tính: tấn/ha

TT	Công thức	Liều lượng bón phân HCVS	Phân chuồng g	Nền phân bón		
				Phân đạm Ure	Phân lân Supe	Kali-clorua
1	Đối chứng (ĐC)	0 (bón phân theo tập quán địa phương)	8,000	0,196	0,424	0,117
2	CT1	1,0		0,196	0,424	0,117
3	CT2	1,5		0,196	0,424	0,117
4	CT3	2,0		0,196	0,424	0,117
5	CT4	2,5		0,196	0,424	0,117

Ghi chú: Nền NPK theo định mức kinh tế áp dụng định mức theo quy định tại quyết định số 726/QĐ-BNN-KN, ngày 24/2/2022 của Bộ Nông nghiệp và PTNT

- Phương pháp bón phân:

+ 100% lượng phân hữu cơ vi sinh/phân chuồng và phân lân được bón lót trước khi bừa cấy 10-14 ngày.

+ Bón thúc đẻ (bón thúc lần 1): Lúc 10% dành cái xuất hiện u lồi (nhú mầm) bón lượng phân đạm 50%, phân kali 50% kết hợp với làm cỏ sục bùn.

+ Bón thúc đòng (bón thúc lần 2): Bón trước khi cây lúa phân hoá đòng (30% dành thắt eo đầu lá), bón lượng phân đạm 50%, phân kali 50%.

** Các chỉ tiêu nghiên cứu và phương pháp theo dõi*

- Các chỉ tiêu và phương pháp theo dõi dựa vào QCVN 01-55: 2011/BNNT về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống lúa.

- Các chỉ tiêu về năng suất: Mỗi ô thí nghiệm lấy 10 khóm, tiến hành đo đếm các chỉ tiêu:

+ Số bông hữu hiệu/m²: Đếm số bông có ít nhất 10 hạt chắc của một cây.

Số cây mẫu: 5

+ Số bông/m² (A): Tính tất cả các bông có trong một m²

+ Số hạt/bông (B): Đếm tổng số hạt có trên bông, Số cây mẫu: 5

Số hạt chắc/bông

+ Tỷ lệ % hạt chắc/bông (C) = $\frac{\text{Số hạt chắc/bông}}{\text{Số hạt/bông}} \times 100$

+ Khối lượng 1.000 hạt (gam) (D): Cân 8 mẫu 100 hạt ở độ ẩm 14%, đơn vị tính gam, lấy một chữ số sau dấu phẩy

+ Năng suất lý thuyết (NSLT) (tạ/ha) = A x B x C x D x 10⁻⁴

+ Năng suất thực thu (NSTT) (tạ/ha) = Gặt toàn bộ ô thí nghiệm, tuốt lấy hạt, phơi khô đến độ ẩm 13 - 14 % quạt sạch rồi cân.

b. Nghiên cứu liều lượng phân hữu cơ vi sinh trên cây ngô

** Thiết kế mô hình*

Mô hình thí nghiệm được triển khai tại đất ruộng của các hộ nông dân xã Kha Sơn, tỉnh Thái Nguyên. Người dân thực hiện trực tiếp dưới sự giám sát và hướng dẫn kỹ thuật của nhóm nghiên cứu. Các diện tích triển khai mô hình

trên cùng điều kiện (khí hậu, thời tiết, đất canh tác, ...) và chăm sóc (phân bón nền, nước tưới, BVTN, cây bừa, ...) giống nhau.

Kỹ thuật bón phân, gieo trồng, chăm sóc, thu hoạch, hạch toán kinh tế thực hiện theo hướng dẫn của QCVN 01-56: 2011/BNNPTNT đối với cây ngô. Sơ đồ triển khai mô hình được biểu thị tại hình 2.8.



Hình 2.8. Địa điểm và sơ đồ triển khai mô hình trồng ngô

*** Bố trí thí nghiệm đồng ruộng cho cây ngô**

- Thí nghiệm xác định liều lượng phân hữu cơ gồm 5 công thức (đối chứng, CT1, CT2, CT3, CT4), các công thức nhắc lại 3 lần, bố trí theo kiểu khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh (RCB), các công thức có sự đồng nhất về điều kiện tự nhiên và điều kiện chăm sóc. Mỗi ô thí nghiệm trồng 4 hàng, tất cả các chỉ tiêu theo dõi trên 2 hàng giữa.

- Loại phân bón sử dụng cho thí nghiệm là phân bón hữu cơ vi sinh từ kết quả nghiên cứu được đưa vào với các liều lượng dùng khác nhau: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 tấn/ha được căn cứ theo tại QCVN 01-56: 2011/BNNPTNT về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống ngô; Quyết định số 726/QĐ-BNN-KN, ngày 24/2/2022 của Bộ Nông nghiệp và PTNT. Công thức đối chứng không sử dụng phân hữu cơ vi sinh, sử dụng phân chuồng theo phương pháp truyền thống của bà con (lượng dùng 8.000 kg/ha). Thí nghiệm được bố trí thử nghiệm trên 2 vụ (vụ xuân và vụ mùa) tại xã Kha Sơn, tỉnh Thái Nguyên.

- Các loại phân bón nền theo đúng liều lượng được hướng dẫn tại quyết định số 726/QĐ-BNN-KN, ngày 24/2/2022 của Bộ Nông nghiệp và PTNT áp dụng cho mô hình sản xuất ngô lai thương phẩm: $160N + 80 P_2O_5 + 85K_2O$

- Giống ngô sử dụng cho các công thức: NK4300 giống ngô biến đổi gen thừa hưởng được tất cả những đặc tính ưu việt từ của giống ngô lai đơn như: năng suất cao, ổn định, cứng cây, chịu hạn, chống đổ ngã cụ thể: hạt đá, màu sắc hạt đẹp, lá bi bao kín; giống có khả năng thích nghi rộng, chịu hạn và chống đổ tốt, bắp to, kết hạt tốt, năng suất cao, giống có thời gian sinh trưởng 105-115 ngày. Là giống được UBND Tỉnh Thái Nguyên lựa chọn vào bộ chủng giống theo phương án sản xuất nông nghiệp hàng năm theo quyết định số 4130/QĐ-UBND Tỉnh Thái Nguyên ngày 27/12/2021.

** Đặc tính của giống:*

- + Cây con khỏe, sinh trưởng mạnh, chống đổ tốt.
- + Thích hợp treo đèn ở vùng miền núi phía Bắc.
- + Lá bi bao kín bắp.
- + Bắp to, cùi nhỏ kết hạt tốt, đóng múp đầu.
- + Dạng hạt nửa đá, màu vàng cam đẹp.
- + Thích nghi rộng.
- + Tích trữ sau thu hoạch tốt.
- + Năng suất cao đạt 8-12 tấn /ha

** Ưu thế*

- + Năng suất cao, ổn định.
- + Cứng cây chịu hạn.

*** Thời gian sinh trưởng:** 105-115 ngày (miền Bắc).

Bảng 2.3. Liều lượng phân bón trên các công thức

Đơn vị tính: tấn/ha

TT	Công thức	Liều lượng bón phân HCVS	Phân chuồng	Nền phân bón
----	-----------	--------------------------	-------------	--------------

				Phân đạm Ure	Phân lân Supe	Kali-clor ua
1	Đối chứng (ĐC)	0 (bón phân theo tập quán địa phương)	8,000	0,347	0,485	0,142
2	CT1	1,0		0,347	0,485	0,142
3	CT2	1,5		0,347	0,485	0,142
4	CT3	2,0		0,347	0,485	0,142
5	CT4	2,5		0,347	0,485	0,142

*Ghi chú: Nền NPK theo định mức kinh tế Áp dụng định mức theo quy định tại
Quyết định số 726/QĐ-BNN-KN, ngày 24/2/2022 của Bộ Nông nghiệp và
PTNT*

- *Phương pháp bón phân:*

+ 100% lượng phân hữu cơ vi sinh/phân chuồng và phân lân được bón
lót trước khi làm đất ngô 10-14 ngày.

+ Bón thúc lần 1 khi ngô 4 - 5 lá: 1/4 lượng đạm + 1/2 lượng kali.

+ Bón thúc lần 2 khi ngô 8 - 9 lá: 1/2 lượng đạm + 1/2 lượng kali.

- Chăm sóc

+ Khi ngô 4 - 5 lá: Xới đất, bón thúc lần 1 và vun nhẹ quanh gốc.

+ Khi ngô 8 - 9 lá: Xới đất, bón thúc lần 2 và vun cao chống đổ.

- Phòng trừ sâu bệnh: Theo dõi phát hiện và phòng trừ sâu bệnh theo
hướng dẫn chung của ngành Bảo vệ thực vật cho từng mùa vụ.

- Thu hoạch: Khi ngô chín sinh lý (chân hạt có vết đen hoặc 75% số cây
có lá bị bắt đầu khô).

** Các chỉ tiêu nghiên cứu và phương pháp theo dõi*

Các chỉ tiêu theo dõi được tiến hành theo Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia
về Khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống ngô (QCVN
01-56-2011/BNNPTNT) của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, bao
gồm:

- Số bắp hữu hiệu/cây: Tổng số bắp hữu hiệu/tổng số cây hữu hiệu trên

ô. Đếm số bắp và số cây trong ô lúc thu hoạch.

- Chiều dài bắp (cm): Đo từ đáy bắp đến mút bắp, đo trên bắp thứ nhất của 10 cây mẫu/ công thức. Thực hiện ở ba lần nhắc lại.

- Đường kính bắp (cm): Đo ở giữa bắp, đo trên bắp thứ nhất của 10 cây mẫu/công thức. Thực hiện ở ba lần nhắc lại.

- Số hàng /bắp: Một hàng được tính khi > 5 hạt. Chỉ đếm bắp thứ nhất của cây mẫu.

- Hạt/hàng: Được đếm trên hàng hạt có chiều dài trung bình trên bắp. Chỉ đếm bắp thứ nhất của cây mẫu.

- Khối lượng 1.000 hạt (g): Đếm 2 mẫu, mỗi mẫu 500 hạt sau đó cân khối lượng của 2 mẫu, nếu khối lượng của mẫu nặng trừ đi khối lượng của mẫu nhẹ $< 5\%$ so với khối lượng trung bình của 2 mẫu thì khối lượng 1.000 hạt bằng tổng khối lượng của 2 mẫu.

- Khối lượng 1.000 hạt ở độ ẩm bảo quản (14%)

$$M_{1.000}(14\%) = \frac{M_{\text{hạt tươi}} \times (100 - A^0)}{100 - 14}$$

- Năng suất lý thuyết

$$\text{NSLT (tạ/ha)} = \frac{\text{Số cây/m}^2 \times \text{số bắp hữu hiệu/cây} \times \text{số hàng/bắp} \times \text{số hạt/hàng} \times \text{P}_{1.000}}{10.000}$$

- Năng suất thực thu :

$$\text{NSTT (tạ/ha)} = \frac{\text{Năng suất thực tế}}{\text{Diện tích trồng}}$$

2.3.4. 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)

2.3.4.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu sử dụng trong nghiên cứu gồm phân HCVS AZO-NL (từ kết quả nghiên cứu của đề tài), phân HCVS thương mại, phân chuồng hoai mục, phân bón NPK và các giống lúa, ngô, cụ thể như sau:

- Phân HCVS AZO-NL chứa chủng vi sinh vật cố định nitơ, tổng hợp IAA được phân lập từ đề tài nghiên cứu

- Phân HCVS thương mại chứa *Aspergillus sp*, *Azotobacter*, *Bacillus*... với mật độ mỗi chủng đạt 1×10^6 CFU/g; hàm lượng hữu cơ 15%, đạm tổng số (Nts) 2,5%, lân hữu hiệu (P_2O_5) 2,5%, kali hữu hiệu (K_2O) 2,5%.

- Giống lúa SUMO - giống lúa thuần, được trồng nhiều ở Thái Nguyên, thời gian sinh trưởng: 105–110 ngày.

- Giống ngô lai đơn F1 biến đổi gen NK4300, đang được trồng phổ biến ở Thái Nguyên.

2.3.4.1. Phương pháp nghiên cứu

Khảo nghiệm được bố trí với 3 công thức, mỗi công thức trên diện tích 0,5 ha, gồm:

Công thức 1 (Đ/C 1): Bón phân chuồng hoai mục.

Công thức 2 (Đ/C 2): Bón phân HCVS thương mại.

Công thức 3: Bón phân HCVS AZO-NL

Liều lượng phân bón nền sử dụng cho cây lúa: Nền ($90\text{ N} + 70\text{ P}_2\text{O}_5 + 70\text{ K}_2\text{O}$) + 8 tấn phân chuồng hoai mục/ha đối với công thức 1 (Đ/C 1); công thức 2 (Đ/C); công thức 3.

Liều lượng phân bón nền sử dụng cho cây ngô: Nền ($160\text{ N} + 80\text{ P}_2\text{O}_5 + 85\text{ K}_2\text{O}$) + 8 tấn phân chuồng hoai mục/ha đối với công thức 1 (Đ/C 1); công thức 2 (Đ/C 2) và công thức 3.

Kỹ thuật làm đất, gieo trồng, tưới nước, bảo vệ thực vật (BVTV) và các kỹ thuật canh tác khác được áp dụng theo quy trình phổ biến tại địa phương.

Theo dõi, đánh giá các chỉ tiêu cấu thành năng suất, năng suất lý thuyết, năng suất thực thu của lúa, ngô theo QCVN 01-55:2011/BNNPTNT: Khảo nghiệm giá trị canh tác và giá trị sử dụng của giống lúa và QCVN 01-56:2011/BNNPTNT: Khảo nghiệm giá trị canh tác và giá trị sử dụng của giống ngô.

Hiệu quả kinh tế sử dụng phân bón và so sánh hiệu quả kinh tế sử dụng phân bón khảo nghiệm so với phân bón đối chứng được thực hiện theo TCVN 12719:2019: Khảo nghiệm phân bón cho cây trồng hàng năm và hiệu quả kinh tế sử dụng phân bón được tính theo các công thức:

$$HQ_{kn}(\%) = \frac{(NS_{kn} - NS_n) \times G}{(C_{kn} - C_n)} \times 100 \quad (5)$$

$$HQ_{đc}(\%) = \frac{(NS_{đc} - NS_n) \times G}{(C_{đc} - C_n)} \times 100 \quad (6)$$

$$HQ_{ss}(\%) = \frac{HQ_{kn} - HQ_{đc}}{HQ_{đc}} \times 100 \quad (7)$$

Trong đó: NS_{kn} : năng suất cây trồng ở công thức khảo nghiệm, tính bằng kg/ha;

$NS_{đc}$: năng suất cây trồng ở công thức đối chứng, tính bằng kg/ha;

NS_n : năng suất cây trồng ở công thức nền, tính bằng kg/ha;

G : giá nông sản tại thời điểm kết thúc khảo nghiệm, tính bằng 1.000 đồng/kilôgam (1.000 đồng/kg);

C_{kn} , $C_{đc}$, C_n : chi phí cho phân bón khảo nghiệm, phân bón đối chứng, phân bón nền (*gồm chi phí lao động bón phân và mua phân bón, trong đó chi phí mua phân bón tính bằng lượng các loại phân bón sử dụng nhân với giá phân bón tương ứng*), tính bằng 1.000 đồng/ha/vụ;

HQ_{kn} : hiệu quả kinh tế sử dụng phân bón khảo nghiệm;

$HQ_{đc}$: hiệu quả kinh tế sử dụng phân bón đối chứng;

HQ_{ss} : hiệu quả kinh tế của phân bón khảo nghiệm so với phân bón đối chứng, tính bằng %.

Khảo nghiệm được thực hiện tại xã Hợp Thành, tỉnh Thái Nguyên đối với cây lúa và tại xã Kha Sơn, tỉnh Thái Nguyên đối với cây ngô năm 2024.

Bảng 2.4. Sơ bộ đánh giá hiệu quả của mô hình

Chỉ tiêu	Số lượng	Đơn giá (đ)	Thành tiền
Tổng thu năng suất (kg)			
Chi phí phân bón			
Chi phí lao động chăm sóc			
Các khoản chi khác			
Tổng thu - Tổng chi			

2.3.5. Phương pháp xử lý số liệu

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.

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập và tuyển chọn một số chủng vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA

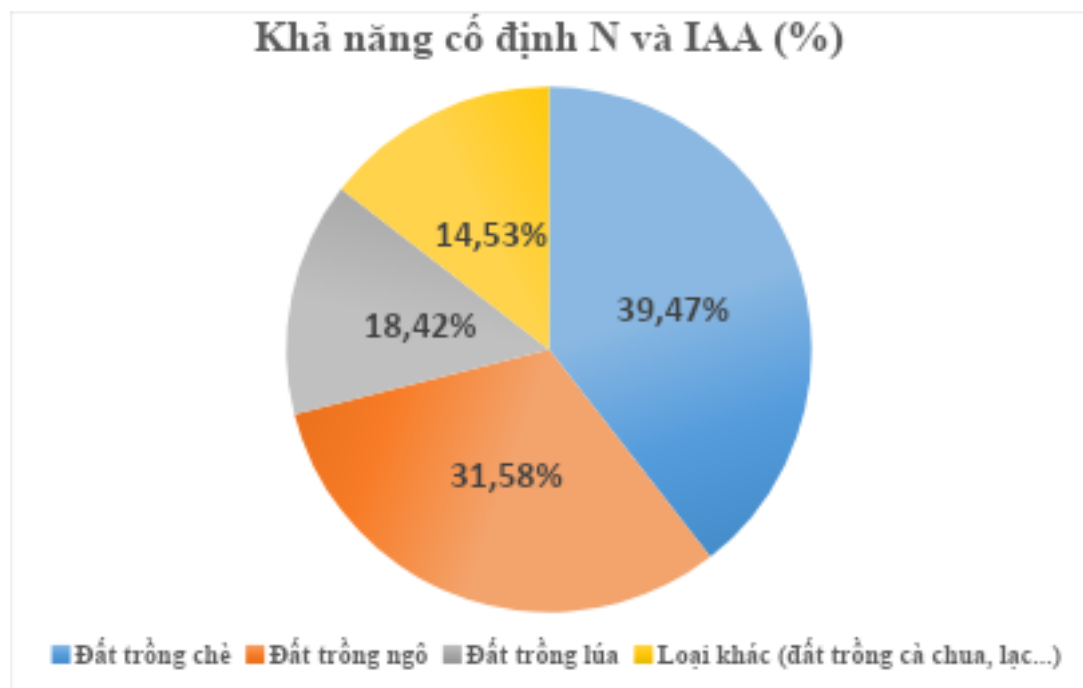
3.1.1. Kết quả phân lập một số chủng vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA

Để phân lập được một số chủng vi sinh vật có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA, tiến hành thu thập ngẫu nhiên 175 mẫu từ 7 đối tượng đất trồng (lúa, cà chua, ngô, lạc, chè); rễ lạc, rễ đậu tương tại 10 địa phương: Thái Nguyên, Tuyên Quang, Yên Bái, Vĩnh Phúc, Cao Bằng, Hà Giang, Hà Nội, Bắc Cạn, Lạng Sơn và Bắc Giang. Kết quả phân lập định tính thể hiện ở bảng 3.1.

Bảng 3.1. Kết quả phân lập một số chủng có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA

STT	Đối tượng lấy mẫu	Số mẫu thu thập	Địa điểm lấy mẫu	Số chủng phân lập	Số chủng cố định nitơ	Số chủng sinh IAA
1	Đất trồng lúa	10	Thái Nguyên	7	7	7
		6	Tuyên Quang	5	5	0
		5	Yên Bái	1	1	0
		7	Vĩnh phúc	3	3	0
2	Đất trồng cà chua	5	Cao Bằng	1	1	1
		5	Vĩnh Phúc	3	3	0
3	Đất trồng ngô	20	Thái Nguyên	12	11	11
		6	Hà Giang	1	1	1
		5	Hà Nội	3	3	0
		5	Vĩnh Phúc	4	4	0
4	Rễ lạc	7	Thái Nguyên	5	5	0
		5	Bắc Cạn	3	3	0

STT	Đối tượng lấy mẫu	Số mẫu thu thập	Địa điểm lấy mẫu	Số chủng phân lập	Số chủng cố định nitơ	Số chủng sinh IAA
		7	Lạng Sơn	2	2	0
		5	Vĩnh Phúc	1	1	0
		5	Thái Nguyên	2	2	0
5	Đất trồng lạc	7	Bắc Giang	3	3	0
		5	Vĩnh Phúc	1	1	1
		5	Thái Nguyên	1	1	0
6	Rễ đậu tương	5	Bắc Giang	1	1	1
		5	Bắc Cạn	1	1	1
		5	Lạng Sơn	2	2	0
		5	Vĩnh Phúc	1	1	0
		5	Thái Nguyên	1	1	0
7	Đất trồng chè	30	Thái Nguyên	15	15	15
		5	Bắc Giang	3	3	0
	Tổng mẫu	175		80	80	38



Hình 3.1. Sơ đồ kết quả phân lập một số chủng có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA

Kết quả bảng 3.1 và hình 3.1 cho thấy: Từ 175 mẫu phân lập trong môi trường chọn lọc đặc thù Ashby- vô đạm thu được 80 chủng vi sinh vật có khả năng cố định nitơ. Từ 80 chủng sinh trưởng tốt sẽ tiếp tục được sàng lọc khả năng tổng hợp IAA bằng phản ứng với thuốc thử Salkowski trong điều kiện nuôi cấy có bổ sung L-tryptophan cho kết quả 38 chủng (chiếm 47,5%) thể hiện đồng thời hai đặc tính cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA tập trung chủ yếu tại các mẫu thu thập từ đất trồng chè (39,47%); đất trồng ngô (31,58%); đất trồng lúa (18,42%); các mẫu từ rễ cây (rễ lạc, rễ đậu tương) và các loại đất trồng khác (đất trồng cà chua, đất trồng lạc) cho số lượng chủng vi sinh vật đồng thời thể hiện cả hai khả năng này ít hơn (14,53%). Từ kết quả phân lập trên có thể thấy tất cả các chủng có khả năng sinh IAA đều có khả năng cố định nitơ, nhưng không phải chủng nào có khả năng cố định nitơ cũng đồng thời sinh tổng hợp IAA. Do vậy, khả năng cố định nitơ là điều kiện cần nhưng chưa đủ để xác định khả năng sinh IAA ở một số chủng vi sinh vật phân lập được.

3.1.2. Sàng lọc một số chủng tiềm năng về hoạt cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA

Từ kết quả xác định định tính khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA đề tài tiếp tục nghiên cứu đánh giá định lượng để lựa chọn ra một số chủng vi sinh vật tiềm năng vừa có khả năng cố định nitơ vừa có khả năng sinh tổng hợp IAA. Kết quả đánh giá khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA của 38 chủng vi sinh vật phân lập được thể hiện trong bảng 3.2.

Bảng 3.2. Kết quả khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA của một số chủng vi sinh vật phân lập được

TT	Ký hiệu chủng	Khả năng cố định nitơ (NH ₄ ⁺) (µg/ml)	Khả năng tổng hợp IAA (µg/ml)
1	NL1	22,16 ^b	109,38 ^b
2	NL3	24,61 ^a	119,13 ^a
3	NL21	12,15 ^{fg}	30,68 ^{mn}

TT	Ký hiệu chủng	Khả năng cố định nitơ (NH ₄ ⁺) (µg/ml)	Khả năng tổng hợp IAA (µg/ml)
4	NL22	7,43 ^{jk}	11,33 ^u
5	NL23	5,25 ^l	29,16 ⁿ
6	NL24	14,64 ^e	70,91 ^f
7	NL235	4,78 ^{lmn}	11,39 ^u
8	NL247	3,24 ^{pq}	7,66 ^v
9	MN22	5,23 ^l	91,75 ^d
10	MN82	8,04 ^{lj}	61,95 ^h
11	MN86	3,97 ^{nop}	67,57 ^g
12	MN88	20,49^c	68,19^g
13	NL35	11,46 ^g	68,98 ^g
14	NL38	7,86 ^{jk}	35,42 ^l
15	NL321	15,84 ^d	72,68 ^e
16	NL335	9,47 ^h	26,35 ^o
17	NL338	12,61 ^f	56,78 ⁱ
18	NL324	4,32 ^{lmno}	18,88 ^q
19	NL341	8,92 ^{hi}	23,11 ^p
20	MN53	2,69 ^{qr}	8,96 ^v
21	MN21	3,48 ^{opq}	15,68 ^r
22	MN101	3,46 ^{opq}	26,67 ^o
23	VN41	1,38 st	23,45 ^p
24	MN42	20,08^c	105,57^c
25	MN43	3,12 ^{pq}	13,00 ^{tn}
26	MN44	0,89 ^t	5,60 ^w
27	MN46	4,68 ^{lmn}	13,96 st
28	MN47	20,41^c	101,89^c
29	MN48	4,11 ^{mnop}	15,79 ^r
30	MN50	6,92 ^k	32,04 ^m
31	MN51	7,84 ^{jk}	53,00 ^j
32	MN57	14,16 ^e	43,68 ^k
33	MN72	20,13^c	56,62ⁱ
34	MN73	8,12 ^{ij}	22,14 ^p
35	MN74	5,13 ^{lm}	14,88 ^{rs}

TT	Ký hiệu chủng	Khả năng cố định nitơ (NH ₄ ⁺) (µg/ml)	Khả năng tổng hợp IAA (µg/ml)
36	MN75	2,02 ^{rs}	8,22 ^v
37	MN76	6,98 ^k	16,47 ^r
38	MN107	2,53 ^{qr}	43,08 ^k

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $P \leq 0,05$

Kết quả đánh giá định lượng khả năng cố định nitơ (tổng hợp NH₄⁺) và sinh tổng hợp IAA của 38 chủng vi sinh vật phân lập được cho thấy: hàm lượng NH₄⁺ tổng hợp dao động từ 0,89 µg/ml (chủng MN44) đến 24,61 µg/ml (chủng NL3). Khả năng sinh tổng hợp IAA dao động từ 5,6 µg/ml (chủng MN44) và cao nhất là 119,13 µg/ml (chủng NL3).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết quả nghiên cứu của tác giả Samina và George (2006) trên vi khuẩn *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum* cho kết quả sinh tổng hợp IAA lần lượt 6,50 µg/mL và 16,80 µg/mL; Rodrigues và cs. (2016) tuyển chọn được 21 chủng có khả năng cố định nitơ từ 8 đến 24 µg/ml và 47 chủng sản sinh IAA từ 64,30 đến 127,84 µg/ml; Li và cs. (2017) đã tuyển chọn được 30 chủng vi sinh vật thuộc chi *Pseudomonas* cho kết quả sinh tổng hợp IAA dao động từ 13,12 đến 312,07 µg/mL trong môi trường có bổ sung tryptophan với nồng độ khác nhau và lượng nitơ được cố định 6,16 đến 108,30 µmol/ml; Nguyễn Thị Phương Oanh và cs., (2013) đã phân lập được 5 chủng vi sinh vật có lượng IAA giao động từ 28,63 µg/ml đến 42,13 µg/ml.

Theo kết quả nghiên cứu của Nguyễn Anh Huy và Nguyễn Hữu Hiệp (2018), Liu và cs. (2019), Myo và cs. (2019), Rodrigues và cs. (2016) về vi sinh vật cố định nitơ và tổng hợp IAA cho thấy, một số chủng được xếp vào nhóm tiềm năng về khả năng đồng thời cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA khi chúng tổng hợp được ≥ 20 µg/ml NH₄⁺ và ≥ 50 µg/ml IAA. Kết quả bảng 3.2.

cho thấy, có 14 chủng đã phân lập có khả năng tổng hợp IAA ≥ 50 $\mu\text{g/ml}$ và 06 chủng có khả năng cố định nitơ ≥ 20 $\mu\text{g/ml}$ (NH_4^+) bao gồm: NL1, NL3, MN88, MN42, MN47 và MN72. 6 chủng được xếp vào chủng tiềm năng đồng thời có khả năng cố định nitơ ≥ 20 $\mu\text{g/ml}$ và sinh tổng hợp IAA ≥ 50 $\mu\text{g/ml}$ được lựa chọn để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo

3.1.3. Đặc điểm hình thái một số chủng vi sinh vật đã qua sàng lọc

Để nhận diện 06 chủng vi sinh vật đã qua phân tích, tuyển chọn đề tài tiếp tục đánh giá đặc điểm hình thái của các chủng vi sinh vật bao gồm: đánh giá hình thái tế bào, hình thái khuẩn lạc và tính chất nhuộm gram. Kết quả trình bày tại bảng 3.3.

Bảng 3.3. Mô tả hình thái tế bào, hình thái khuẩn lạc và tính chất nhuộm Gram của một số chủng đã được sàng lọc

TT	Ký hiệu chủng	Hình thái khuẩn lạc	Hình thái tế bào	Tính chất nhuộm Gram	Khả năng di động
1	NL1	Tròn, trắng ngà đến trắng đục, lồi, gọn, bóng, nhầy nhớt	Ô van	-	+
2	NL3	Tròn, trắng ngà đến trắng xanh, lồi, gọn, nhầy nhớt	Que ngắn	-	+
3	MN88	Trắng ngà, tròn to, không rìa, lồi, nhẵn bóng	Que ngắn	+	+
4	MN42	Trắng sữa, tròn, lồi, dính, bề mặt bóng	Que ngắn	-	+
5	MN47	Trắng đục, lồi tròn, có chân giả, bóng, dính	Que ngắn	-	+

6	MN72	Trong, lõi tròn, bề mặt bóng, không rìa, nhót	Que ngắn	-	+
---	------	---	----------	---	---

Kết quả bảng 3.3. cho thấy, các khuẩn lạc cơ bản có màu trắng (trắng ngà, trắng đục, trắng sữa) chiếm 5/6 chủng (tỷ lệ 83,33%), 01/6 chủng có màu trong. Trong số 6 chủng sàng lọc thì có 5 chủng thuộc gram âm, duy nhất chủng MN88 thuộc gram dương, hình thái tế bào đa số có dạng que ngắn (5/6 chủng chiếm 83,33%), chỉ có 01 chủng NL1 có hình thái tế bào dạng ôvan. Cả 6 chủng đều có khả năng di động. Những đặc điểm này phù hợp với kết quả nghiên cứu của MacLean và cs., (2007) khi nghiên cứu tổng quan về một số chủng vi sinh vật cố định đạm và sinh tổng hợp IAA.

3.1.4. Định danh một số chủng vi sinh vật dựa trên giải trình tự gen 16SrRNA

Để đánh giá sự tương đồng của một số chủng vi sinh vật tuyển chọn với một số chủng đã được công bố trước đó, tác giả tiến hành định danh đến loài của 06 chủng vi khuẩn được tuyển chọn bằng chỉ thị phân tử dựa trên giải trình tự gen 16SrRNA và so sánh dữ liệu với một số chủng chuẩn đã công bố trên Eztaxon. Kết quả thể hiện trong bảng 3.4.

Bảng 3.4. So sánh sự tương đồng về trình tự gen 16SrRNA của 6 chủng vi sinh vật đã lựa chọn với các loài gần nhất công bố trên dữ liệu Eztaxon

TT	Chủng nghiên cứu	Loài gần nhất	Mức độ tương đồng (%)
1	NL1	<i>Azospirillum lipoferum</i> NCIMB 11861 ^T (Z29619)	99,36
2	NL3	<i>Azotobacter vinelandii</i> IAM 15004 ^T (AB175657)	100,00

3	MN88	<i>Bacillus tropicus</i> N24 ^T (MACG01000025)	99,20
4	MN72	<i>Agrobacterium deltaense</i> YIC 4121 ^T (MRDI01000025)	99,85
5	MN47	<i>Flavobacterium anhuiense</i> D3 ^T (EU046269)	99,86
6	MN42	<i>Stenotrophomonas pavanii</i> DSM 25135 ^T (LDJN01000038)	99,93

Kết quả so sánh trình gen 16S rRNA của chủng NL1 có kích thước 1500 bp cho thấy sự tương đồng cao nhất (99,36%) với chủng *Azospirillum lipoferum* NCIMB 11861^T (Z29619), 98,56% với *Azospirillum palustre* B2^T (DQ787330) và 98,04% với *Azospirillum humicireducens* SgZ-5^T (CP015285) và 97,66 - 97,81% với chủng khác của chi *Azospirillum*. Đối với chủng NL3, trình tự gen 16 S rRNA (kích thước 1377 bp) bộc lộ sự tương đồng 100% với *Azotobacter vinelandii* IAM 15004^T (AB175657), 98,01% với chủng *Azotobacter salinestris* ATCC 49674^T (AB175656), 97,51% với *Azotobacter nigricans* subsp. *nigricans* IAM 15005^T (AB175651) và từ 96,18-97,32% với một số chủng khác thuộc chi *Azotobacter*. Chủng MN88 (kích thước gen 16S rRNA 1466 bp) có mức độ tương đồng 99,20% với *Bacillus tropicus* N24^T (MACG01000025), 99,13% với *Bacillus wiedmannii* FSL W8-0169^T (LOBC01000053), 99,05% với *Bacillus cereus* ATCC 14579^T (AE016877). Chủng MN72 (kích thước gen 16S rRNA 1435 bp) có mức độ giống nhau 99,85% với *Agrobacterium deltaense* YIC 4121^T (MRDI01000025), 99,62% với *Agrobacterium cucumeris* O132^T (MW256423), 99,54% với *Agrobacterium radiobacter* ATCC 19358^T (AJ389904). Chủng MN47 có kích thước gen 16S rRNA 1384 bp, bộc lộ sự tương đồng cao nhất (99,86%) với *Flavobacterium anhuiense* D3^T (EU046269), 98,03% với *Flavobacterium tistrianum* GB 56.1^T (KT223144), 97,75% với *Flavobacterium tagetis* GN10^T

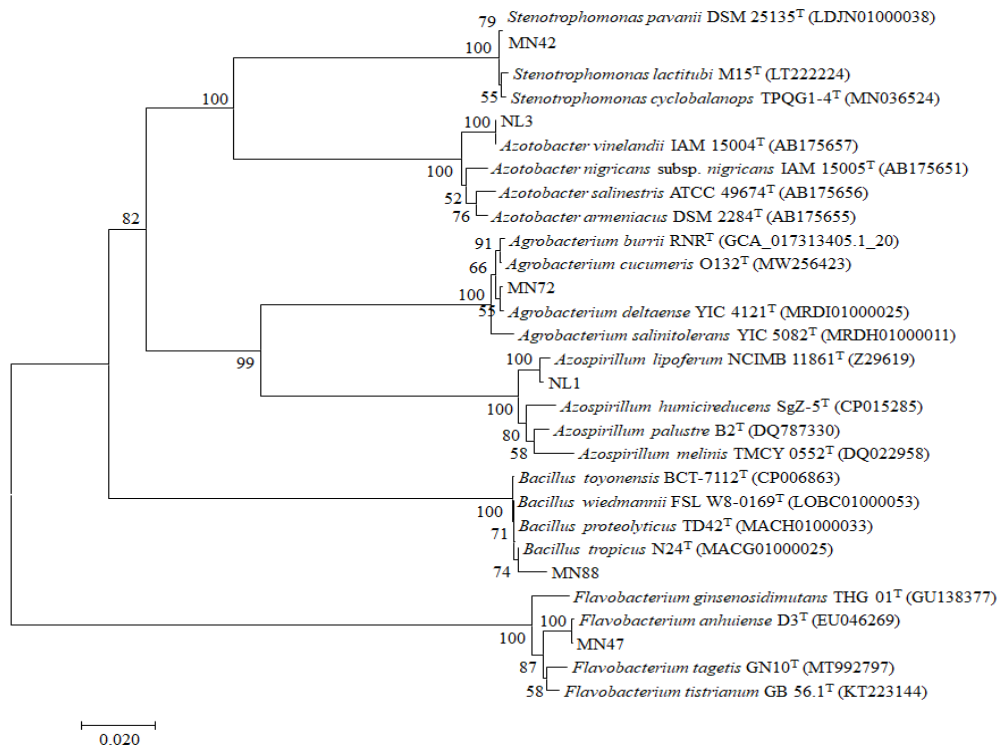
(MT992797), 97,62% với *Flavobacterium ginsenosidimutans* THG 01^T (GU138377). Chủng MN42 (chiều dài gen 16S rRNA 1458 bp) bộc lộ sự tương đồng 99,93% với *Stenotrophomonas pavanii* DSM 25135^T (LDJN01000038), 99,28% với *Stenotrophomonas cyclobalanopsidis* TPQG1-4^T (MN036524) và 99,21% với *Stenotrophomonas maltophilia* MTCC 434^T (JALV01000036).

Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA của một số chủng nghiên cứu cho thấy sự tương đồng từ 99,2%-100% phù hợp giới hạn (>97%) về loài đã mô tả có hiệu lực trên dữ liệu loài chuẩn LPSN (<https://lpsn.dsmz.de/>) (Browne và cs., 2016); (Liu và cs., 2023); (Lao và cs., 2024) với các trình tự gen của các loài đã được công bố trên một số chủng chuẩn công bố trên dự liệu EzBioCloud. Kết quả định danh cho thấy, 06 chủng phân tích được định danh thành 6 loài khác nhau gồm: *Azospirillum lipoferum* NL1, *Azotobacter vinelandii* NL3, *Bacillus tropicus* MN88, *Agrobacterium deltaense* MN72, *Flavobacterium anhuiense* MN47, và *Stenotrophomonas pavanii* MN42.

Đồng thời, sơ đồ tiến hóa của 06 chủng có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA được xây dựng dựa vào trình tự gen 16S rRNA bộc lộ chủng NL1 sắp xếp vào nhóm thuộc chi *Azospirillum* - vi khuẩn Gram âm, gần nhất với *Azospirillum lipoferum* NCIMB 11861^T (Z29619) với giá trị tần số xuất hiện (bootstrap) là 100%. Đối với chủng NL3 thuộc nhóm chi *Azotobacter* - vi khuẩn Gram âm, gần nhất với *Azotobacter vinelandii* IAM 15004^T (AB175657) với giá trị bootstrap là 100%. Chủng MN88 thuộc nhóm chi *Bacillus* - vi khuẩn Gram dương, cùng nhánh với *Bacillus tropicus* N24^T (MACG01000025) ở giá trị bootstrap 74%. Tương tự với một số chủng MN72, MN47 và MN42 được sắp xếp cùng nhánh với một số chủng chuẩn lần lượt là *Agrobacterium deltaense* YIC 4121^T (MRDI01000025), *Flavobacterium anhuiense* D3^T (EU046269) và *Stenotrophomonas pavanii* DSM 25135^T (LDJN01000038) tương với giá trị bootstrap 55, 100 và 100%

(Hình 3.2). Giá trị bootstrap của một số chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này đạt từ 55-100% >50% - giới hạn ý nghĩa cho thấy độ tin cậy của vị trí phân loại thông qua sơ đồ tiến hóa dựa vào trình gen 16S rRNA (Felsenstein và cs., 1985); (Jeong và cs., 2021).

Từ kết quả so sánh trình tự gen 16S rRNA thông qua dữ liệu EzBioCloud và sơ đồ phả hệ cho thấy một số chủng vi khuẩn được xác định là *Azospirillum lipoferum* NL1, *Azotobacter vinelandii* NL3, *Bacillus tropicus* MN88, *Agrobacterium deltaense* MN72, *Flavobacterium anhuiense* MN47, và *Stenotrophomonas pavanii* MN42. Theo kết quả nghiên cứu của Cruz-Hernández và cs., (2022); Aasfar và cs., (2021); Ortiz và cs., (2024); Kaur và cs., (2022); Seo và cs., (2024) cho biết, các chủng vi khuẩn nêu trên là các chi vi khuẩn tiềm năng trong phát triển chế phẩm sinh học/phân bón sinh học cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA hỗ trợ cây trồng sinh trưởng, góp phần tăng năng suất và chất lượng.

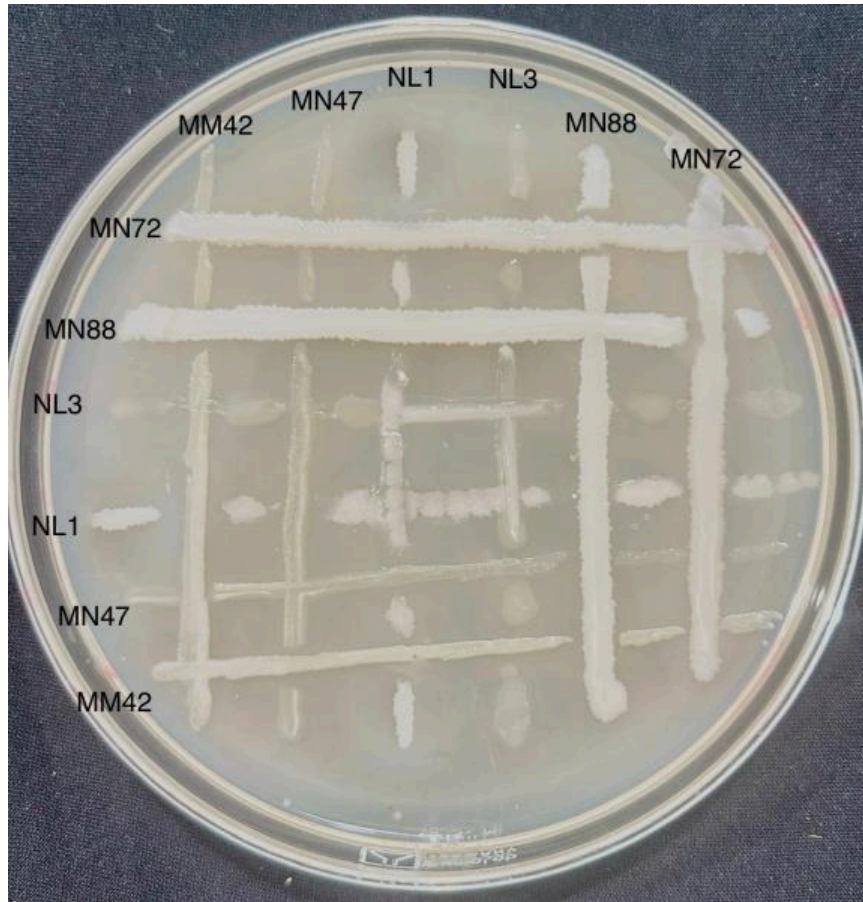


Hình 3.2. Sơ đồ cây định danh của 6 chủng vi sinh vật tuyển chọn

3.1.5. Nghiên cứu khả năng tương tác giữa một số chủng đã sàng lọc

Trong quá trình sinh trưởng và phát triển của một số chủng vi sinh vật sản sinh các hoạt chất sinh học (như kháng sinh, bacteriocin,...) các hoạt chất này sẽ ức chế sự sinh trưởng của các loài khác trong cùng môi trường sống (Cycoń và cs., 2019); (Weiland-Bräuer và cs., 2021); (Virgo và cs., 2025). Điều này sẽ ảnh hưởng đến mật độ của một số chủng vi sinh vật trong môi trường, đồng nghĩa làm giảm bậc lộ kiểu hình các đặc tính sinh học tiềm năng nếu tổ hợp chúng trong cùng chất mang trong quá trình nuôi cấy, cũng như bảo quản và sử dụng chúng trong sản xuất.

Nhằm tuyển chọn được một số chủng vi sinh vật để sản xuất chế phẩm, sản xuất phân bón hữu cơ vi sinh đa chủng giúp tăng cường hoạt lực của sản phẩm, cần thiết phải có đánh giá tương tác giữa một số chủng vi sinh vật trong quá trình nuôi cấy, để lựa chọn được một số chủng không ức chế lẫn nhau khi kết hợp phối trộn sản xuất sản phẩm. Các chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này được nuôi cấy đồng thời theo phương pháp cấy vạch giao nhau trên môi trường Ashby thạch đĩa, kết quả thể hiện tại hình 3.3.



Hình 3.3. Khả năng tương tác giữa một số chủng đã sàng lọc

Từ kết quả hình 3.3. cho thấy, giữa một số chủng đều có tác động qua lại làm ảnh hưởng đến sự phát triển bình thường của chủng. Tuy nhiên, ở các điểm cắt của đường cấy giữa chủng NL1 và NL3 cho thấy sự phát triển của đường cấy chủng này không ảnh hưởng đến sự phát triển của đường cấy còn lại.

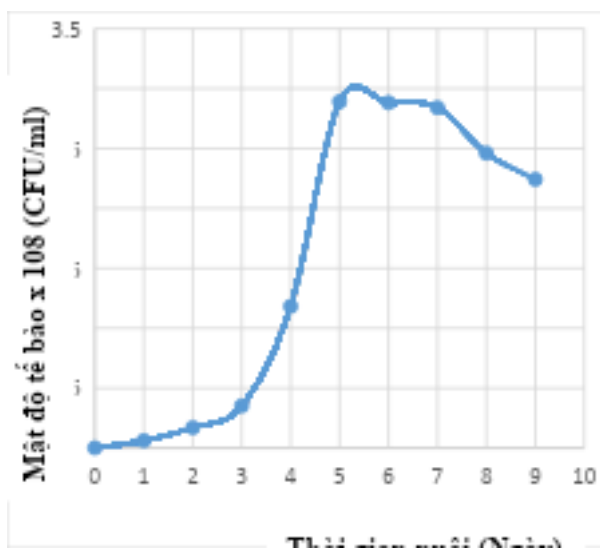
Như vậy, từ các kết quả nghiên cứu trên cho thấy chủng NL1 và NL3 cho hoạt tính cố định nitơ và tổng hợp IAA cao nhất và khi nuôi cấy không ức chế/kìm hãm lẫn nhau. Do vậy chủng NL1 và NL3 tiếp tục được tuyển chọn phục vụ cho các nghiên cứu tiếp.

3.2. Kết quả nghiên cứu đặc điểm sinh học của một số chủng tuyển chọn

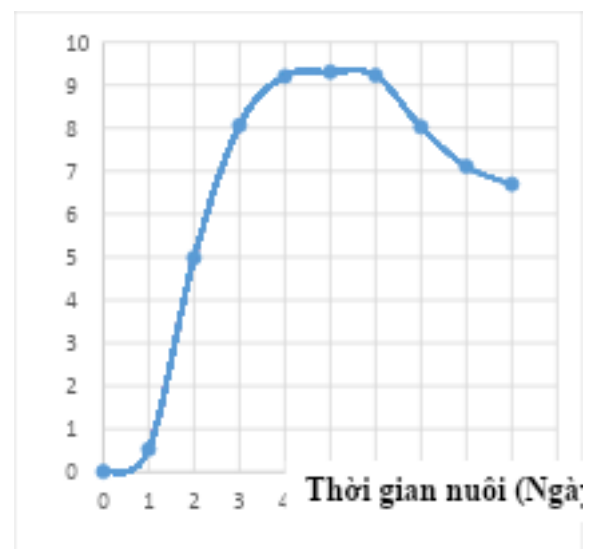
3.2.1. Đánh giá đặc điểm sinh lý của một số chủng vi sinh vật đã được tuyển chọn

3.2.1.1. Đặc tính sinh trưởng của một số chủng vi sinh vật tuyển chọn

Để xây dựng đường cong sinh trưởng cho từng chủng, cần xây dựng đường chuẩn thể hiện mối tương quan giữa mật độ tế bào vi sinh vật và độ hấp thụ tia UV. Theo đó, đường chuẩn thể hiện mối tương quan giữa mật độ tế bào của chủng NL1 và độ hấp thụ tia UV có dạng: $y = 1E - 0,9x + 0,0068$ (với $R^2 = 0,9965$), chủng NL3 là: $y = 1E - 0,9x + 0,0053$ (với $R^2 = 0,9975$). Kết hợp giữa phương trình đường chuẩn và kết quả đo OD ở các thời điểm nuôi cấy, vẽ được đường cong sinh trưởng của chủng NL1 và NL3 khi nuôi cấy trong môi trường Ashby và được thể hiện tại hình 3.4 A và 3.4 B.



Hình 3.4 A. Đường cong sinh trưởng của chủng NL1



Hình 3.4 B. Đường cong sinh trưởng của chủng NL3

Trong điều kiện nuôi cấy tĩnh, quá trình sinh trưởng của một quần thể vi sinh vật trải qua 4 giai đoạn (Tiềm phát □ Logarit □ Cân bằng động □ Suy vong). Kết quả nghiên cứu xây dựng đường cong sinh trưởng cho 2 chủng tuyển chọn phù hợp với quy luật trên. Tuy nhiên, một số chủng khác nhau đạt trạng thái sinh trưởng tiệm cận với giai đoạn cân bằng động là khác nhau. Kết

quả thể hiện trong hình 3.4A, 3.4B cho thấy: chủng *Azotobacter* sp. NL3 tiệm cận với giai đoạn cân bằng động sau 04 ngày (tương ứng với 96 giờ) nuôi cấy, trong khi đó chủng *Azospirillum* sp. NL1 đạt trạng thái này sau 05 ngày nuôi cấy (tương ứng với 120 giờ). Mặc dù vậy, chủng *Azotobacter* sp. NL3 cần thời gian sinh trưởng đến đầu pha cân bằng dài hơn khoảng 3 lần so với chủng *Azotobacter* sp. 67B và *Azotobacter* sp. 76A (Viscardi và cs., 2016), và 1,3 lần so với chủng *Azotobacter* sp. O6 (Nosrati và cs., 2014). Tương tự, thời gian để mật độ tế bào của chủng *Azospirillum* sp. NL1 ở đầu pha cân bằng cao hơn 5,4 lần so với *Azospirillum* sp. Ab-V5 (Oliveira và cs., 2017).

Nhu cầu thời gian dài hơn trong quá trình sinh trưởng của hai chủng *Azospirillum* sp. NL1 và *Azotobacter* sp. NL3 có thể làm tăng quá trình hấp thụ dinh dưỡng/đa lượng/vi lượng cần thiết cho chuyển hóa thành các sản phẩm trao đổi chất có lợi cao hơn (Kolter và cs., 2022).

Kết quả trên hình 3.3A, 3.3B cũng cho thấy, khi khảo sát đường cong tăng sinh của 2 chủng vi sinh vật tuyển chọn đạt giá trị mật độ tế bào lớn nhất trong môi trường nuôi cấy giống nhau (môi trường Ashby) là khác nhau và đạt giá trị mật độ tế bào lớn nhất sau 5 ngày nuôi cấy. Cụ thể là: chủng *Azotobacter* sp. NL3 đạt giá trị mật độ tế bào lớn nhất sau 5 ngày nuôi cấy là $9,307.10^8$ CFU/ml, chủng *Azospirillum* sp. NL1: $2,892.10^8$ CFU/ml.

3.2.1.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH nuôi cấy đến khả năng tăng sinh của một số chủng vi sinh vật tuyển chọn

a, Ảnh hưởng của nhiệt độ

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến 2 chủng vi sinh vật tuyển chọn được thể hiện trong bảng 3.5.

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến 2 chủng vi sinh vật tuyển chọn

T T	Tên chủng	Mật độ tế bào ($\times 10^8$ CFU/ml) sau 5 ngày nuôi cấy tại nhiệt độ khảo sát tương ứng
--------	-----------	--

		28°C	30°C	32°C	34°C	36°C	38°C	40°C	42°C
1	<i>Azospirillum</i> sp. NL1	2,882	2,892	<u>2,942</u>	2,802	1,362	0,972	0,142	0,002
2	<i>Azotobacter</i> sp. NL3	9,067	9,307	<u>9,337</u>	8,087	6,127	1,197	0,507	0,007

Từ bảng 3.5 cho thấy, nhiệt độ nuôi cấy có ảnh hưởng rõ rệt đến sự sinh trưởng của một số chủng vi sinh vật tuyển chọn. Cả 2 chủng phát triển tốt trong dải nhiệt độ từ 28 - 32°C. Trong đó nhiệt độ phù hợp nhất cho chủng *Azospirillum* sp. NL1 và *Azotobacter* sp. NL3 là 32°C. Khi nhiệt độ nuôi lớn hơn 34°C chúng đều bị ức chế, nuôi ở 42°C chúng gần như không phát triển thậm trí bị tiêu diệt. Nếu so sánh mức tích lũy sinh khối của một số chủng giữa nhiệt độ phù hợp nhất và nhiệt độ ức chế mạnh nhất trong dãy khảo sát, có thể thấy rằng đối với chủng NL1 bị giảm khoảng 1471 lần, chủng NL3 bị giảm khoảng 1333 lần. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh (2017) khi đánh giá khả năng thích ứng nhiệt độ của một số chủng *Azospirillum* sp., ở điều kiện nuôi cấy 30 - 40°C, mật độ tế bào đạt khoảng $3,69.10^8$ CFU/ml. Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Tiến Dũng (2011) khi đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tăng sinh của một số chủng *Azospirillum* sp. cho thấy ở nhiệt độ 32°C hoạt tính tăng sinh của một số chủng nghiên cứu là lớn nhất đạt 10^8 CFU/ml.

Đối với chủng *Azotobacter* sp., nhiệt độ từ 28 - 32°C không ảnh hưởng nhiều đến khả năng tăng sinh của chủng, nhiệt độ trên 32°C bắt đầu ảnh hưởng mạnh đến khả năng tăng sinh của chủng, đặc biệt khi nuôi trong điều kiện nhiệt độ 42°C, mật độ tế bào sau 5 ngày nuôi cấy giảm gần 1333 lần. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Thị Hằng Nga và cs. (2016) khi đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tăng sinh để thu hồi sinh khối của chủng *Azotobacter* sp.. Theo đó nhiệt độ nuôi phù hợp với chủng nghiên

cứu của tác giả Nguyễn Thị Hằng Nga là 28 - 30°C, khi nhiệt độ nuôi cấy tăng lên thì sinh khối tạo ra giảm rõ rệt.

b, Ảnh hưởng của pH môi trường

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của pH nuôi cấy đến 2 chủng vi sinh vật tuyển chọn được thể hiện trong bảng 3.6.

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của pH môi trường đến sinh trưởng của 2 chủng tuyển chọn

STT	pH của môi trường	Mật độ tế bào (x 10 ⁸ CFU/ml) sau 5 ngày giờ nuôi cấy tại pH của môi trường khảo sát tương ứng	
		<i>Azospirillum</i> sp. NL1	<i>Azotobacter</i> sp. NL3
1	pH = 4,0	-	-
2	pH = 4,5	0,012	0,007
3	pH = 5,0	1,052	0,757
4	pH = 5,5	1,942	2,087
5	pH = 6,0	2,742	8,957
6	pH = 6,5	<u>3,002</u>	9,297
7	pH = 7,0	2,942	9,337
8	pH = 7,5	2,852	9,197
9	pH = 8,0	2,272	7,117
10	pH = 8,5	1,092	1,617
11	pH = 9,0	0,022	0,097

Kết quả bảng 3.6 cho thấy, pH môi trường đều có ảnh hưởng mạnh đến cả 2 chủng vi sinh vật đã được tuyển chọn. Ở mỗi giá trị pH khác nhau khả năng tăng sinh của một số chủng là khác nhau. Chủng *Azospirillum* sp. NL1 và *Azotobacter* sp. NL3 không sinh trưởng ở pH = 4,0. Trong dải pH < 6,0 và pH > 7,5 đều ảnh hưởng khá mạnh và làm giảm khả năng tăng sinh của chủng

nghiên cứu. Dải hẹp pH tối ưu cho cả 2 chủng phát triển trong khoảng 6,5 - 7,0. Trong đó chủng *Azotobacter* sp. NL3 đạt giá trị mật độ tế bào lớn nhất ($9,337.10^8$ CFU/ml) và *Azospirillum* sp. NL1 là: $3,002.10^8$ CFU/ml lần lượt ở mức pH là 6,5 và 7,0.

Nguyễn Thị Hằng Nga và cs. (2016) khi nghiên cứu thu sinh khối của chủng *Azotobactersp.* cho kết quả giá trị pH thích hợp để thu sinh khối với chủng nghiên cứu là 7,0. Nguyễn Thị Minh (2017) và nghiên cứu của Nguyễn Tiến Dũng (2011) khi nghiên cứu ảnh hưởng của pH đến khả năng tăng sinh của chủng *Azospirillum* sp. có kết quả chủng *Azospirillum* phát triển tốt nhất trong khoảng pH = 6,5-7,0. Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của các tác giả nêu trên.

3.2.2. Tối ưu điều kiện (thời gian, nhiệt độ, pH) nuôi một số chủng tuyển chọn

Kết quả thí nghiệm tối ưu hóa quá trình nuôi cấy được thiết kế thử nghiệm bằng mô hình Box-Behnken với 17 đơn vị thí nghiệm và 3 lần lặp lại với các biến được lựa chọn. Các nhân tố được tối ưu bao gồm nồng độ thời gian nuôi cấy (X1) ở mức (-1, 0, +1) tương ứng (4 ngày, 5 ngày, 6 ngày); nhiệt độ nuôi cấy (X2) ở mức (-1, 0, +1) là 30°C, 32°C, 34°C đối với NL1 và NL3; pH nuôi cấy (X3) ở mức (-1, 0, +1) là 6,0; 6,5; 7,0 với NL1; và 6,5; 7; 7,5 đối với NL3.

Áp dụng phương pháp phân tích hồi quy các số liệu thực nghiệm, thu được mô hình đa thức bậc hai thể hiện mật độ tế bào của một số chủng:

$$Y = + 2,94 + 0,62*A + 0,023*B + 0,58*C + 0,12*A*B + 0,47*A*C - 0,15*B*C - 0,76*A^2 - 0,84*B^2 - 1,1*C^2$$

Trong đó: Y là mật độ tế bào trong nuôi cấy; các giá trị A, B, C lần lượt là các giá trị của các yếu tố thời gian nuôi cấy, nhiệt độ nuôi cấy và pH nuôi cấy.

Phân tích ANOVA được sử dụng để đánh giá mô hình, từ đó cho biết tương tác giữa các yếu tố ảnh hưởng đến mật độ tế bào. Kết quả phân tích

ANOVA được thể hiện qua bảng 3.7.

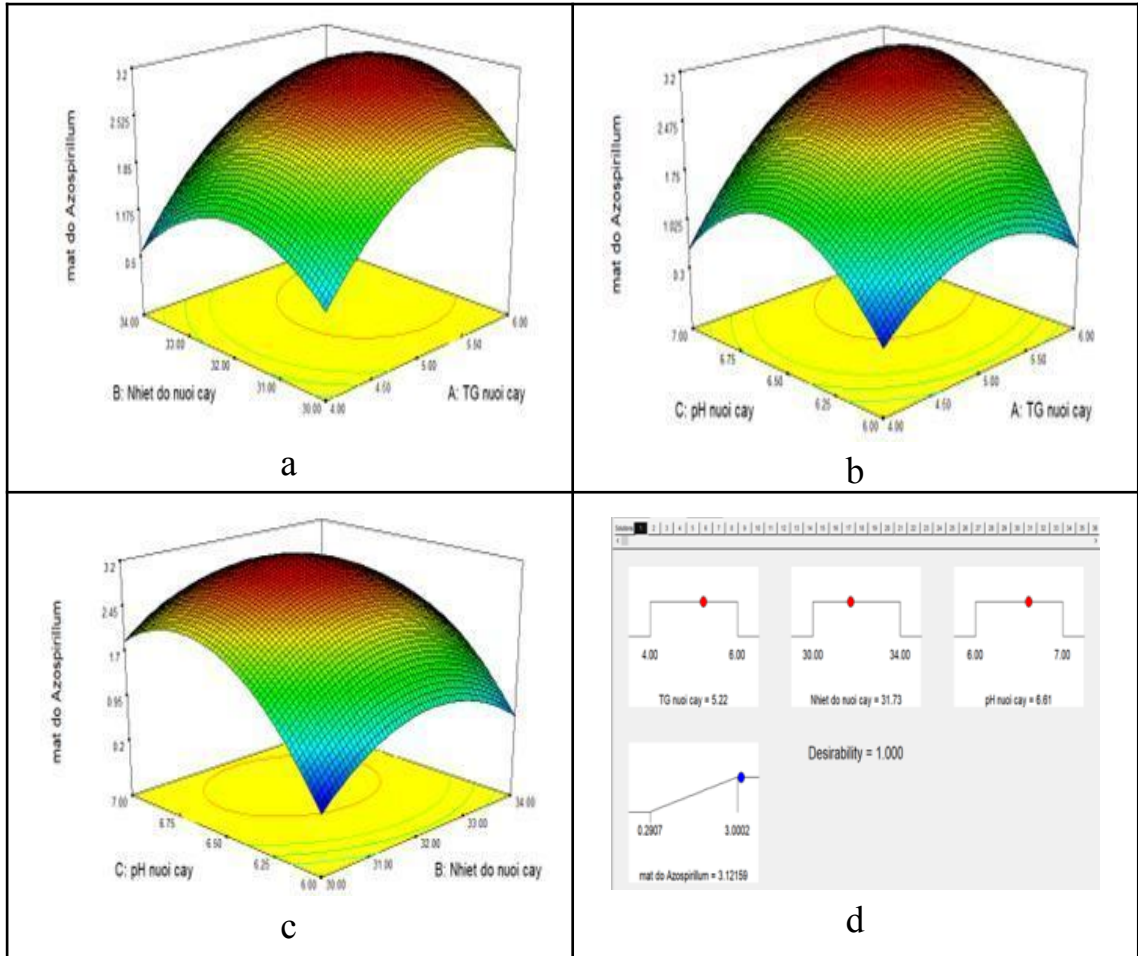
Bảng 3.7. Kết quả phân tích phương sai ANOVA của mô hình nuôi cấy

Nguồn	Chủng <i>Azospirillum</i> sp. NL1		Chủng <i>Azotobacter</i> sp. NL3	
	Chuẩn F	Giá trị P	Chuẩn F	Giá trị P
Model	222,61	<0,0001	240,60	<0,0001
Lack of Fit	5,53	0,066	3,52	0,1276
R²	0,9965			0,9968

Chú thích: Chuẩn F: Chuẩn Fisher; "Lack of Fit": Chuẩn đánh giá độ không tương thích của mô hình với thực nghiệm. R²: Hệ số hồi quy

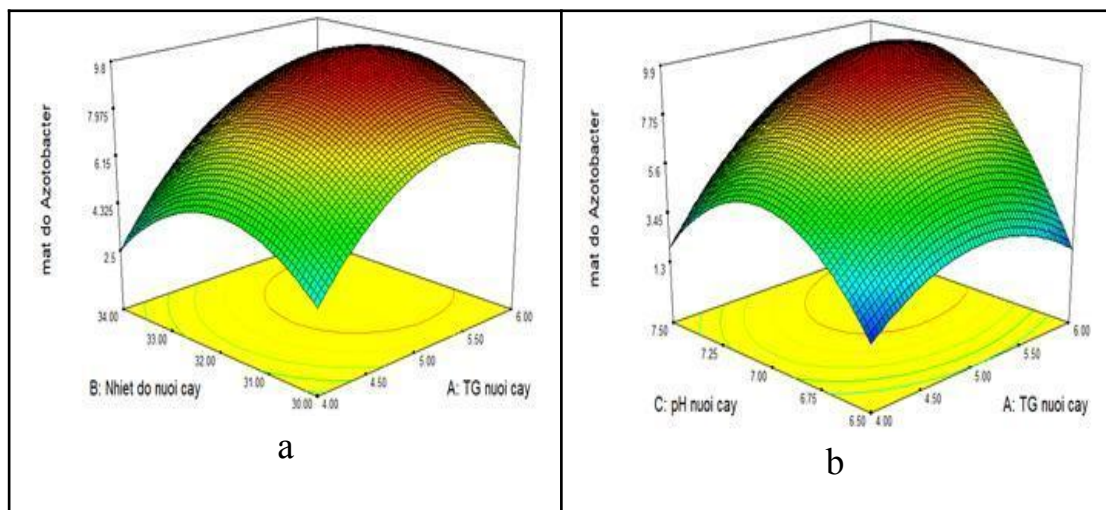
Phân tích ANOVA ta thấy giá trị xác suất của mô hình P-value < 0,0001 < 0,05 do đó mô hình được lựa chọn có ý nghĩa với Hệ số hồi quy lần lượt là 0,9965 và 0,9968. Kết quả cho thấy có 99,65% với NL1 và 99,68% với NL3 số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu tiên đoán của mô hình.

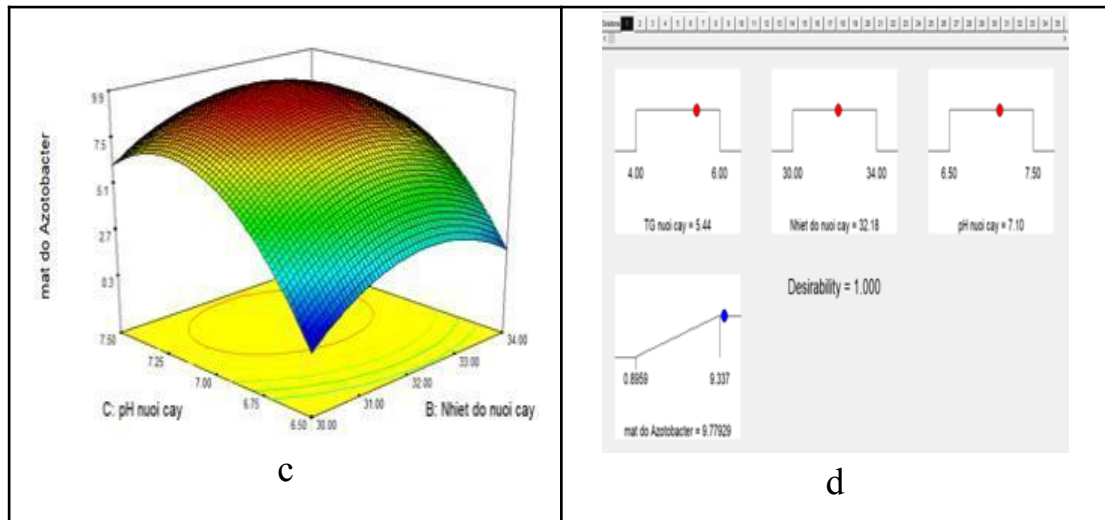
Sử dụng phương pháp hàm kỳ vọng để tối ưu mật độ tế bào thu được từ quá trình nuôi cấy bằng phần mềm Design-Expert (DX 7.1.5). Kết quả tìm được 43 phương án với mỗi chủng, phương án tốt nhất được dự đoán để cực đại hàm mục tiêu, cụ thể với chủng NL1: thời gian nuôi 5,22 ngày, nhiệt độ 31,73 °C, pH = 6,61; khi đó mật độ tế bào đạt được trong các điều kiện trên theo tính toán là $3,12159 \times 10^8$ CFU/ml. Với chủng NL3: thời gian nuôi 5,44 ngày, nhiệt độ 32,18°C, pH = 7,10. Khi đó mật độ tế bào đạt được trong các điều kiện trên theo tính toán là $9,77929 \times 10^8$ CFU/ml. Kết quả này có độ tương thích cao với kết quả kiểm tra bằng thực nghiệm, được trình bày ở hình 3.5-3.6.



Hình 3.5. Bề mặt đáp ứng mật độ tế bào chủng NL1

Ghi chú: (a): Mô hình tương tác giữa thời gian nuôi và nhiệt độ nuôi cấy; (b): Mô hình tương tác giữa thời gian nuôi và pH; (c): Mô hình tương tác nhiệt độ và pH; (d) Hàm kỳ vọng và điều kiện tối ưu mật độ tế bào chủng NL1





Hình 3.6. Bề mặt đáp ứng mật độ tế bào chủng NL3

Ghi chú: (a): Mô hình tương tác giữa thời gian nuôi và nhiệt độ nuôi cấy; (b): Mô hình tương tác giữa thời gian nuôi và pH; (c): Mô hình tương tác nhiệt độ và pH; (d) Hàm kỳ vọng và điều kiện tối ưu mật độ tế bào chủng NL3.

3.2.3. Đánh giá đặc điểm sinh hóa của một số chủng vi sinh vật đã được tuyển chọn

3.2.3.1. Khả năng sinh một số loại enzyme của một số chủng vi sinh vật tuyển chọn

Trong nghiên cứu về đặc điểm hóa sinh của 2 chủng vi sinh vật tuyển chọn, đề tài quan tâm trước đến khả năng sinh enzyme của chúng khi được nuôi cấy trên môi trường Ashby và sử dụng sinh khối sau 5 ngày nuôi cấy để đánh giá định tính khả năng sinh enzyme của chủng thông qua bộ KIT API. Kết quả đánh giá định tính khả năng sinh một số enzyme của 2 chủng vi sinh vật tuyển chọn được thể hiện qua bảng 3.8.

Bảng 3.8. Khả năng sinh enzyme của 2 chủng vi sinh vật được tuyển chọn

TT	Hoạt tính sinh enzyme khảo sát	Hoạt tính của chủng	
		<i>Azospirillum</i> sp. NL1	<i>Azotobacter</i> sp. NL3
1	Đối chứng	-	-
2	Phosphatase alkaline	+	+

TT	Hoạt tính sinh enzyme khảo sát	Hoạt tính của chủng	
		<i>Azospirillum</i> sp. NL1	<i>Azotobacter</i> sp. NL3
3	Esterase (C4)	+	+
4	Esterase Lipase (C8)	+	-
5	Lipase (C14)	+	+
6	Leucine arylamidase	+	+
7	Valine arylamidase	+	+
8	Cystine arylamidase	-	-
9	Trypsine	-	-
10	D-chymotrypsine	-	-
11	Phosphatase acide	+	+
12	Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+
13	D-galactosidase	-	+
14	β -galactosidase	-	-
15	β -glucuronidase	+	-
16	D-glucosidase	-	+
17	β -glucosidase	+	-
18	N-acetyl- β -glucosaminidase	+	-
19	D-mannosidase	-	-
20	D-fucosidase	-	-

Ghi chú: +: dương tính (có hoạt tính sinh enzyme), - âm tính (không có hoạt tính sinh enzyme)

Kết quả bảng 3.8 cho thấy, các chủng vi sinh vật được tuyển chọn thể hiện khả năng sinh enzyme là khác nhau. Trong 19 enzyme được khảo sát, 7

loại enzyme được thể hiện dương tính với cả 2 chủng đó là: Phosphatase alkaline, Esterase (C4), Lipase (C14), Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Phosphatase acide, Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase. Tuy nhiên cũng có 6 loại enzyme không được thể hiện ở cả 2 chủng, đó là: Cystine arylamidase, Trypsine, D-chymotrypsine, β -galactosidase, D-mannosidase và D-fucosidase. Có những hoạt tính sinh enzyme được thể hiện ở chủng này mà không được thể hiện ở chủng kia, như hoạt tính sinh Esterase Lipase (C8), β -glucuronidase, β -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase được thể hiện là dương tính ở chủng *Azospirillum* sp. NL1, nhưng lại không thể hiện ở *Azotobacter* sp. NL3. Ngược lại, hoạt tính sinh D-galactosidase và D-glucosidase được thể hiện là dương tính ở chủng *Azotobacter* sp. NL3 nhưng lại không được thể hiện ở *Azospirillum* sp. NL1. Chủng thể hiện khả năng sinh nhiều loại enzyme là *Azospirillum* sp. NL1 với 11/19 loại enzyme được phát hiện dương tính với kit thử. Chủng *Azotobacter* sp. NL3 thể hiện khả năng sinh các loại enzyme ít hơn (với 9/19 loại enzyme được phát hiện dương tính với kit thử).

3.2.3.2. Khả năng lên men, đồng hóa các loại đường, sinh indole, khả năng sinh catalase, khả năng sinh oxydase, phản ứng methyl đỏ, phản ứng Voges-Proskauer, thử nghiệm KIA, TSI của một số chủng đã được tuyển chọn

Thông qua việc thực hiện các phản ứng sinh hóa và thử nghiệm với các bộ KIT API (20NE, 32GN), kết quả thử nghiệm khả năng sinh indole, hoạt tính catalase, hoạt tính oxydase, phản ứng methyl đỏ, phản ứng Voges-Proskauer, phản ứng KIA, phản ứng TSI, khả năng tiêu thụ các nguồn cacbon, khả năng chuyển hóa nitrate thành nitrite được thể hiện trong bảng 3.9.

Bảng 3.9. Một số đặc điểm hóa sinh của 2 chủng vi sinh vật tuyển chọn

TT	Các chỉ tiêu hóa sinh	Hoạt tính của chủng	
		<i>Azospirillum</i> sp. NL1	<i>Azotobacter</i> sp. NL3
1	Chuyển hóa nitrate thành nitrite	+	-
2	Sinh Indole	+	+
3	Lên men D-glucose	-	-
4	Đồng hóa L-arginine	-	-
5	Đồng hóa Urea	+	-
6	Đồng hóa Esculin ferric citrate	+	+
7	Đồng hóa Gelatin	-	-
8	Đồng hóa 4-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside	+	-
9	Đồng hóa D-glucose	+	+
10	Đồng hóa L-arabinose	+	-
11	Đồng hóa D-mannose	+	-
12	Đồng hóa D-mannitol	+	+
13	Đồng hóa N-acetyl-glucosamine	+	-
14	Đồng hóa D-maltose	-	-
15	Đồng hóa Potassium gluconate	+	+
16	Đồng hóa Capric acid	-	+
17	Đồng hóa Adipic acid	+	-
18	Đồng hóa Malic acid	+	+
19	Đồng hóa Trisodium citrate	+	+
20	Đồng hóa Phenylacetic acid	-	-
21	Đồng hóa L-rhamnose	-	+

TT	Các chỉ tiêu hóa sinh	Hoạt tính của chủng	
		<i>Azospirillum</i> sp. NL1	<i>Azotobacter</i> sp. NL3
22	Đồng hóa D-ribose	+	-
23	Đồng hóa Inositol	+	+
24	Đồng hóa D-saccharose	-	+
25	Đồng hóa Itaconic acid	-	-
26	Đồng hóa Suberic acid	+	-
27	Đồng hóa Sodium malonate	+	-
28	Đồng hóa Sodium acetate	+	-
29	Đồng hóa Lactic acid	+	+
30	Đồng hóa L-alanine	+	-
31	Đồng hóa Potassium 5-ketogluconate	-	-
32	Đồng hóa Glycogen	+	+
33	Đồng hóa 3-hydroxybenzoic acid	-	-
34	Đồng hóa L-serine	+	-
35	Đồng hóa Salicin	-	-
36	Đồng hóa D-melibiose	-	+
37	Đồng hóa L-fucose	+	-
38	Đồng hóa D-sorbitol	+	+
39	Đồng hóa Propionic acid	+	-
40	Đồng hóa Valeric acid	+	+
41	Đồng hóa L-histidine	+	-

TT	Các chỉ tiêu hóa sinh	Hoạt tính của chủng	
		<i>Azospirillum</i> sp. NL1	<i>Azotobacter</i> sp. NL3
42	Đồng hóa Potassium 2-ketogluconate	+	+
43	Đồng hóa 3-hydroxybutyric acid	+	+
44	Đồng hóa 4-hydroxybenzoic acid	-	+
45	Đồng hóa L-proline	+	-
46	Đồng hóa D-xylose	-	-
47	Đồng hóa D-fructose	+	+
48	Đồng hóa lactose	-	-
49	Hoạt tính catalase	+	+
50	Hoạt tính oxydase	+	+
51	Phản ứng Methyl đỏ	+	+
52	Phản ứng Voges-Proskauer	+	+
53	Khả năng sinh H ₂ S	+	+

Ghi chú: +: dương tính (có hoạt tính sinh enzyme), - âm tính (không có hoạt tính sinh enzyme)

Kết quả bảng 3.9 cho thấy, 2 chủng vi sinh vật tuyển chọn đều thể hiện hoạt tính hóa sinh ở các mức độ khác nhau. Trong số 53 chỉ tiêu hóa sinh được khảo sát thì có 20 chỉ tiêu hóa sinh được thể hiện ở cả 2 chủng, và có 11 chỉ tiêu không thể hiện ở chủng nào. Số lượng các đặc điểm hóa sinh được thể hiện cũng khác nhau với từng chủng, chủng *Azospirillum* sp. NL1 thể hiện nhiều đặc điểm dương tính (37/53 chỉ tiêu), chủng *Azotobacter* sp. NL3 với 25/53 chỉ tiêu dương tính.

3.2.4. Đánh giá đặc điểm di truyền của một số chủng tuyển chọn

Kết quả lắp ráp trình tự nucleotide bộ gen hai chủng vi khuẩn *Azospirillum* sp. NL1 và *Azotobacter* sp. NL3 được trình bày trong bảng 3.10. Đối với chủng NL1, bộ gen được lắp ráp từ 7 contig, chủ yếu là các contig đóng vòng với tổng chiều dài các contig là 8.071.173 bp, trình tự sau lắp ráp cho thấy kích thước bộ gene của chủng vi khuẩn *Azospirillum* là 7~8 Mb. Trong đó, vòng contig lớn nhất có chiều dài 2.813.755 bp chiếm 34.86 % tổng chiều dài các contig; tỷ lệ G+C% chiếm 67,23%. Số lượng coding sequence (CDS), tRNA và rRNA của chủng NL1 lần lượt là 7313, 79 và 26. Một số công bố gần đây nhất đã xác định kích thước bộ gen (genome) của các loài thuộc chi *Azospirillum* bao gồm *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. irakense*, *A. halopraeferens* và *A. largimobile* có kích thước dao động từ 4,8 đến 9,7 Mb (Rayko và cs., 2024); (Dos Santos Ferreira và cs., 2022). Các loài *Azospirillum* là vi sinh vật hỗ trợ sinh trưởng ở cây trồng, thuộc phân lớp alpha của Proteobacteria. Từ kết quả lắp ráp bộ gen có thể xác định rằng chủng vi khuẩn phân lập có kích thước bộ gen của chi *Azospirillum* đã được công bố trên ngân hàng gen.

Bảng 3.10. Kết quả lắp ráp de novo đặc điểm genome của một số chủng tuyển chọn

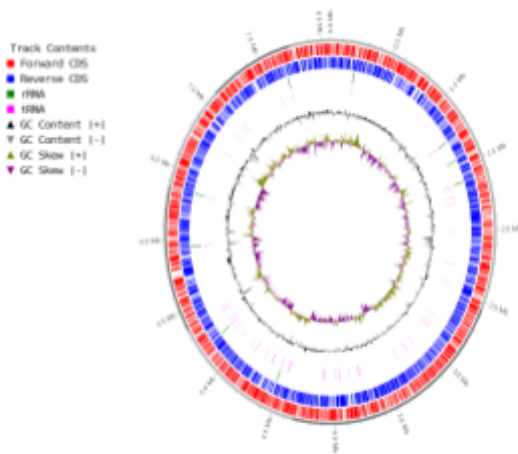
STT	Đặc điểm genome	Số lượng	
		<i>Azospirillum</i> sp. NL1	<i>Azotobacter</i> sp. NL3
1	Số lượng các contig	7	1
2	Số contig đóng vòng	7	1
3	% GC (contigs > 500 bp)	67,23	65,65
4	Tổng chiều dài các contig (bp)	8,071,173	5,378,928

STT	Đặc điểm genome	Số lượng	
		<i>Azospirillum</i> sp. NL1	<i>Azotobacter</i> sp. NL3
5	Chiều dài contig lớn nhất (bp)	2,813,755	5,378,928
6	Giá trị N50 (contigs > 500 bp)	1,395,693	5,378,928
7	Giá trị L50 (contigs > 500 bp)	2	1
8	CDS	7313	5321
9	tRNA	79	64
10	rRNA	26	18
	Số lượng gen quy định chức năng protein:		
1	Protein giả thuyết	2362	1233
2	Protein với nhiệm vụ chức năng	4951	4088
3	Protein có chỉ định số EC	1483	1232
4	Protein với sắp xếp GO	1298	1059
5	Proteins với nhiệm vụ tín hiệu	1156	935
6	Protein với nhiệm vụ hệ thống	1854	1710
7	Các protein được chỉ định cho họ (PLfam) dành riêng cho chi PATRIC	6444	5200
8	Protein với các nhiệm vụ của họ liên chi PATRIC (PGfam)	6630	5205
9	Protein với nhiệm vụ FIGfam	0	0

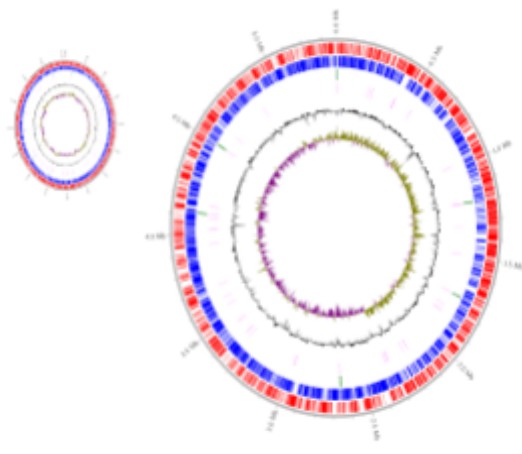
Tương tự, đối với chủng NL3, kết quả lắp ráp bộ gen cho thấy chỉ có một loại contig đóng vòng duy nhất, tổng chiều dài các contig là 5,378,928 phù hợp với kích thước bộ gene *Azotobacter* là khoảng 5 Mb (Roy và cs., 2025).

Contig lớn nhất có chiều dài 5,378,928 bp chiếm 100 % tổng chiều dài các contig. Số lượng đoạn trình tự mã hóa (coding sequence, CDS), tRNA và rRNA của chủng NL3 lần lượt là 5321, 64 và 18.

Bản đồ genome của chủng *Azospirillum* sp. NL1 và *Azotobacter* sp. NL3 được thể hiện tại hình 3.7 A và 3.7 B.



Hình 3.7 A. Bản đồ genome của chủng *Azospirillum* sp. NL1



Hình 3.7 B. Bản đồ genome của chủng *Azotobacter* sp. NL3

Kết quả phân tích bản đồ genome chủng *Azospirillum* sp. NL1 cho thấy từ tâm ra ngoài, vòng tròn 1 minh họa độ nghiêng của GC. Vòng tròn 2 hiển thị nội dung GC (các đỉnh bên ngoài/bên trong vòng tròn tương ứng cho biết các giá trị cao hơn hoặc thấp hơn so với nội dung G+C trung bình). Vòng tròn 3 biểu thị gen ncRNA. Các vòng tròn 4, 5 và 6 biểu thị các CDS, với màu tương ứng theo các danh mục COG, KEGG và GO. Vòng tròn 7 thể hiện trình tự mã hóa protein được dự đoán chức năng.

Phân tích bản đồ bộ gen của chủng *Azotobacter* sp. NL3 cho thấy từ tâm ra ngoài, vòng tròn 1 minh họa độ nghiêng của GC. Vòng tròn 2 hiển thị nội dung GC (các đỉnh bên ngoài/bên trong vòng tròn tương ứng cho biết các giá trị cao hơn hoặc thấp hơn so với nội dung G+C trung bình). Vòng tròn 3 biểu thị gen ncRNA. Các vòng tròn 4, 5 và 6 biểu thị các CDS, với màu tương ứng

theo các danh mục COG, KEGG và GO. Vòng tròn 7 thể hiện trình tự mã hóa protein được dự đoán chức năng. Số lượng các gen tham gia vào quá trình cố định nitơ và tổng hợp IAA của chủng NL1 và *Azotobacter* sp. NL3 được tổng hợp trình bày tại bảng 3.11.

Bảng 3.11. Số lượng gen tham gia cố định nitơ, tổng hợp IAA của NL1 và NL3

STT	Chức năng gen	<i>Azospirillum</i> spp. NL1	<i>Azotobacter</i> spp. NL3
1	Cố định nitơ	29 gen	45 gen
2	Tổng hợp IAA	4 gen	7 gen

Dựa trên 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 *Azospirillum* sp. 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 *Azotobacter* sp. 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.

Chi *Azospirillum* là vi khuẩn cố định đạm sống tự do và sinh tổng hợp IAA, là vi khuẩn Gram âm (phân lớp α của proteobacteria) ở vùng rễ. Chúng thể hiện quá trình chuyển hóa C và N linh hoạt, giúp chúng thích nghi tốt để phát triển trong môi trường cạnh tranh của vùng rễ. *Azospirillum* đã được chứng minh là có tác dụng có lợi đối với sự tăng trưởng của thực vật và năng suất cây trồng, tiêu biểu gồm *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum halopraeferens* và *Azospirillum irakense* (Yasuda và cs., 2022); (Housh và cs., 2023). *Azospirillum* có thể chuyển đổi nitơ trong khí quyển thành amoni trong điều kiện vi hiếu khí ở mức nitơ thấp, thông qua hoạt động của phức hợp nitrogenase. Enzym này được xây dựng từ hai thành phần: protein dinitrogenase (protein MoFe, *NifDK*), chứa cofactor molybden-sắt, là vị trí khử N_2 ; protein dinitrogenase reductase (protein Fe, *NifH*) chuyển electron từ chất cho electron sang protein

nitrogenase. Hầu hết công trình nghiên cứu di truyền về cố định nitơ của *Azospirillum* đã được thực hiện với *A. brasilense*. Một operon *nifHDK* của *A. brasilense*, mã hóa cả hai thành phần nitrogenase, đã được phân lập dựa trên sự tương đồng về trình tự với gen *nifHDK*. Một số gen *nif* và gen cố định bổ sung liên quan đến quá trình xử lý và vận chuyển electron đến phức hợp enzyme nitrogenase, quá trình sinh tổng hợp cofactor FeMo cũng như điều hòa cố định nitơ đã được phân lập. Ngoại trừ các gen *nifA* và *nifB* được phiên mã riêng biệt, tất cả chúng đều nằm trong cụm gen *nif* 30 kb chính, chứa các gen *nifHDK*. Các gen cố định nitơ chính, được nhận diện của *Azospirillum* gồm: *nifH* (Structural gene dinitrogenase reductase (Fe protein)), *nifD* (Structural gene dinitrogenase (MoFe protein, α -subunit)), *nifK* (Structural gene dinitrogenase (MoFe protein, β -subunit)), *nifA* (Transcriptional activator of the nitrogen fixation (*nif*) genes), *gltDB* (Glutamate synthase structural genes), *glnA* (Glutamine synthetase structural gene), *amtB* (Structural gene ammonium transporter), *glnB* (N-signal transmitter protein PII), *glnZ* (PII homologue), *glnD* (Uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (UTase/UR)), *ntrB* (Sensor protein of two-component regulatory system involved in general nitrogen control), *ntrC* (Regulator protein of two-component regulatory system involved in general nitrogen control), *ntrA*, *rpoN* (Alternative sigma factor, $\sigma 54$), *draT* (Dinitrogenase reductase ADP ribosyl-transferase) và *draG* (Dinitrogenase reductase activating glycohydrolase) (Steenhoudt và cs., 2000). Các gen liên quan đến cố định nitơ này cũng được tìm thấy ở chủng *Azospirillum* sp. NL1. Cùng với đó, khả năng sinh tổng hợp IAA (nhóm auxin) của chi *Azospirillum*. Tryptophan thường được coi là tiền chất của IAA, vì việc bổ sung axit amin này vào các nuôi cấy vi khuẩn sinh IAA sẽ dẫn đến sản xuất IAA cao hơn. Có ba con đường chính được biết đến để chuyển đổi tryptophan thành IAA: con đường axit indole-3-pyruvic; con đường indole-3-acetamide (IAM); và con đường tryptamine. Hơn nữa, các bằng chứng về sự hiện diện của một con đường sinh

tổng hợp IAA độc lập với Trp bổ sung ở *A. brasilense*. Việc bổ sung Trp vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn làm gia tăng ý nghĩa các con đường phụ thuộc vào Trp để sản xuất IAA (tăng khoảng 20 lần). Các gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp IAA của chi *Azospirillum*, cũng như được tìm thấy trong genome của chủng *Azospirillum* sp. NL1 trong nghiên cứu này gồm *ipdC* (Indole-3-pyruvate decarboxylase), *trpE(G)* (Anthranilate synthase), *trpG* (Glutamine amido transferase (GATase)), *trpD* (Phosphoribosyl anthranilate transferase), *trpC* (Indole-3-glycerol phosphate synthase) và *AATs* (Aromatic amino acid aminotransferases) (Steenhoudt và cs., 2000); (Ganusova và cs., 2021).

Azotobacter là chi vi khuẩn Gram âm (nhóm δ -proteobacteria), được chứng minh và ứng dụng rộng rãi trong hỗ trợ sinh trưởng, tăng năng suất và chất lượng cây trồng nhờ khả năng cố định nito tự do và sinh tổng hợp IAA (Barron và cs., 2024); (Biełło và cs., 2023). Hầu hết quá trình cố định nito sinh học hiện nay được xúc tác bởi molybden (Mo) nitrogenase (được mã hóa bởi *nifHDK*), một phức hợp metalloenzyme nhạy cảm với oxy bao gồm protein Fe (sản phẩm của *nifH*) và protein MoFe (sản phẩm chuyển hóa của *nifDK*). Protein Fe là một homodimer được bắt cầu bởi một cụm liên tiểu đơn vị [4Fe-4S] đóng vai trò là chất cho điện tử bắt buộc cho protein MoFe. Protein MoFe là một $\alpha_2\beta_2$ heterotetramer chứa các cụm P, các cụm [8Fe-7S] vận chuyển điện tử đến các cofactor FeMo (FeMo-co). FeMo-co là các cụm [Mo-7Fe-9S-homocitrate] nơi xảy ra quá trình khử cơ chất. Hai dạng nitrogenase “thay thế” khác biệt về mặt di truyền đã được xác định trong một phân nhóm các vi khuẩn diazotroph cũng mã hóa *nif*. Nitrase được mã hóa bởi gen *vnfHDK* chứa vanadi thay cho molybden trong cofactor vị trí hoạt động, trong khi nitrogenase được mã hóa bởi gen *anfHDK* dường như chứa Fe là thành phần kim loại duy nhất của cofactor vị trí hoạt động của nó. Ở một số diazotroph, biểu hiện và hoạt động của các dạng thay thế được điều chỉnh bởi sự sẵn có của Mo hoặc V khi N cố định cũng bị hạn chế; ngược lại, ít nhất

một diazotroph tổng hợp các dạng thay thế khi không có N cố định khi nitrogenase phụ thuộc Mo không hoạt động, bất kể sự sẵn có của kim loại vết. Tốc độ khử nito đối với nitrogenase Mo cao hơn nhiều so với tốc độ quan sát được đối với các dạng thay thế. Ngoài ra, một tỷ lệ lớn hơn của thông lượng electron trong quá trình khử nito được hướng tới quá trình khử proton bởi các dạng nitrogenase thay thế so với quá trình khử proton bởi nitrogenase Mo. Mặc dù các nitrogenase thay thế khác biệt về mặt di truyền, nhưng về mặt cơ chế, chúng tương tự như nitrogenase Mo (Hamilton và cs., 2011); (Takimoto và cs., 2022); (Rivier và cs., 2023); (Zhang và cs., 2023). Thông qua phân tích hệ genome của chủng *Azotobacter* sp. NL3 bộc lộ sự có mặt của các gen *nif* và các gen chức năng khác liên quan đến quá trình cố định nito. Cùng với đó, phân tích hệ genome của chủng *Azotobacter* sp. NL3 cũng phát hiện sự có mặt của đa dạng 7 gen chức năng sinh tổng hợp IAA.

3.2.5. Phân loại và đánh giá an toàn sinh học của 2 chủng vi sinh vật tuyển chọn

Trình tự 16S rRNA của 2 chủng NL1 và *Azotobacter* sp. NL3 đã được đăng ký trên Genbank với các mã số truy cập lần lượt là: OR125575 và OR125577. Kết quả so sánh trình tự gen 16S rRNA (kích thước 1500 bp; mã số truy nhập trên GenBank: OR125575) của chủng NL1 thông qua dữ liệu chủng/loài chuẩn công bố trên EzBioCloud Database (<https://www.ezbiocloud.net/>) bộc lộ gần nhất (99,36%) với loài chuẩn *Azospirillum lipoferum* NCIMB 11861^T (Z29619). Dựa vào kết quả so sánh trình tự gen 16S rRNA, chủng NL1 được xác định gần nhất với loài *Azospirillum lipoferum* NL1 (OR125575). Đồng thời, kết quả lai DNA-DNA (DDH) trình tự genome giữa chủng NL1 (JAWPPG000000000) với *Azospirillum lipoferum* NCIMB 11861^T (VTTN000000000) thông qua Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) v3.0 bộc lộ mức độ 99,67% (Bảng 3.12). Kết quả lai này > 70% (giới hạn chặn về cùng loài đã phân loại có hiệu lực) (Jan và cs., 2013); (Volpiano và cs., 2021). Do vậy,

chủng NL1 được xác định là *Azospirillum lipoferum* NL1. Theo dữ liệu công bố ngân hàng chủng giống vi sinh vật Mỹ (ATCC: American Type Culture Collection), loài chuẩn *Azospirillum lipoferum* là đảm bảo an toàn sinh học cấp 1 (hình 3.8A).

Bảng 3.12. Kết quả lai genome của một số chủng NL1 và *Azotobacter* sp. NL3 với các loài gần nhất thông qua Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) v3.0

Loài chuẩn gần nhất	Giá trị lai genome (DDH, %)	
	<i>Azospirillum</i> sp. NL1 (PRJNA1031402)	<i>Azotobacter</i> sp. NL3 (PRJNA1031787)
<i>Azospirillum lipoferum</i> NCIMB 11861 ^T (VTTN0000000000)	99,67	-
<i>Azotobacter vinelandii</i> IAM 15004 ^T (BSFG01000000)	-	99,54

Ghi chú: -, khác chi (genus); DDH, DNA-DNA hybridization

ATCC

Search

Applications Cell Products Microbe Products Services Federal Solutions Resources About Us

Home > Microbe Products > Bacteriology and Archaea > 29707

SHARE

Azospirillum lipoferum (Beijerinck) Tarrand et al.

29707™

DOWNLOAD GENOME

LEARN ABOUT THE ATCC GENOME PORTAL >

93/100 Star Rating 51 Product Citations

Product category	Bacteria
Strain designation	VPI Sp 59b
Type strain	Yes
Genome sequenced strain	Yes
Isolation source	Wheat
Geographical isolation	Brazil; Rio de Janeiro
Applications	Agricultural research
Product format	Freeze-dried
Storage conditions	2°C to 8°C

SEE ADDITIONAL PRODUCT INFORMATION >

Buy Now

Our products are available through a distributor for your location

DETERMINE YOUR DISTRIBUTOR

ADD TO LIST

Documentation

- Product sheet
- Certificate of analysis
- Safety data sheet

BSL 1

Read more about safety information about this product +

Hình 3.8A. Dữ liệu loài chuẩn *Azospirillum lipoferum* công bố trên ATCC (Mỹ)

Tương tự, chủng *Azotobacter* sp. NL3 là chủng vi sinh vật an toàn sinh học cấp 1 (hình 3.8B). Trình tự gen chủng *Azotobacter* sp. NL3 (kích thước 1531 bp; mã số truy nhập trên GenBank: OR125577) có mức độ tương đồng 100% với *Azotobacter vinelandii* IAM 15004^T (AB175657). Lai trình tự genome giữa chủng NL3 (CP137764) và *Azotobacter vinelandii* IAM 15004^T (BSFG01000000) bộc lộ 99,54% (bảng 3.12). Chủng *Azotobacter* sp. NL3 được phân loại thuộc chi *Azotobacter*, với tên gọi là *Azotobacter vinelandii* NL3 (OR125577).

ATCC

Search

Applications Cell Products Microbe Products Services Federal Solutions Resources About Us

Home > Microbe Products > Bacteriology and Archaea > 478 [SHARE](#)

Azotobacter vinelandii Lipman

478TM

[DOWNLOAD GENOME](#)

[LEARN ABOUT THE ATCC GENOME PORTAL >](#)

Type strain

[94/100](#) [Bios Stars](#) [152 Product Citations](#)

Product category	Bacteria
Strain designation	NRS 16 [ATCC 8372]
Type strain	Yes
Genome sequenced strain	Yes
Applications	Agricultural research
Product format	Freeze-dried
Storage conditions	2°C to 8°C

[SEE ADDITIONAL PRODUCT INFORMATION >](#)

Buy Now

Our products are available through a distributor for your location

[DETERMINE YOUR DISTRIBUTOR](#)

[ADD TO LIST](#)

Documentation

- [Product sheet](#)
- [Certificate of analysis](#)
- [Safety data sheet](#)

BSL 1

[Read more about safety information about this product +](#)

Hình 3.8B. Dữ liệu loài chuẩn *Azotobacter vinelandii* công bố trên ATCC (Mỹ)

3.3. Sản xuất phân hữu cơ vi sinh từ một số chủng tuyển chọn

3.3.1. Sản xuất chế phẩm vi sinh

Sản xuất chế phẩm chứa các chủng vi sinh có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA là khâu quan trọng trong quy trình sản xuất phân bón hữu cơ vi sinh. Áp dụng quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh mã số **MREC-QTCN-2022-02**, đề tài tiến hành sản xuất mỗi chế phẩm 03 mẻ liên tiếp với công suất 50 kg/ mẻ. Tổng sản xuất 300 kg, trong đó chế phẩm 1 chứa chủng *Azospirillum* sp. NL1 và chế phẩm 2 chứa chủng *Azotobacter* sp. NL3. Chất lượng của chế phẩm sau sản xuất được thể hiện tại bảng 3.13.

Bảng 3.13. Chất lượng chế phẩm vi sinh từ quy trình MREC-QTCN-2022-02

TT	Loại chế phẩm chứa chủng vi sinh vật	Mật độ (CFU/g)	Vi sinh vật tạp nhiễm (CFU/g)	Độ ẩm (%)	Hoạt tính	
					Cố định nitơ (µg/ml)	Tổng hợp IAA (µg/ml)
1	<i>Azospirillum</i> sp. NL1	6,89 x10 ¹⁰	KPH	9,4 ^a	22,16 ^b	109,38 ^b
2	<i>Azotobacter</i> sp. NL3	9,69 x10 ¹⁰	KPH	9,5 ^a	24,61 ^a	119,13 ^a

Ghi chú: Trên cùng một cột, các giá trị có số mũ khác nhau thì khác nhau có nghĩa ở mức ý nghĩa $P < 0,05$.

Kết quả bảng 3.13 cho thấy, hoạt tính cố định nitơ và khả năng sinh tổng hợp IAA của chế phẩm chứa một chủng *Azospirillum* sp. NL1 và chế phẩm chứa chủng *Azotobacter* sp. NL3 là khác nhau nhưng đều đạt mật độ vi sinh vật $\geq 10^{10}$ CFU/g và đạt yêu cầu để sản xuất phân bón hữu cơ vi sinh theo thông tư 09/2019/TT-BNNPTNT ngày 27/8/2019 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (nay là Bộ Nông nghiệp và Môi trường) về ban hành quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia về chất lượng phân bón. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Hằng Nga và cs., (2016) khi nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh vật xử lý phế thải rắn sau chế biến tinh bột sắn làm phân hữu cơ sinh học, có mật độ vi sinh vật $\geq 10^7$ CFU/g.

3.3.2. Sản xuất phân hữu cơ vi sinh

Áp dụng quy trình sản xuất phân bón hữu cơ vi sinh mã số MREC-QTCN-2022-03, đề tài đã tiến hành sản xuất 5 mẻ liên tiếp, thu được 2.000 kg phân hữu cơ vi sinh, lấy mẫu ngẫu nhiên từ 3 mẻ để kiểm tra chất lượng phân bón so sánh với định mức được đưa ra bởi TCVN 7185:2002, kết

quả phân tích và so sánh các chỉ tiêu của phân bón hữu cơ vi sinh được thể hiện tại bảng 3.14.

Bảng 3.14. Chất lượng phân hữu cơ vi sinh 3 mẻ sản xuất

TT	Tên chỉ tiêu	Phương pháp thử	Kết quả phân tích			TCVN 7185:2002	Đánh giá
			Mẻ 1	Mẻ 2	Mẻ 3		
1	Độ chín (hoai) cần thiết	TCVN 7185:2002	Tốt	Tốt	Tốt	Tốt	Đạt
2	Kích thước hạt	TCVN 7185:2002	Đồng đều	Đồng đều	Đồng đều	Đồng đều	Đạt
3	Độ ẩm (%)	TCVN 9297:2012	25,33	25,38	25,34	≤35	Đạt
4	pH	TCVN 5979:2007	6,7	6,5	6,6	6,0 - 8,0	Đạt
5	Mật độ tế bào vi sinh vật nghiên cứu						
5.1	<i>Azospirillum</i> sp.NL1 (x10 ⁸ CFU/g)	TCVN 6166:2002	2,21	2,23	2,19	≥ 10 ⁶	Đạt
5.2	<i>Azotobacter</i> sp. NL3 (x10 ⁸ CFU/g)	TCVN 6166:2002	4,15	4,16	4,14	≥ 10 ⁶	Đạt
6	Chất hữu cơ tổng số	TCVN 9294:2012	36,15	36,19	36,2	≥ 22	Đạt
7	Hàm lượng nitơ tổng số	TCVN 8557:2010	2,72	2,69	2,72	≥2,5	Đạt
8	Hàm lượng lân hữu hiệu (%P ₂ O ₅)	TCVN 8559:2010	3,67	3,7	3,7	≥2,5	Đạt
9	Hàm lượng kali hữu hiệu (%K ₂ O)	TCVN 8560:2018	1,77	1,79	1,78	≥1,5	Đạt
10	Mật độ tế bào vi sinh vật <i>Salmonella</i> (CFU/25g)	TCVN 10780-1:2017	KPH	KPH	KPH	0	Đạt
11	Hàm lượng chì (mg/kg)	TCVN 9290:2012	118,12	118,16	118,17	≤ 200	Đạt
12	Hàm lượng cadimi (mg/kg)	TCVN 9291:2012	1,19	1,24	1,26	≤ 2,5	Đạt
13	Hàm lượng crom (mg/kg)	TCVN 10674:2015	97,73	97,79	97,82	≤ 200	Đạt
14	Hàm lượng niken (mg/kg)	TCVN 10675:2015	38,61	38,57	38,56	≤100	Đạt
15	Hàm lượng thủy ngân (mg/kg)	TCVN 10676:2015	0,19	0,17	0,18	≤ 2	Đạt

Kết quả bảng 3.14 cho thấy, phân hữu cơ vi sinh được sản xuất từ 3 mẻ có chất lượng tương đương nhau, không có sự sai khác chứng tỏ quy trình sản xuất ổn định nên chất lượng sản phẩm sản xuất ổn định và đảm bảo chất lượng. Chỉ tiêu cảm quan và kết quả phân tích các chỉ tiêu chất lượng và chỉ tiêu an toàn của phân hữu cơ vi sinh sản xuất đều đạt yêu cầu của tiêu chuẩn TCVN 7185:2002 về phân hữu cơ vi sinh vật. Kết quả nghiên cứu của chúng

tôi phù hợp với nghiên cứu của (Phạm Văn Toàn, 2017) về phân hữu vi sinh phải đảm bảo một số chỉ tiêu bắt buộc: ẩm độ đối với phân bón dạng bột $\leq 30\%$; hàm lượng hữu cơ tổng số $\geq 15\%$; mật độ mỗi chủng vi sinh vật có ích $\geq 1 \times 10^6$ CFU/g; Nguyễn Thị Như Nguyệt và cs., (2017), nghiên cứu chế phẩm vi sinh sản xuất phân hữu cơ từ bùn thải ngành bia cho biết mật độ vi sinh vật cố định đạt 2×10^8 CFU/g.

3.3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của liều lượng sử dụng phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa và cây ngô

3.3.3.1. Kết quả nghiên cứu liều lượng phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa

Năng suất của cây trồng nói chung, cây lúa nói riêng là kết quả của một vụ sản xuất. Năng suất cao hay thấp thể hiện tác động tổng hợp của các yếu tố nội tại với điều kiện môi trường và kỹ năng trồng trọt, trong đó liều lượng bón phân có ảnh hưởng đáng kể đến năng suất lúa, ảnh hưởng đến các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển. Qua nghiên cứu các công thức bón phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa SUMO tại xã Hợp Thành, tỉnh Thái Nguyên thu được kết quả thể hiện ở bảng 3.15 và 3.16.

Bảng 3.15. Ảnh hưởng của liều lượng phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa vụ xuân

STT	Công thức	Liều lượng bón phân HCVS (tấn/ha)	Số bông hữu hiệu/m ²	Số hạt/bông	Số hạt chắc/bông	Tỷ lệ hạt chắc (%)	P1000 hạt (g)	NSLT (tạ/ha)	NSTT (tạ/ha)
1	ĐC	0	235,13 ^b	158,00 ^c	122,50 ^a	77,53	23,50	67,69	54,12 ^c
2	CT1	1,0	246,60 ^{ab}	165,30 ^d	124,10 ^a	75,08	24,12	73,81	59,05 ^b
3	CT2	1,5	250,60 ^a	167,37 ^c	130,00 ^a	77,67	24,48	79,75	63,81 ^a
4	CT3	2,0	251,60 ^a	169,00 ^b	130,00 ^a	76,92	24,49	80,10	64,07 ^a
5	CT4	2,5	251,80 ^a	170,30 ^a	130,00 ^a	76,34	24,50	80,20	64,13 ^a
CV (%)			2,86	0,3	3,81	-	-	-	3,73
LSD _{0,05}			13,32	0,96	9,14	-	-	-	3,28

Ghi chú: Trong cùng một cột, những giá trị trung bình có chữ cái khác nhau thì sai khác có ý nghĩa thống kê $P < 0,05$

Từ kết quả ở bảng 3.15 cho thấy, tất cả các công thức sử dụng phân bón hữu cơ vi sinh đều cho năng suất lúa cao hơn so với đối chứng, giữa các công thức thí nghiệm với liều lượng phân bón khác nhau cho năng suất khác nhau. Cụ thể một số chỉ tiêu cơ bản như sau:

- Chỉ tiêu số bông hữu hiệu/m²: 4 công thức thí nghiệm sử dụng phân hữu cơ vi sinh cho kết quả số bông hữu hiệu/m² dao động từ 246,60-251,80 (bông/m²), ở công thức đối chứng là 235,13 (bông/m²) ở vụ xuân. Từ công thức bón phân hữu cơ vi sinh với mức 1,5-2,5 tấn/ ha có số bông hữu hiệu/m², cao hơn hẳn công thức đối chứng. Sự sai khác này có ý nghĩa ở mức thống kê $P < 0,05$.

- Chỉ tiêu số hạt chắc/bông: Kết quả 4 công thức thí nghiệm sử dụng phân hữu cơ vi sinh cho kết quả số hạt chắc/bông cao hơn đối chứng, song sự sai khác không có sự sai khác thống kê $P \geq 0,05$.

- Khối lượng nghìn hạt (P1000) giữa các công thức thí nghiệm có sự khác nhau, song sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê $P \geq 0,05$. Điều đó chứng tỏ giống sử dụng trong nghiên cứu tương đối ổn định về mặt di truyền, dinh dưỡng cơ bản cung cấp cho cây khá đầy đủ.

- Chỉ tiêu năng suất lý thuyết (NSLT): Có sự khác biệt giữa các công thức thí nghiệm CT2, CT3, CT4 với CT1 và đối chứng. NSLT giữa các CT2, CT3, CT4 có sự khác, tương ứng với 79,75; 80,1; 80,2 tạ/ha; cao hơn so với công thức đối chứng (không bón phân HCVS, canh tác theo tập quán) từ 16 - 24,25%.

- Chỉ tiêu năng suất thực thu (NSTT): CT2, CT3 và CT4 cho kết quả cao hơn CT1 và đối chứng, sự sai khác này có ý nghĩa thống kê $P < 0,05$. NSTT giữa các CT2, CT3, CT4 có sai khác nhưng không có ý nghĩa ở mức thống kê $P \geq 0,05$.

Bảng 3.16. Ảnh hưởng của liều lượng phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa vụ mùa

STT	Công thức	Liều lượng bón phân HCVS (tấn/ha)	Số bông hữu hiệu/m ²	Số hạt/bông	Số hạt chắc/bông	Tỷ lệ hạt chắc (%)	P1000 hạt (g)	NSLT (tạ/ha)	NSTT (tạ/ha)
1	ĐC	0	233,13 ^b	163,93 ^a	106,87 ^b	65.19	23,10	57,55	46,03 ^c
2	CT1	1,0	244,67 ^{ab}	165,40 ^a	110,00 ^b	66.51	23,80	64,05	51,23 ^b
3	CT2	1,5	250,40^a	167,70^a	119,00^a	70.96	24,00	71,51	57,19^a
4	CT3	2,0	250,60 ^a	169,00 ^a	119,13 ^a	70.49	24,00	71,65	57,30 ^a
5	CT4	2,5	250,67 ^a	170,53 ^a	119,40 ^a	70.02	24,00	71,83	57,44 ^a

CV (%)	3,26	3,67	3,15	-	-	-	4,91
LSD _{0,05}	15,08	11,56	6,81	-	-	-	4,98

Ghi chú: Trong cùng một cột, những giá trị trung bình có chữ cái khác nhau thì sai khác có ý nghĩa thống kê $P < 0,05$

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.16 cho thấy, chỉ tiêu số bông hữu hiệu/m²: 4 công thức thí nghiệm sử dụng phân hữu cơ vi sinh cho kết quả số bông hữu hiệu/m² dao động từ 244,64-251,8 (bông/m²), trong đó tại CT2, CT3 và CT4 tương ứng với mức bón phân hữu cơ vi sinh lần lượt là 1,5 -2,5 tấn/ ha có số bông hữu hiệu/m² cao hơn hẳn đối chứng. Sự sai khác này có ý nghĩa ở mức thống kê $P < 0,05$.

- Chỉ tiêu số hạt chắc/bông: Kết quả CT2, CT2 và CT4 cho kết quả số hạt chắc/bông cao hơn CT1 và đối chứng, sự sai khác này có ý nghĩa thống kê $P < 0,05$.

- Khối lượng nghìn hạt (P1000) giữa các công thức thí nghiệm có sự khác nhau, song sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê $P \geq 0,05$.

- Chỉ tiêu năng suất thực thu (NSTT): CT2, CT3 và CT4 cho kết quả cao hơn hẳn CT1 và đối chứng, sự sai khác này có ý nghĩa thống kê $P < 0,05$. NSTT giữa các CT2, CT3, CT4 có sai khác nhưng không có ý nghĩa ở mức thống kê $P \geq 0,05$.

Như vậy, NSTT của CT2, CT3, CT4 ở cả vụ xuân và vụ mùa đều đạt cơ hơn hẳn CT1 và đối chứng. NSTT giữa CT2, CT3 và CT4 không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê $P \geq 0,05$. Như vậy, xét về mức độ đầu tư và năng suất thu được ở cả vụ xuân và vụ mùa thì với mức bón phân hữu cơ vi sinh 1,5 tấn/ha tại công thức 2 (CT2) đạt hiệu quả cao nhất nên được lựa chọn để triển khai nhân rộng mô hình và đánh giá hiệu quả kinh tế ở các thí nghiệm tiếp theo.

3.3.3.2. Kết quả nghiên cứu liều lượng phân hữu cơ vi sinh trên cây ngô

Qua nghiên cứu các công thức bón phân hữu cơ vi sinh trên cây ngô cho thấy liều lượng phân hữu cơ vi sinh là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến cấu

thành năng suất của ngô ở vụ xuân và vụ mùa kết quả chi tiết thể hiện ở bảng 3.17 và 3.18.

Theo Hà Thị Thanh Bình và cs. (2011) số bắp hữu hiệu, số hàng/bắp, số hạt/hàng và khối lượng 1000 hạt một mặt phụ thuộc vào đặc điểm của giống, nhưng mức độ thâm canh cũng có thể phát huy tác dụng. Kết quả nghiên cứu tại bảng 3.17 và 3.18 cho thấy rõ điều này.

Số bắp hữu hiệu/cây: Kết quả bảng 3.17 và 3.18 cho thấy, số bắp hữu hiệu /cây của các công thức bón phân hữu cơ vi sinh và đối chứng có khác nhau song sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê $P \geq 0,05$.

Bảng 3.17. Ảnh hưởng của liều lượng phân hữu cơ vi sinh trên cây ngô vụ xuân

ST T	Côn g thức	Liều lượng bón phân HCVS (tấn/ha)	Số bắp hữu hiệu/ cây (bắp)	Số hàng /bắp (hàng)	Số hạt/ hàng (hạt)	P1000 (gam)	NSLT (tạ/ha)	NSTT (tạ/ha)
1	ĐC	0	0,93 ^a	12,5 ^c	31,63 ^a	357,03	78,77	55,12 ^c
2	CT1	1,0	0,96 ^a	12,6 ^b	31,86 ^a	376,03	86,95	60,86 ^b
3	CT2	1,5	0,97 ^a	12,6 ^b	33,27 ^a	377,03	91,99	62,43 ^b
4	CT3	2,0	0,98^a	12,6^b	33,13^a	389,77	95,67	66,94^a
5	CT4	2,5	0,98 ^a	12,7 ^a	33,23 ^a	390,03	96,79	67,74 ^a
CV (%)			3,74	9,11	9,98	-	-	3,08
LSD _{0,05}			0,07	22	6,13	-	-	3,63

Ghi chú: Trong cùng một cột, những giá trị trung bình có chữ cái khác nhau thì sai khác có ý nghĩa thống kê $P < 0,05$

Số hàng/bắp: Khác với các chỉ tiêu khác, số hàng/bắp không phụ thuộc vào điều kiện tự nhiên mà chỉ phụ thuộc vào giống và được quyết định trong quá trình hình thành hoa cái. Số hàng/bắp của các công thức thí nghiệm CT1, CT2, CT3, CT4 ở cả 2 vụ tương đương nhau, đạt từ 12,6 - 12,7. Số hạt/hàng

31,86-33,23 hạt/ hàng (vụ xuân - sai khác không có ý nghĩa so với đối chứng $P \geq 0,05$); Ở vụ mùa đạt 31,9-33,06 hạt/hàng (sai khác có ý nghĩa thống kê $P < 0,05$).

Khối lượng 1.000 hạt: Kết quả thí nghiệm cho thấy khối lượng 1.000 hạt ở các công thức đều cao hơn đối chứng, dao động từ 376,03 - 390,03 gam vụ xuân và 354,06 - 361,86 gam ở vụ mùa, trong đó khối lượng đạt cao nhất ở CT3 và CT4 ở cả 2 vụ xuân và vụ mùa.

- Đối với NSTT của các công thức và đối chứng ở vụ xuân đều cao hơn vụ mùa, trong đó CT3, CT4 ở cả 2 vụ xuân và mùa đều đạt cao nhất (61,46 -67,74 tạ/ha) cao hơn hẳn CT1, CT2 và đối chứng. Sự sai khác này có ý nghĩa thống kê $P < 0,05$.

Bảng 3.18. Ảnh hưởng của liều lượng phân HCVS trên cây ngô vụ mùa

ST T	Côn g thức	Liều lượng bón phân HCVS (tấn/ha)	Số bắp hữu hiệu/ cây (bắp)	Số hàng /bắp (hàng)	Số hạt/ hàng (hạt)	P1000 (gam)	NSLT (tạ/ha)	NSTT (tạ/ha)
1	ĐC	0	0,92 ^a	12,5 ^c	30,51 ^d	348,62	73,39	51,39 ^c
2	CT1	1,0	0,94 ^a	12,6 ^b	31,9 ^c	354,06	80,26	56,20 ^b
3	CT2	1,5	0,95 ^a	12,6 ^b	32,33 ^b	354,06	82,21	57,56 ^{ab}
4	CT3	2,0	0,98^a	12,7^a	32,82^a	361,86	88,69	61,46^a
5	CT4	2,5	0,97 ^a	12,7 ^a	33,06 ^a	361,78	88,40	61,90 ^a
CV (%)			3,46	0	0,44	-	-	4,07
LSD _{0,05}			0,06	0	0,27	-	-	4,42

Ghi chú: Trong cùng một cột, những giá trị trung bình có chữ cái khác nhau thì sai khác có ý nghĩa thống kê $P < 0,05$

Như vậy, tất cả các công thức sử dụng phân bón hữu cơ vi sinh ở cả vụ xuân và vụ mùa đều cho năng suất ngô cao hơn so với đối chứng ở mức sai

khác có ý nghĩa thống kê $P < 0,05$. NSTT của CT3 và CT4 đạt năng suất cao nhất nhưng NSTT giữa CT3 và CT4 không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê $P \geq 0,05$. Như vậy, xét về mức độ đầu tư và năng suất thu được ở cả vụ xuân và vụ mùa thì với mức bón phân hữu cơ vi sinh 2,0 tấn/ha tại công thức 3 (CT3) đạt hiệu quả cao nhất nên được lựa chọn để triển khai nhân rộng mô hình và đánh giá hiệu quả kinh tế ở các thí nghiệm tiếp theo.

3.4. 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)

3.4.1. Đánh giá năng suất mô hình sử dụng phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa và ngô

3.4.1.1. Năng suất mô hình sử dụng phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa

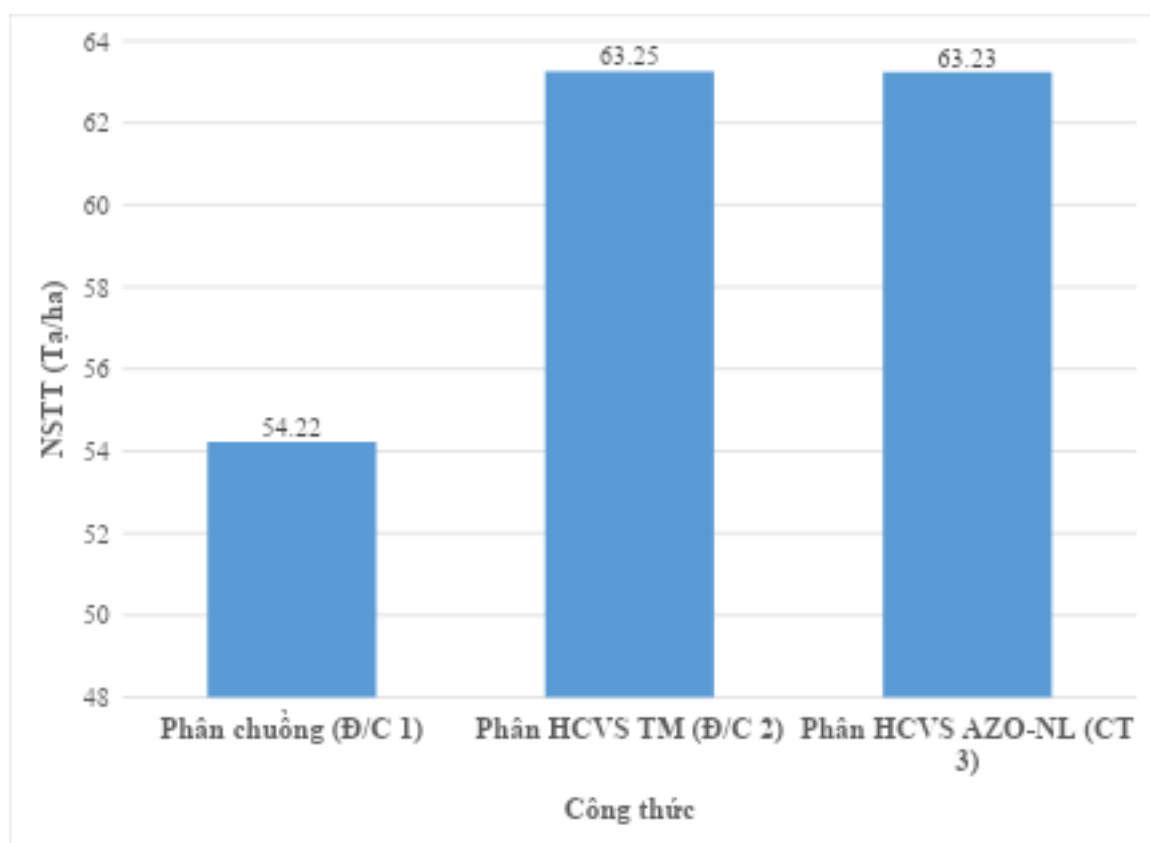
Năng suất lúa được tạo thành bởi 4 yếu tố: số bông/m²; số hạt/bông; tỷ lệ số hạt chắc/ bông và khối lượng 1000 hạt (Nguyễn Ngọc Đệ, 2008). Đây là một kết quả tổng hợp quan trọng để đánh giá hiệu quả sản xuất của đối tượng cây trồng. Kết quả theo dõi một số chỉ tiêu cấu thành năng suất của giống lúa nghiên cứu trình bày ở bảng 3.19 cho thấy, số bông/m², số hạt chắc/ bông và tỷ lệ hạt chắc, năng suất thực thu giữa công thức sử dụng phân hữu cơ vi sinh công thức 2, công thức 3 đều cao hơn công thức 1 sử dụng phân chuồng hoai mục và sự sai khác này có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Các chỉ tiêu cấu thành năng suất theo dõi giữa công thức 2 và công thức 3 sử dụng phân hữu cơ vi sinh không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P \geq 0,05$).

Bảng 3.19. Năng suất mô hình sử dụng phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa

Chỉ tiêu Công thức	Số bông/m ² (bông)	Số hạt/ bông (hạt)	Số hạt chắc/ bông (hạt)	Tỷ lệ hạt chắc (%)	P100 0 hạt (g)	Thời gian sinh trưởng (ngày)	NSLT (tạ/ha)	NSTT (tạ/ha)
Công thức 1 (Đ/C 1)	236,00 ^b	163,13 ^a	122,20 ^b	74,91	23,50 ^a	115,00	67,77	54,22 ^b

Công thức 2 (Đ/C 2)	251,20 ^a	168,00 ^a	129,00 ^a	76,79	24,40 ^a	115,00	79,07	63,25 ^a
Công thức 3 (AZO-NL)	250,20 ^a	168,00 ^a	130,00 ^a	77,38	24,30 ^a	115,00	79,04	63,23 ^a
CV (%)	2,2	2,1	2,2	-	5,0	-	-	5,6
LSD _{0,05}	12,2	8,0	6,5	-	2,8	-	-	7,7

Ghi chú: Trong cùng một cột, những giá trị trung bình có chữ cái khác nhau thì sai khác có ý nghĩa thống kê $P < 0,05$. Công thức 1: bón phân chuồng hoai mục, công thức 2: bón phân hữu cơ vi sinh thương mại, công thức 3: bón phân hữu cơ vi sinh AZO-NL.



Hình 3.9. Năng suất lúa sử dụng phân bón AZO-NL

Các yếu tố cấu thành năng suất chịu sự tác động của điều kiện ngoại cảnh cũng như đặc tính di truyền của giống, kỹ thuật trồng trọt, dinh dưỡng. Trong các yếu tố đó, dinh dưỡng hay phân bón là yếu tố quan trọng ảnh

hưởng đến các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất của giống lúa Sumo. Kết quả bảng 3.19 và hình 3.9 cho thấy các chỉ tiêu số bông, số hạt, khối lượng P1000 hạt, NSLT và NSTT của mô hình ruộng thí nghiệm sử dụng phân hữu cơ vi sinh (AZO-NL) và phân hữu cơ vi sinh thương mại đều cao hơn mô hình ruộng đối chứng. Cụ thể:

- Về số bông/m²: Khi sử dụng phân hữu cơ vi sinh (AZO-NL) tại ruộng mô hình đạt 250,20 (bông/m²) cao hơn so với ruộng đối chứng 1 (236,00 bông/m²) và tương đương so với đối chứng 2 (251,20 bông/m²), sự sai khác của công thức 3 và công thức 2 với đối chứng có ý nghĩa thống kê $P < 0,05$.

- Số hạt chắc/bông ảnh hưởng trực tiếp đến năng suất lúa, là sự tổng hợp tất cả các yếu tố sinh trưởng, phát triển, chiều cao cây, diện tích lá, khối lượng chất khô tích lũy. Kết quả Bảng 3.19 cho thấy ruộng bón phân hữu cơ vi sinh (AZO-NL) đạt 130,00 hạt chắc/bông cao hơn ruộng đối chứng 1 đạt 122,20 hạt chắc/bông và tương đương so với đối chứng 2 (129,00 hạt chắc/bông). Nếu xét về tỷ lệ hạt chắc/bông, ruộng mô hình bón phân hữu cơ vi sinh (AZO-NL) có tỷ lệ % hạt chắc đạt (77,38%), cao hơn ruộng đối chứng 1 (đạt 74,91%) và đối chứng 2 (76,79%).

- Về khối lượng 1.000 hạt: khối lượng nghìn hạt của cả ruộng mô hình bón phân hữu cơ vi sinh (AZO-NL), ruộng đối chứng 2 và đối chứng 1 có sự khác nhau, lần lượt là 24,30; 24,40 và 23,50 gam. Sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê $P \geq 0,05$.

- Năng suất thực thu của mô hình ruộng sử dụng phân hữu cơ vi sinh (AZO-NL) và mô hình ruộng đối chứng sử dụng phân bón hữu cơ vi sinh thương mại tương đương nhau, năng suất lần lượt là 63,23 và 63,25 tạ/ha, không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê $P \geq 0,05$. Tuy nhiên cả 2 mô hình

trên đều có năng suất cao hơn hẳn mô hình đối chứng sử dụng phân chuồng hoai mục, không sử dụng phân hữu cơ vi sinh với năng suất chỉ đạt 54,22 tạ/ha và sự sai khác này có ý nghĩa mức thống kê $P < 0,05$. Năng suất thực thu của mô hình ruộng sử dụng phân hữu cơ vi sinh (AZO-NL) tăng 16,62% so với ruộng không sử dụng hữu cơ vi sinh. Như vậy, phân hữu cơ vi sinh có tác dụng cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng, kích thích sinh trưởng của cây trồng, giúp cây phát triển và sinh trưởng tốt từ đó cho năng suất và hiệu quả cao hơn.

Kết quả nghiên cứu về năng suất thực tế của chúng tôi tương đương với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Anh Huy và Nguyễn Hữu Hiệp (2018) khi nghiên cứu phân hữu cơ vi sinh ở điều kiện ngoài đồng cho kết quả tăng năng suất lúa được 10 - 30%; Rajasekar và cs., (2022) cho thấy, việc sử dụng các loại vi sinh vật cố định đạm như *Azospirillum*, *Azotobacter* kết hợp với phân bón hữu cơ đã giúp tăng năng suất lúa từ 15-20% so với phương pháp canh tác truyền thống. Tuy nhiên, kết quả của chúng tôi thấp hơn kết quả nghiên cứu của Ngô Thanh Phong và cs. (2012) cho thấy chủng *Pseudomonas* sp. BT1 và BT2 có thể thay thế 50-75% phân đạm cho giống lúa OM2517, tăng năng suất tới 23,90%. Kết quả thấp hơn này có thể do đối tượng phân bón hữu cơ vi sinh của chúng tôi chứa chủng vi sinh vật khác với chủng Ngô Thanh Phong và cs hoặc do đối tượng giống lúa khác nhau, điều kiện thí nghiệm ở 2 vùng khác nhau nên có kết quả khác nhau. Tuy nhiên với việc sử dụng phân bón hữu cơ vi sinh của đề tài giúp tăng năng suất lúa lên 16,62% sẽ mang lại hiệu quả cao cho người trồng lúa tại địa phương.

3.4.1.2. Năng suất mô hình sử dụng phân hữu cơ vi sinh trên cây ngô

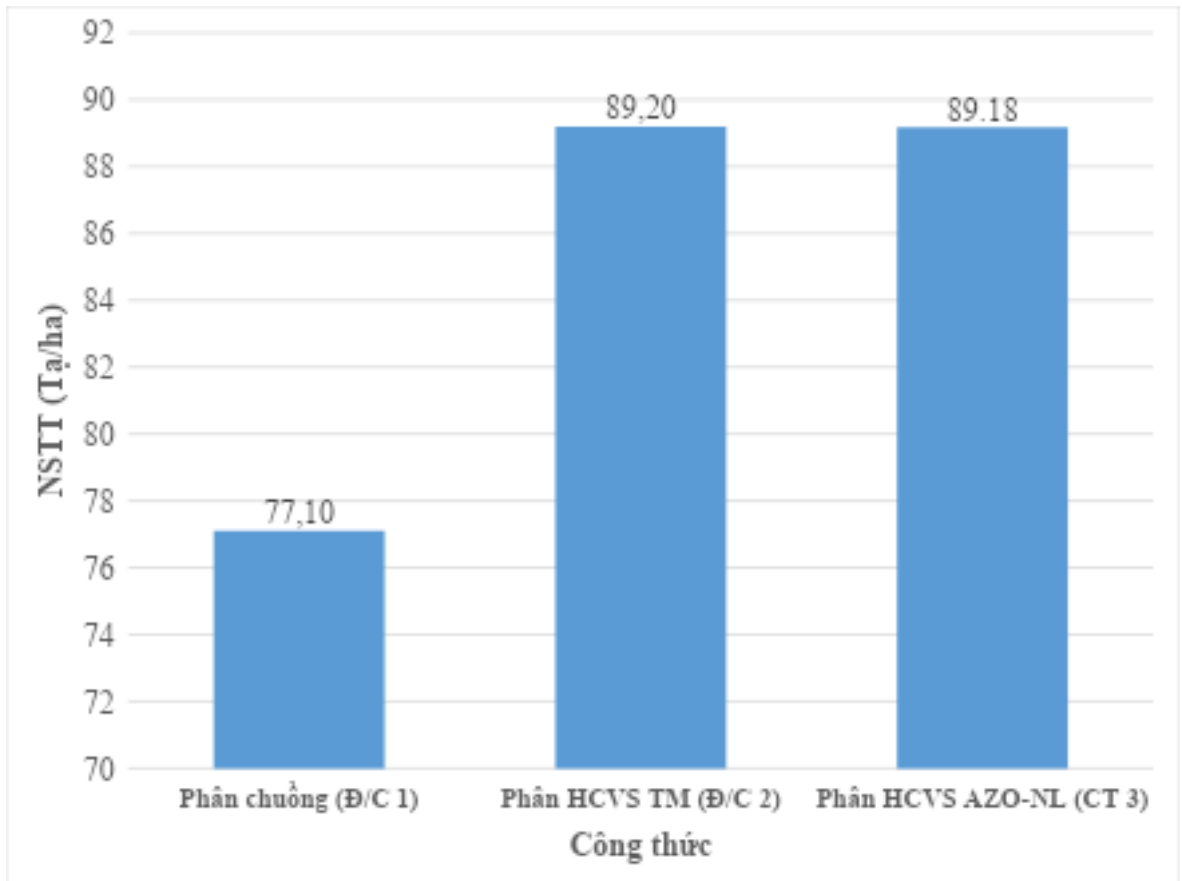
Năng suất ngô phụ thuộc trực tiếp vào các yếu tố cấu thành như: số bắp trên cây, số hàng hạt trên bắp, số hạt trên hàng và khối lượng 1.000 hạt. Các yếu tố cấu thành năng suất có thể được quyết định bởi tính di truyền của giống và chịu ảnh hưởng của các yếu tố ngoại cảnh như: Thời tiết, khí hậu, đất đai, kỹ thuật canh tác, chế độ chăm sóc và phòng trừ sâu bệnh. Trong điều kiện thời tiết không thuận lợi cho ngô phát triển, kỹ thuật canh tác, chăm sóc không hợp lý sẽ làm giảm đáng kể giá trị của các yếu tố cấu thành năng suất làm cho năng suất ngô giảm.

Theo Zhang và cs. (2023), việc sử dụng các sản phẩm vi sinh vật đã giúp cải thiện sức khỏe đất, tăng khả năng chống chịu của cây lúa đối với các bệnh hại và điều kiện bất lợi. Kết quả nghiên cứu năng suất mô hình sử dụng phân hữu cơ vi sinh trên ngô thể hiện tại bảng 3.20.

Bảng 3.20. Năng suất mô hình sử dụng phân hữu cơ vi sinh trên cây ngô

Chỉ tiêu Công thức	Mật độ (cây/ha)	Số bắp/cây (bắp)	Số hàng hạt/bắp (hàng)	Số hạt / hàng (hạt)	Số hạt/bắp (hạt)	Khối lượng 1000 hạt (gam)	NSLT (tạ/ha)	NSTT (tạ/ha)
Công thức 1 (Đ/C 1)	60.000	1	14	32,00 ^b	448,00 ^b	358,50 ^b	96,37	77,10 ^b
Công thức 2 (Đ/C 2)	60.000	1	14	35,00 ^a	478,00 ^a	390,30 ^a	114,78	89,20 ^a
Công thức 3 (AZO-NL)	60.000	1	14	34,00 ^{ab}	470,30 ^{ab}	390,40 ^a	111,48	89,18 ^a
CV (%)	-	-	-	3,00	2,50	1,50	-	2,90
LSD _{0,05}	-	-	-	2,30	26,40	130	-	5,70

Ghi chú: Trong cùng một cột, những giá trị trung bình có chữ cái khác nhau thì sai khác có ý nghĩa thống kê $P < 0,05$. CT1: bón phân chuồng hoai mục, CT2: bón phân hữu cơ vi sinh thương mại, CT3: bón phân hữu cơ vi sinh AZO-NL.



Hình 3.10. Năng suất ngô sử dụng phân bón AZO-NL

Kết quả bảng 3.20 cho thấy các chỉ tiêu số hạt/ bắp, khối lượng P1.000 hạt, NSLT và NSTT của mô hình ruộng thí nghiệm sử dụng phân hữu cơ vi sinh (AZO-NL) và phân hữu cơ vi sinh thương mại đều cao hơn mô hình ruộng đối chứng không sử dụng phân hữu cơ vi sinh.

Năng suất thực tế của mô hình ruộng sử dụng phân hữu cơ vi sinh (AZO-NL) và mô hình ruộng đối chứng sử dụng phân bón hữu cơ vi sinh thương mại tương đương nhau, năng suất lần lượt là 89,18 và 89,20 tạ/ha, không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê $P \geq 0,05$. Tuy nhiên cả 2 mô hình trên đều có năng suất cao hơn hẳn mô hình đối chứng sử dụng phân chuồng hoai mục, không sử dụng phân hữu cơ vi sinh với năng suất chỉ đạt 77,10 tạ/ha và sự sai khác này có ý nghĩa mức thống kê $P < 0,05$. Năng suất thực thu của mô hình ruộng sử dụng phân hữu cơ vi sinh (AZO-NL) tăng

15,67% so với ruộng không sử dụng phân hữu cơ vi sinh và tương đương với năng suất ruộng sử dụng phân phân hữu cơ vi sinh thương mại.

Kết quả nghiên cứu năng suất thực thu của ngô khi sử dụng phân bón hữu cơ vi sinh (AZO-NL) phù hợp với nghiên cứu của nhóm tác giả Patel và cs. (2022) tại Ấn độ, cho kết quả sử dụng phân hữu cơ vi sinh tăng năng suất ngô lên đến 18%; Müller và cs. (2021) sử dụng phân bón hữu cơ vi sinh vật giúp tăng năng suất ngô lên 15-25%.

3.4.2. Đánh giá hiệu quả kinh tế mô hình sử dụng phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa và ngô

3.4.2.1. Đánh giá hiệu quả hiệu quả kinh tế mô hình sử dụng phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa

Hiệu quả kinh tế được đánh giá thông qua 2 chỉ tiêu tổng thu và tổng chi. Tổng thu được xác định bằng (năng suất thực thu $\times$ giá bán), tổng chi được tính trên chi phí công lao động, vật tư, phân bón. Kết quả tính toán hiệu quả kinh tế sản xuất lúa sử dụng phân HCVS AZO-NL theo đơn giá tại Quyết định số 726/QĐ-BNN-KN, ngày 24/2/2022 của Bộ Nông nghiệp và PTNT về việc ban hành định mức kinh tế kỹ thuật khuyến nông trung ương, được tổng hợp trong bảng 3.21.

Sau khi thu hoạch lúa tại ruộng đối chứng và ruộng mô hình, tiến hành phơi khô, quạt sạch sản lượng lúa thu được, cân đo đong đếm, tính theo giá trị thị trường của thóc do thương lái thu mua tại địa phương để tính ra giá trị sản phẩm sau khi kết thúc mùa vụ. Kết hợp với số liệu ghi chép về các khoản chi cho việc thực hiện mô hình cũng như các khoản chi của người dân cho ruộng đối chứng 1 và đối chứng 2, chúng tôi đã tổng hợp được chi phí (tổng chi) và lợi nhuận khi triển khai tại ruộng đối chứng và khi triển khai tại ruộng mô hình.

Kết quả bảng 3.21 cho thấy, chi phí đầu tư cho sản xuất 1 ha lúa (Sumo) tại ruộng đối chứng 1 chỉ sử dụng phân hữu cơ (phân chuồng) là 46.952.000 đồng. Năng suất thực thu là 54,22 tạ/ha với tổng doanh thu là 65.064.000 đồng đã cho lợi nhuận là 18.112.000 đồng/ha. Đối với mô hình sử dụng phân chuồng có số lần sử dụng thuốc BVTV tăng gấp 2 lần, chi phí cho thuê nhân công phun thuốc trừ cỏ (2 lần) không những làm tăng chi phí sản xuất mà còn gây nguy cơ ảnh hưởng tiêu cực đến môi trường sinh thái cũng như sức khỏe của người sản xuất. Tuy nhiên, cũng do sử dụng thuốc trừ cỏ mà bớt đi công lao động cho việc nhổ (nhặt cỏ) trên ruộng đối chứng. Điều này đã làm giảm công lao động cho người sản xuất, nhưng cũng sẽ làm ảnh hưởng không nhỏ đến sự cân bằng sinh thái cũng như hệ vi sinh vật có lợi trong đất sản xuất.

Chi phí đầu tư cho sản xuất 1 ha lúa (Sumo) tại ruộng mô hình khi sử dụng phân hữu cơ vi sinh (AZO-NL) là 47.702.000 đồng, cao hơn so với chi phí của ruộng đối chứng là 750.000 đồng (tương đương với 1,6%). Sự tăng lên của mức chi này là do tại ruộng mô hình không sử dụng thuốc trừ cỏ, do vậy sẽ tốn thêm chi phí cho 60 công lao động cho việc nhặt (nhỏ) 2 lần cỏ tại ruộng. Tuy nhiên, việc không sử dụng thuốc trừ cỏ và giảm 1 lần phun thuốc BVTV đã góp phần bảo vệ môi trường sinh thái và sức khỏe của người lao động, đồng thời giúp cho hệ vi sinh vật đất được phát triển cân bằng và ổn định, giúp cho đất màu mỡ hơn. Nhờ vậy đã giúp cho năng suất thực thu đạt 63,23 tạ/ha và tổng doanh thu đạt 75.876.000 đồng, cho lợi nhuận là 28.174.000 đồng/ha (cao hơn đối chứng 1,56 lần).

Từ kết quả triển khai mô hình có thể thấy, năng suất lúa tại ruộng mô hình sử dụng phân hữu cơ (AZO-NL) cao hơn năng suất lúa tại ruộng đối chứng 1 là 16,62%, lợi nhuận mang lại cao hơn so với đối chứng 1,56 lần. Nguyên nhân là khi sử dụng PHCVS với liều lượng tối ưu 1.500 kg/ha đã tối

ưu hóa dinh dưỡng giúp lúa Sumo phát triển tốt hơn, số bông nhiều hơn, số hạt chắc/bông nhiều hơn nên NSTT cao hơn đạt 63,23 tạ/ha, mang lại hiệu quả hơn.

Nếu chỉ tính riêng chi phí cho phân bón thì ruộng mô hình sử dụng phân hữu cơ chi phí ít hơn 2.000.000 đồng/ha so với ruộng đối chứng 1 và ít hơn 1.500.000 đồng/ha với ruộng đối chứng 2. Lý do là khi sử dụng phân hữu cơ vi sinh với liều lượng tối ưu 1.500 kg/ha mà không cần sử dụng đến phân hữu cơ (phân chuồng) đã làm giảm chi phí về phân bón, đồng thời phân HCVS TM có giá thành cao hơn phân hữu cơ vi sinh (AZO-NL) khoảng 1.000 đồng/kg.

Bảng 3.21. Kết quả đánh giá hiệu quả kinh tế mô hình sử dụng phân hữu cơ vi sinh trên cây lúa*ĐVT: đồng*

TT	Danh mục hạch toán	Đơn vị tính	Công thức 1 (Đ/C 1)			Công thức 2 (Đ/C 2)			Công thức 3		
			Số lượng	Đơn giá	Thành tiền	Số lượng	Đơn giá	Thành tiền	Số lượng	Đơn giá	Thành tiền
			46.952.000			49.202.000			47.702.000		
I	Tổng chi										
1	Giống	kg	35	35.000	1.225.000	35	35.000	1.225.000	35	35.000	1.225.000
2	Đạm	kg	271	15.000	4.065.000	271	15.000	4.065.000	271	15.000	4.065.000
3	Lân	kg	360	6.000	2.160.000	360	6.000	2.160.000	360	6.000	2.160.000
4	Kali	kg	116	22.000	2.552.000	116	22.000	2.552.000	116	22.000	2.552.000
5	Phân hữu cơ	kg	8.000	1.000	8.000.000	-	-	-	-	-	-
6	Phân hữu cơ vi sinh	kg	-	-	-	1.500	5.000	7.500.000	1.500	4.000	6.000.000
7	Thuốc BVTV	gói	125	20.000	2.500.000	65	20.000	1.300.000	65	20.000	1.300.000
8	Trừ cỏ	lần	2	400.000	800.000						
9	Sục bùn					1	400.000	400.000	1	400.000	400.000
10	Công lao động	công	171	150.000	25.650.000	200	150.000	30.000.000	200	150.000	30.000.000

TT	Danh mục hạch toán	Đơn vị tính	Công thức 1 (Đ/C 1)			Công thức 2 (Đ/C 2)			Công thức 3		
			Số lượng	Đơn giá	Thành tiền	Số lượng	Đơn giá	Thành tiền	Số lượng	Đơn giá	Thành tiền
10.1	Công phay lồng, san phẳng điều tiết nước tưới	công	35				36		36		
10.2	Công gieo trồng, dặm	công	25				28		28		
10.3	Công cuốc bờ	công	2				2		2		
10.4	Bón phân	công	4				9		9		
10.5	Công phun thuốc BVTV	công	80				40		40		
10.6	Công nhật (nhỏ cỏ)	công	-				60		60		
10.7	Công gặt, phơi, quạt	công	25				25		25		
II	Tổng thu	đồng/ha	65.064.000					75.900.000	75.876.000		
	Năng suất thực thu	tạ/ha	54,22	12.000	65.064.000	63,25	12.000	75.900.000	63,23	12.000	75.876.000
III	Lãi (II-I)	đồng/ha	18.112.000			26.698.000			28.174.000		
IV	Chênh lệch năng suất mô hình/đối chứng 1	%	16,62								

TT	Danh mục hạch toán	Đơn vị tính	Công thức 1 (Đ/C 1)			Công thức 2 (Đ/C 2)			Công thức 3		
			Số lượng	Đơn giá	Thành tiền	Số lượng	Đơn giá	Thành tiền	Số lượng	Đơn giá	Thành tiền
V	Chênh lệch lợi nhuận công thức 3 so với công thức 1	Giá trị/ha (%)	10.062.000 (35,70)								
VI	Chênh lệch lợi nhuận công thức 3 so với công thức 2	Giá trị/ha	1.476.000								

(Đơn giá tính theo Quyết định số 726/QĐ-BNN-KN, ngày 24/2/2022 của Bộ Nông nghiệp và PTNT về việc ban hành định mức kinh tế kỹ thuật khuyến nông trung ương. Công thức 1: bón phân chuồng hoai mục; Công thức 2: bón phân hữu cơ vi sinh thương mại; Công thức 3: bón phân hữu cơ vi sinh AZO-NL)

3.4.2.2. *Đánh giá hiệu quả hiệu quả kinh tế mô hình sử dụng phân hữu cơ vi sinh trên cây ngô*

Sau khi thu hoạch ngô tại ruộng đối chứng và ruộng mô hình, tiến hành phơi khô, quạt sạch sản lượng ngô thu được, cân đo đong đếm, tính theo giá trị thị trường của ngô hạt do thương lái thu mua tại địa phương để tính ra giá trị sản phẩm sau khi kết thúc mùa vụ. Kết hợp với số liệu ghi chép về các khoản chi cho việc thực hiện mô hình cũng như các khoản chi của người dân cho ruộng đối chứng, chúng tôi đã tổng hợp được chi phí (tổng chi), doanh thu và lợi nhuận khi triển khai tại ruộng đối chứng và khi triển khai tại ruộng mô hình (bảng 3.22).

Kết quả bảng 3.22 cho thấy, chi phí đầu tư cho sản xuất 1 ha ngô (NK4300) tại ruộng đối chứng 1 khi không sử dụng phân hữu cơ vi sinh mà thay vào đó là phân hữu cơ (phân chuồng) là 44.925.000 đồng. Năng suất thực thu là 71,1 tạ/ha với tổng doanh thu là 61.680.000 đồng, cho lợi nhuận là 16.775.000 đồng/ha. Đối với ruộng đối chứng sử dụng phân chuồng hoai mục phải sử dụng tăng số lượng thuốc bảo vệ thực vật, tăng số công phun thuốc không những làm tăng chi phí sản xuất mà còn gây nguy cơ ảnh hưởng tiêu cực đến môi trường sinh thái cũng như sức khỏe của người sản xuất.

Trong khi đó, chi phí đầu tư cho sản xuất 1 ha ngô (NK4300) tại ruộng mô hình khi chỉ sử dụng phân hữu cơ vi sinh AZO-NL ở mức 43.525.000 đồng, thấp hơn so với chi phí của ruộng đối chứng là 1.400.000 đồng (tương đương với 3,1%). Sự giảm đi của mức chi này là do tại ruộng mô hình cây phát triển cân đối, dinh dưỡng đầy đủ nên sâu bệnh hại cũng ít hơn và lượng thuốc BVTV cũng ít hơn (bảng 2/3 so với ruộng đối chứng) và do vậy công phun thuốc BVTV cũng giảm đi tương ứng (1/3). Do dinh dưỡng đầy đủ, đất tốt cũng là điều kiện lý tưởng để cỏ mọc nhanh và mạnh, nên cần nhiều công lao động cho việc nhổ cỏ. Hơn nữa khi sử dụng phân hữu cơ vi sinh lượng ít hơn rất nhiều so với phân hữu cơ (bằng 1/4), để đáp ứng yêu cầu có sự phân

tán đồng đều phân hữu cơ vi sinh thì cần thêm công lao động cho việc làm đất và bón phân. Điều này đã làm tăng thêm 14 công lao động so với ruộng đối chứng cho công việc làm đất và bón phân. Việc không sử dụng thuốc trừ cỏ và giảm 1 lần phun thuốc BVTV đã góp phần bảo vệ môi trường sinh thái và sức khỏe của người lao động, đồng thời giúp cho hệ vi sinh vật đất được phát triển ổn định, giúp cho đất màu mỡ hơn. Nhờ vậy đã giúp năng suất thực thu đạt 89,18 tạ/ha với tổng doanh thu là 71.344.000 đồng và đã cho lợi nhuận là 27.819.000 đồng/ha (cao hơn đối chứng 1,66 lần).

Tại ruộng mô hình sử dụng phân hữu cơ vi sinh thương mại (đối chứng 2), mức chi cho công lao động tương đương với ruộng mô hình sử dụng phân HCVS của đề tài, tuy nhiên do phân hữu cơ vi sinh TM có giá cao hơn 1.000 đồng/kg nên chi phí đầu tư cao hơn ruộng mô hình sử dụng phân hữu cơ vi sinh của đề tài là 2.000.000 đồng/ha, cao hơn so với đối chứng 1 là 2.000.000 đồng/ha.

Từ kết quả triển khai mô hình có thể thấy, năng suất ngô tại ruộng mô hình sử dụng phân hữu cơ vi sinh AZO-NL cao hơn năng suất ngô tại ruộng đối chứng 1 chỉ sử dụng phân chuồng là 15,67%; lợi nhuận mang lại cao hơn so với đối chứng 1,66 lần. Hơn nữa, nếu chỉ tính riêng chi phí cho phân bón thì chi phí của 2 ruộng là như nhau (8 triệu đồng/ha), đây cũng là yếu tố quan trọng giúp định hướng người nông dân có ý thức hơn cho việc xử lý phân chuồng thành phân hữu cơ vi sinh để vừa giảm chi phí đầu vào, vừa nâng cao năng suất và hiệu quả kinh tế của cây trồng, đồng thời góp phần bảo vệ môi trường sinh thái, bảo vệ sức khỏe người dân.

Bảng 3.22. Kết quả đánh giá hiệu quả kinh tế mô hình sử dụng phân hữu cơ vi sinh trên cây ngô*ĐVT: đồng*

TT	Danh mục hạch toán	Đơn vị tính	Công thức 1 (Đ/C 1)			Công thức 2 (Đ/C 2)			Công thức 3		
			Số lượng	Đơn giá	Thành tiền	Số lượng	Đơn giá	Thành tiền	Số lượng	Đơn giá	Thành tiền
I	Tổng chi		44.925.000			45.525.000			43.525.000		
1	Giống	Kg	45	45.000	2.025.000	45	45.000	2.025.000	45	45.000	2.025.000
2	Đạm	Kg	410	15.000	6.150.000	410	15.000	6.150.000	410	15.000	6.150.000
3	Lân	Kg	480	6.000	2.880.000	480	6.000	2.880.000	480	6.000	2.880.000
4	Kali	Kg	135	22.000	2.970.000	135	22.000	2.970.000	135	22.000	2.970.000
5	Phân hữu cơ	Kg	8.000	1.000	8.000.000	-	-	-	-	-	-
6	Phân hữu cơ vi sinh	Kg	-	-	-	2.000	5.000	10.000.000	2.000	4.000	8.000.000
7	Thuốc BVTV	gói	125	20.000	2.500.000	85	20.000	1.700.000	85	20.000	1.700.000
8	Công lao động	Công	136	150.000	20.400.000	132	150.000	19.800.000	132	150.000	19.800.000

TT	Danh mục hạch toán	Đơn vị tính	Công thức 1 (Đ/C 1)			Công thức 2 (Đ/C 2)			Công thức 3		
			Số lượng	Đơn giá	Thành tiền	Số lượng	Đơn giá	Thành tiền	Số lượng	Đơn giá	Thành tiền
8.1	Trồng, thu hoạch	Công	25			25			25		
8.2	Cày, làm đất	Công	25			32			32		
8.3	Sơ chế (tẽ hạt, phơi khô, quạt sạch, đóng bao)	Công	6			6			6		
8.4	Làm cỏ, bón phân	Công	26			33			33		
8.5	Công phun thuốc BVTV	Công	54			36			36		
II	Tổng thu		61.680.000			71.360.000			71.344.000		
	Năng suất thực thu	Tạ/ha	77,10	8.000	61.680.00 0	89,20	8.000	71.360.000	89,18	8.000	71.344.000
III	Lãi (II-I)		16.775.000			25.835.000			27.819.000		
IV	Chênh lệch về năng suất công thức 3/công thức 1	%	15,67								
V	Chênh lệch lợi nhuận công thức 3 so với công thức 1	Giá trị/ha (%)	11.044.000 (39,70)								

TT	Danh mục hạch toán	Đơn vị tính	Công thức 1 (Đ/C 1)			Công thức 2 (Đ/C 2)			Công thức 3		
			Số lượng	Đơn giá	Thành tiền	Số lượng	Đơn giá	Thành tiền	Số lượng	Đơn giá	Thành tiền
VI	Chênh lệch lợi nhuận công thức 3 so với công thức 2	Giá trị/ha (%)	1.984.000 (7,13%)								

(Đơn giá tính theo Quyết định số 726/QĐ-BNN-KN, ngày 24/2/2022 của Bộ Nông nghiệp và PTNT về việc ban hành định mức kinh tế kỹ thuật khuyến nông trung ương. Công thức 1: bón phân chuồng hoai mục; Công thức 2: bón phân hữu cơ vi sinh thương mại; Công thức 3: bón phân hữu cơ vi sinh AZO-NL)

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

- Từ 175 mẫu thu thập ngẫu nhiên trên 7 đối tượng đất trồng, rễ cây tại 10 địa phương đã cho kết quả phân lập được 80 chủng vi sinh vật. 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 ($\geq 20 \mu\text{g/ml}$); khả năng sinh tổng hợp IAA ($\geq 50 \mu\text{g/ml}$); 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.

- 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 đủ điều kiện để sản xuất phân hữu cơ vi sinh phục vụ cho sản xuất.

- Sản xuất được 300 kg chế phẩm vi sinh có mật độ $\geq 10^{10}$ CFU/g gồm 02 loại chế phẩm (CPNL1 chứa chủng NL1 và CPNL3 chứa chủng NL3, mỗi loại 150 kg).

- 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 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.

- 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 năng suất tăng 16,62%, lợi nhuận tăng 10.062.000 đồng/ha (tương đương 35,7 %) so với đối chứng; mô hình cây ngô năng suất tăng 15,67%, lợi nhuận tăng 11.044.000 đồng/ha (tương đương 39,6 %) so với đối chứng.

2. Kiến nghị

- Tiếp tục nghiên cứu biểu hiện của các gen chức năng liên quan đến cố định N và IAA trong các điều kiện môi trường khác nhau;

- Tiếp tục theo dõi ảnh hưởng của phân hữu cơ vi sinh tới đất, theo dõi, đánh giá về chất lượng sản phẩm qua nhiều mùa vụ;

- Mở rộng thử nghiệm sản phẩm phân bón hữu cơ vi sinh cho các đối tượng cây trồng khác trên địa bàn tỉnh Thái Nguyên.

- Các cơ quan quản lý cần xây dựng chính sách khuyến khích người dân chuyển đổi sang hình thức canh tác hữu cơ - nông nghiệp xanh, nhằm thúc đẩy và mở rộng thị trường cho các sản phẩm phân bón hữu cơ và hữu cơ vi sinh.

CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Trần Văn Chí*, Lã Văn Hiền, Nguyễn Mạnh Tuấn, Nguyễn Thị Giang, **Hoàng Thị Lan Anh (2023)**. Tuyển chọn chủng vi khuẩn có hoạt lực cao về khả năng cố định nitơ và tổng hợp indole-3-acetic acid (IAA) từ đất trồng chè tại xã Tức Tranh, tỉnh Thái Nguyên. Tạp chí Khoa học và Công nghệ lâm nghiệp, tập 12, số 6, tr. 3-11.
2. Van Chi Tran, Pham Thi Tuyen Mai, Nguyen Thi Giang, La Van Hien, Nguyen Manh Tuan, Nguyen Thanh Hai, **Hoang Thi Lan Anh*** and Nguyen Quoc Khuong (2024). Isolation, Selection, and Biological Evaluation for Bacteria that Fix Nitrogen and Produce Indole-3 Acetic Acid from Paddy Soils in Vietnam. The Open Agriculture Journal, pp. 1-16.
3. **Hoàng Thị Lan Anh**, Nguyễn Thị Giang, Nguyễn Mạnh Tuấn, Phạm Thị Tuyết Mai, Trần Văn Chí (2024). 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. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam, tr. 34-39.
4. **Hoàng Thị Lan Anh**, Nguyễn Thanh Hải, Nguyễn Thị Giang, Phạm Thị Tuyết Mai, Nguyễn Mạnh Tuấn, Trần Văn Chí (2025). Phân lập tuyển chọn vi khuẩn có hoạt lực cao về khả năng cố định nitơ và tổng hợp indole-3-acetic acid (IAA) từ đất trồng ngô tại tỉnh Thái Nguyên và Hà Giang. Tạp chí Khoa học và Công nghệ lâm nghiệp, tập 14, số 3, tr. 3-11.
5. **Hoàng Thị Lan Anh**, Hoàng Thị Thủy, Nguyễn Thanh Hải, Trần Văn Chí (2025). Ảnh hưởng của phân hữu cơ vi sinh chứa chủng *Azospirillum* sp. NL1 và *Azotobacter* sp. NL3 đến năng suất và hiệu

quả kinh tế sản xuất lúa và ngô tại Thái Nguyên. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tham khảo tiếng Việt:

1. Hà Thị Thanh Bình, Nguyễn Xuân Mai, Thiều Thị Phong Thu, Vũ Duy Hoàng, Nguyễn Mai Thơm, Nguyễn Thị Phương Lan (2011). Ảnh hưởng của mật độ và lượng đạm bón đến sinh trưởng và năng suất ngô trên đất dốc Yên Minh - Hà Giang. Tạp chí Khoa học và Phát triển, Trường Đại học Nông Nghiệp Hà Nội, 6(9), tr. 861-866.
2. Bộ Chính trị (2023). Nghị quyết số 36-NQ/TW ngày 30/01/2023 về phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học phục vụ phát triển bền vững đất nước trong tình hình mới.
3. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2023). Quyết định số 5190/QĐ-BNN-BVTV ngày 07/12/2023 quyết định đề án phát triển sản xuất và sử dụng phân bón hữu cơ đến năm 2030, tầm nhìn đến 2050.
4. **Bộ Nông nghiệp và PTNT** (2022). Quyết định số 726/QĐ-BNN-KN, ngày 24/2/2022 của Bộ Nông nghiệp và PTNT về việc ban hành định mức kinh tế kỹ thuật khuyến nông trung ương.
5. Bộ Y tế (2017). Quyết định số 1539/QĐ-BYT ngày 20/4/2017 về việc ban hành tài liệu chuyên môn hướng dẫn thực hành kỹ thuật vi sinh lâm sàng.
6. Trần Văn Chí, Hoàng Thị Lan Anh, Nguyễn Thị Lâm, Nguyễn Thế Đăng, Nguyễn Ngọc Nông, Hoàng Thị Thủy (2024). Báo cáo tổng hợp kết quả nhiệm vụ quỹ gen cấp Quốc gia Khai thác phát triển nguồn gen vi khuẩn có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp indole-3-acetic acid (IAA) ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp. Mã số NVQG-2021/ĐT.04. Trung tâm Môi trường Tài nguyên Miền núi.
7. Nguyễn Minh Chơn (2004). Giáo trình chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Trường Đại học Cần Thơ.

8. Nguyễn Thị Ngọc Dinh, Phạm Tiến Dũng, Nguyễn Ích Tân, Nguyễn Hồng Hạnh, Phan Thị Thủy (2015). Ảnh hưởng của liều lượng phân giun quế đến sinh trưởng và năng suất của giống lúa ĐTL2 trong vụ xuân sản xuất theo hướng hữu cơ tại Gia Lâm, Hà Nội. Tạp chí Khoa học và Phát triển 2015, 7(13), tr. 1081-1088.
9. Nguyễn Tiến Dũng (2011). Phân lập, tuyển chọn một số chủng vi khuẩn cố định đạm *Azospirillum* trong rễ cây ngô tại một số địa điểm của tỉnh Đắk Nông. Luận văn thạc sỹ. Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên.
10. Vũ Văn Dũng (2023). Nghiên cứu tuyển chọn một số chủng vi khuẩn chịu mặn có đặc tính kích thích sinh trưởng thực vật và tác động đến biểu hiện gen liên quan đến đáp ứng mặn của cây lúa. Luận án tiến sĩ công nghệ sinh học. Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
11. Nguyễn Ngọc Đệ (2008). Giáo trình cây lúa. Viện nghiên cứu và phát triển Đồng bằng sông Cửu Long, Đại học Cần Thơ, tr. 58-62.
12. Cao Ngọc Điệp, Nguyễn Thị Mộng Huyền (2015). Phân lập và xác định đặc tính vi khuẩn nội sinh trong rễ cây khoai lang (*Ipomoea batatas*) trồng trên đất phèn ở huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang. Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ, 36, tr. 6 -13.
13. Thái Thành Được (2023). Phân lập vi khuẩn cố định đạm trong vùng rễ và nội sinh cây bắp trên nền đất phù sa đồng bằng sông Cửu Long. Luận án tiến sĩ chuyên ngành công nghệ sinh học, tr. 28-29.
14. Nguyễn Thu Hà, Nguyễn Văn Thao, Nguyễn Thị Lan Anh (2016). Sự biến động của các hợp chất nitơ hữu cơ trong quá trình ủ phân hữu cơ với sự có mặt của trùn quế. Tạp chí khoa học đất, 48, tr. 36-40.
15. Nguyễn Thị Thu Hằng, Nguyễn Thị Thủy (2015). Tuyển chọn vi khuẩn *Azotobacter* có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp, 4, tr. 3-9.
16. Đỗ Thị Hiền, Đỗ Bích Duệ, Nguyễn Mạnh Tuấn, Nguyễn Xuân Vũ (2019). Phân lập và tuyển chọn chủng xạ khuẩn sinh kháng sinh ức chế

- sinh trưởng vi khuẩn Gram dương. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên, 197(04), tr. 127-133.
17. Trần Nguyễn Diệu Hiền (2011). Đánh giá hiệu quả cố định đạm của *Burkholderia* sp. KG1 và *Pseudomonas* sp. BT1 trên cây lúa cao sản trồng trong chậu. Báo cáo tổng kết đề tài khoa học và công nghệ cấp trường. Trường Đại học Cần Thơ.
 18. Nguyễn Hữu Hiệp và Hà Danh Đức (2009). Phân lập các dòng vi khuẩn cố định đạm và hòa tan lân cho đậu phộng trồng ở Trà Vinh. Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ, 11, tr. 123 -133.
 19. Dương Đức Hiếu, Lê Công Nhất Phương, Võ Thị Kiều Thanh, Lê Thị Ánh Hồng, Trần Quang Vinh, Phùng Huy Huân (2012). Sản xuất phân hữu cơ sinh học từ phế phẩm mật cưa sau thu hoạch nấm và chất thải chăn nuôi. Tạp chí Sinh học, 3(34), tr. 154-160.
 20. Trần Trọng Hiếu và Nguyễn Hữu Hiệp (2016). Phân lập và khảo sát đặc tính của vi khuẩn nội sinh ở cây Trinh Nữ (*Mimosa pudica* L.) tại tỉnh Trà Vinh. Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ, 46, tr. 23-29.
 21. Nguyễn Anh Huy và Nguyễn Hữu Hiệp (2018). Phân lập và nhận diện các dòng vi khuẩn chịu mặn có khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA từ đất sản xuất lúa - tôm ở Bạc Liêu, Sóc Trăng và Kiên Giang. Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ, 1(54), tr. 7 - 12.
 22. Nguyễn Quốc Khương, Lê Vĩnh Thúc, Lê Thị Mỹ Thu, Lưu Thị Yến Nhi, Võ Văn Ứng, Trần Chí Nhân, Lý Ngọc Thanh Xuân và Nguyễn Thị Thanh Xuân (2020). Tuyển chọn vi khuẩn nội sinh rễ cây mía đường có khả năng hòa tan lân. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 20, tr. 35-41.
 23. Nguyễn Quốc Khương, Trần Ngọc Hữu, Lê Vĩnh Thúc, Lê Thị Mỹ Thu, Nguyễn Hồng Huế, Trần Chí Nhân, Phạm Duy Tiến, Lý Ngọc Thanh Xuân (2021). Phân lập, tuyển chọn và định danh vi khuẩn hòa tan lân, cố định đạm và tổng hợp IAA vùng rễ cây đinh lăng (*Polyscias*

- fruticosa). Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam, 05 (126).
24. Lê Như Kiều, Nguyễn Văn Huân, Lê Thị Thanh Thủy (2011). Nghiên cứu khả năng tổ hợp của một số chủng vi sinh vật để sản xuất phân hữu cơ vi sinh đa chức năng cho chè. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam, 02 (23), tr. 133 - 138.
 25. Phạm Thị Ngọc Lan (2012). Vi sinh vật học. NXB Đại học Huế.
 26. Nguyễn Thị Minh (2017). Tuyển chọn giống vi sinh vật nội sinh từ vùng sinh thái đất phèn, Hải Phòng. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, 15(5), tr. 619-630.
 27. Nguyễn Thị Hằng Nga, Nguyễn Lan Hương, Trần Khắc Hiệp, Nguyễn Kiều Băng Tâm, Lương Hữu Thành (2016). Nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh vật để xử lý phế thải rắn sau chế biến tinh bột sắn làm phân hữu cơ sinh học. Tạp chí Khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội, 1(32), tr. 282 - 288.
 28. Nguyễn Thị Như Nguyệt, Nguyễn Khắc Biên, Trịnh Thị Bích Huyền, Đặng Vũ Bích Hạnh (2017). Sử dụng chế phẩm vi sinh tại chỗ sản xuất phân hữu cơ từ bùn thải ngành bia. Tạp chí phát triển khoa học và Công nghệ, 20, tr. 1-6.
 29. Văn Thị Phương Như, Cao Ngọc Điệp (2014). Ảnh hưởng của vi sinh vật *zospirillum amazonense* và *urkholderia kururiensis* lên sự sinh trưởng và năng suất của lúa cao sản giống lúa Ma Lâm 2 trồng trên đất thịt pha cát ở thành phố Tuy Hòa, tỉnh Phú Yên. Tạp chí khoa học, trường Đại học Cần Thơ, 33, tr. 85-96.
 30. Đỗ Kim Nhung, Vũ Thành Công (2011). Khảo sát khả năng sinh tổng hợp IAA và cố định đạm của vi khuẩn *Gluconacetobacter* sp. và *Azospirillum* sp. được phân lập từ cây mía. Tạp chí khoa học, Đại học Cần Thơ, tr. 161-167.

31. Nguyễn Thị Phương Oanh, Trần Bửu Minh, Nguyễn Thị Pha (2013). Phân lập và tuyển chọn một số dòng vi khuẩn đất vùng rẫy lúa có khả năng cố định đạm và tổng hợp IAA. Tạp chí Khoa học, Đại học Cần Thơ, 26, tr. 82 - 88.
32. Nguyễn Thị Pha, Nguyễn Thị Liên, Nguyễn Thị Yến Như, Trần Thị Xuân Mai (2012). Khảo sát vùng gen 16S rDNA của một số dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm ở đất vùng rẫy lúa tỉnh Đồng Tháp. Tạp chí khoa học, trường Đại học Cần Thơ, 23, tr.184-192.
33. Ngô Thanh Phong (2012). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cố định đạm *Pseudomonas* spp. từ vùng đất rẫy lúa Đồng bằng Sông Cửu Long và đánh giá hiệu quả trên giống lúa OM6976. Luận án tiến sĩ công nghệ sinh học. Trường Đại học Cần Thơ.
34. Ngô Thanh Phong, Nguyễn Thị Minh Thư và Cao Ngọc Diệp (2010). Phân lập và nhận diện vi khuẩn cố định đạm trong đất vùng rẫy lúa trồng trên đất phèn tỉnh Kiên Giang. Tạp chí Công nghệ Sinh học, Hà Nội. 8(3A), tr.1015-1020.
35. Ngô Thanh Phong, Trần Thúy Huỳnh, Phan Kim Định và Cao Ngọc Diệp (2011). Nghiên cứu xác định mức độ thay thế phân đạm của vi khuẩn *Pseudomonas* SP. BT1 và BT2 với cây lúa cao sản trồng trong chậu. Tạp chí Khoa học Trường ĐH Cần Thơ, 20a, tr. 92-99.
36. Nguyễn Thị Phương, Nguyễn Mỹ Hoa, Đỗ Thị Xuân (2018). Sản xuất và đánh giá hiệu quả phân hữu cơ vi sinh từ bùn thải nhà máy sản xuất bia và nhà máy chế biến thủy sản trên năng suất cây rau. Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ, 54, tr. 81- 89.
37. Trần Thị Xuân Phương, Nguyễn Thị Như Ngọc, Nguyễn Thị Thuận, Lê Xuân Diễm Ngọc (2017). Tuyển chọn vi khuẩn *Azotobacter* có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA trong đất trồng lúa ở tỉnh Thừa Thiên Huế. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp, 1(1) tr. 111-118.

38. QCVN 01-55:2011/BNNPTNT (2011). Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống lúa.
39. QCVN 01-56:2011/BNNPTNT (2011). Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống ngô.
40. Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Thái Nguyên (2024). Báo cáo số 264/BC-KHCN ngày 29/11/2024 về kết quả thực hiện Nghị quyết số 189/NQ-CP ngày 16/11/2023 của Chính phủ về ban hành Chương trình hành động của Chính phủ thực hiện Nghị quyết số 36-NQ/TW ngày 30/01/2023 của Bộ Chính trị về phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học phục vụ phát triển bền vững đất nước trong tình hình mới.
41. Đinh Trường Sơn, Nguyễn Thị Thanh Mai, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Thanh Hải, Trần Thị Đào, Ngô Thị Vân Anh, & Nguyễn Xuân Cảnh (2022). Nghiên cứu đặc tính đối kháng với nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh trên chuối của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA27. Tạp Chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, 20(8), tr 1042 –1053. <https://vie.vjas.vn/index.php/vjasvn/article/view/1032>.
42. Hoàng Minh Tấn, Nguyễn Quang Thạch (1993). Chất điều hòa sinh trưởng đối với cây trồng. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội, tr. 11-17.
43. TCVN 10784:2015 (2015). Vi sinh vật - Xác định khả năng sinh tổng hợp axit 3-indol-acetic (IAA)
44. TCVN 8564:2010 (2010). Phân bón vi sinh vật - Phương pháp xác định hoạt tính cố định nitơ của vi khuẩn nốt sần cây họ đậu.
45. TCVN 9716:2013 (2013) (ISO 8199:2005). Chất lượng nước - Hướng dẫn chung về đếm vi sinh vật bằng nuôi cấy.
46. Nguyễn Xuân Thành, Lê Văn Hưng, Phạm Văn Toàn (2003). Giáo trình công nghệ vi sinh vật trong sản xuất nông nghiệp và xử lý ô nhiễm môi trường. Nhà xuất bản nông nghiệp, Hà Nội.
47. Nguyễn Văn Thao, Nguyễn Thị Lan Anh, Nguyễn Thị Minh, Nguyễn Thu Hà, Đỗ Nguyên Hải (2015). Nghiên cứu chế phẩm vi sinh vật để

- sản xuất phân hữu cơ từ bã nấm và phân gà. Tạp chí Khoa học và Phát triển, 8(13), tr. 1415 - 1423.
48. Thông tư số 09/2019/TT-BNNPTNT ngày 27/8/2019 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn về việc ban hành Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng phân bón.
 49. Nguyễn Thị Minh Thu, Nguyễn Quang Hùng, Nguyễn Kiều Băng Tâm, Nguyễn Văn Hiếu, Nguyễn Thị Hồng Liên, Phan Thị Hồng Thảo (2017). Đặc điểm sinh học của một số chủng *Rhizobium* phân lập từ nốt rễ cây động tương tại Hà Nội, Việt Nam. Tạp chí Khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội, 1(33), tr. 69-75.
 50. Thủ tướng Chính phủ (2020). Quyết định số 885/QĐ-TTg ngày 23/06/2020 phê duyệt Đề án phát triển nông nghiệp hữu cơ giai đoạn 2020-2030.
 51. Vũ Văn Thức (2024), Báo cáo thị trường phân bón Việt Nam 2024, truy cập từ <https://kirincapital.vn/wp-content/uploads/2024/11/Bao-cai-nganh-phan-bon-2024.pdf>.
 52. Phạm Thị Thủy, Ngô Thanh Phong (2018). Đánh giá hiệu quả của chế phẩm *Burkholderia vietnamiensis* BV3 trên giống lúa OM6976 trong điều kiện đất phèn ở huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang, 54 (3B), tr.109-114.
 53. Phạm Văn Toàn (2002). Báo cáo kết quả đề tài khoa học công nghệ Nghiên cứu áp dụng công nghệ mới nhằm mở rộng việc sản xuất, ứng dụng phân VSV cố định đạm và phân giải lân phục vụ phát triển nông nghiệp bền vững. Mã số KC.04.04/02.06. Hội nghị tổng kết các chương trình khoa học và công nghệ cấp Nhà nước giai đoạn 1996 - 2000.
 54. Phạm Văn Toàn (2004). Báo cáo kết quả đề tài KC.04.04: Nghiên cứu sản xuất và sử dụng phân bón VSV chức năng cho một số cây trồng

- nông, lâm và công nghiệp. Báo cáo hội nghị khoa học chuyên ngành đất, phân bón & Hệ thống nông nghiệp, Nha Trang 6/2004.
55. Phạm Văn Toàn (2017). Phân bón vi sinh vật. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
 56. Trần Bảo Trâm, Nguyễn Thị Hiền, Phạm Hương Sơn, Nguyễn Thị Thanh Mai, Võ Thu Giang, Phạm Thế Hải (2017). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn sinh tổng hợp IAA (Indole Acetic Acid) từ đất trồng sâm Việt Nam ở Quảng Nam. Tạp chí Khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội, 2(33), tr.219-226.
 57. Đỗ Quang Trung, Vũ Văn Hạnh, Lưu Thế Anh (2022). Phân lập và xác định đặc tính của vi khuẩn bản địa cho sản xuất chế phẩm sinh học trong nuôi trồng thủy sản ở Bạch Long, tỉnh Nam Định. Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ, 2, tr. 94-101.
 58. Trung tâm Môi trường Tài nguyên Miền núi (2023). Quyết định số 32/QĐ-TTMTTNMN ngày 28/03/2023 về việc ban hành quy trình mã số MREC-QTCN-2022-02 quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh quy mô 50kg/mẻ.
 59. Trung tâm Môi trường Tài nguyên Miền núi (2023). Quyết định số 32/QĐ-TTMTTNMN ngày 28/03/2023 về việc ban hành quy trình mã số MREC-QTCN-2022-03 quy trình sản xuất phân hữu cơ vi sinh chứa vi sinh vật cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA, quy mô 400 kg/mẻ.
 60. Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển truyền thông KH&CN (2019). <https://www.most.gov.vn/vn/tin-tuc/15943/sang-tao-cong-nghe-cho-cuo-c-song-hang-ngay.aspx>.
 61. Hoa Thị Minh Tú, Đặng Thị Thùy Dương, Trịnh Thị Hoa, Bạch Thị Mai Hoa, Phạm Thanh Huyền, Lê Thị Minh Thành, Hồ Tuyên, Nguyễn Phương Nhuệ (2021). Tuyển chọn chủng vi sinh vật đối kháng vi khuẩn và nấm gây bệnh đốm lá trên cây hoa hồng. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam, 8(129), tr. 68-74.

62. Đỗ Anh Tuấn, Vũ Đình Chính (2019). Ảnh hưởng của phân bón hữu cơ vi sinh đến sinh trưởng và năng suất đậu tương tại Tân Uyên - Lai Châu. Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam - Số 4(101), tr 62-68.
63. Ủy ban nhân dân tỉnh Thái Nguyên (2021). Quyết định số 4130/ QĐ - UBND ngày 27/12/2021 phê duyệt phương án sản xuất nông, lâm nghiệp và thủy sản năm 2022 tỉnh Thái Nguyên.
64. Nguyễn Thị Vân, Tống Văn Giang, Đàm Hương Giang (2021). Nghiên cứu ảnh hưởng của liều lượng phân hữu cơ vi sinh sông Gianh đến sinh trưởng, phát triển và năng suất của giống lúa Japonica ĐS3 trong vụ xuân 2020 tại huyện Hoằng Hoá, tỉnh Thanh Hóa. Tạp chí khoa học trường đại học Hồng Đức, 55, tr. 134-140.
65. Nguyễn Kim Vũ (1995). Báo cáo tổng kết đề tài khoa học cấp nhà nước Nghiên cứu công nghệ sản xuất và ứng dụng phân VSV cố định nito nhằm nâng cao năng suất lúa và cây trồng cạn. Mã số KC-08.01.
66. Nguyễn Xuân Vũ (2022). Nghiên cứu sử dụng chế phẩm vi khuẩn có ích *Bacillus* trong sản xuất lạc ở Quảng Nam. Luận án tiến sĩ khoa học cây trồng. Trường Đại học Nông lâm, Đại học Huế.

Tài liệu tham khảo tiếng Anh:

67. A.K. Yadav (2017). Regulations in BF and BB Industry Recent Initiatives in Asian Countries with special reference to India. International Conference on Biofertilizers and Biopesticides, Taiwan.
68. Aasfar A, Bargaz A, Yaakoubi K, Hilali A, Bennis I, Zeroual Y, Meftah Kadmiri I (2021). Nitrogen Fixing Azotobacter Species as Potential Soil Biological Enhancers for Crop Nutrition and Yield Stability, 12.
69. Alneberg J, Bjarnason BS, de Bruijn I, Schirmer M, Quick J, Ijaz UZ, Lahti L, Loman NJ, Andersson AF, Quince C. (2014). Binning

- metagenomic contigs by coverage and composition. *Nat Methods* 11:1144-1146. doi: 10.1038/nmeth.3103.
70. Anjali Chauhan, Guleria S., Balgir P.P., Walia A., Mahajan R., Mehta P., and Shirkot C.K. (2017). Tricalcium phosphate solubilization and nitrogen fixation by newly isolated *Aneurinibacillus aneurinilyticus* CKMV1 from rhizosphere of *Valeriana jatamansi* and its growth promotional effect. *Braz J Microbiol*, 48, pp. 294-304.
 71. Auch AF, Klenk HP, Göker M., (2010). Standard operating procedure for calculating genome-to-genome distances based on high-scoring segment pairs. *Stand Genomic Sci.* 2(1):142-148.
 72. Barron S, Mus F, Peters JW (2024). Nitrogen-Fixing Gamma Proteobacteria *Azotobacter vinelandii*-A Blueprint for Nitrogen-Fixing Plants, 12(10).
 73. Bashan Y., de-Bashan L.E. (2002). Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* doi: 10.1128/AEM.68.6.2637-2643.2002, 68, pp. 2637-2643.
 74. Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L.E. *Azospirillum*-plant relationships: Physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003) *Can. J. Microbiol.* 2004;50: 521-577. doi: 10.1139/w04-035.
 75. Biello KA, Lucena C, López-Tenllado FJ, Hidalgo-Carrillo J, Rodríguez-Caballero G, Cabello P, Sáez LP, Luque-Almagro V, Roldán MD, Moreno-Vivián C, Olaya-Abril A (2023). Holistic view of biological nitrogen fixation and phosphorus mobilization in *Azotobacter chroococcum* NCIMB 8003. *Front Microbiol*, 14.

76. Bunsangiam S., Thongpae N., Limtong S., Srisuk N. (2021). Large scale production of indole3-acetic acid and evaluation of the inhibitory effect of indole-3-acetic acid on weed growth, *Scientific Reports*, 11(1), pp.1-13.
77. C.M. Orozco-Mosqueda, A. Flore, B. Rojas-Sánchez, et al. (2021). Plant Growth- Promoting Bacteria as Bioinoculants: Attributes and Challenges for Sustainable Crop Improvement, 11.
78. Cruz-Hernández MA, Mendoza-Herrera A, Bocanegra-García V, Rivera G (2022). *Azospirillum* spp. from Plant Growth-Promoting Bacteria to Their Use in Bioremediation. *Microorganisms*, 10(5), pp. 1057.
79. Cycoń M, Mroziak A, Piotrowska-Seget Z (2019). Antibiotics in the Soil Environment-Degradation and Their Impact on Microbial Activity and Diversity, 8 (10), pp. 338.
80. Chattopadhyay, P., Banerjee, G., (2018). Recent advancement on chemical arsenal of Bt toxin and its application in pest management system in agricultural field. 3. *Biotech*, 8, pp. 201 – 213.
81. Chauhan, P. S., Chaudhry, V., Mishra, S., Nautiyal, C. S. (2011). Uncultured bacterial diversity in tropical maize (*Zea mays* L.) rhizosphere. *Journal of Basic Microbiology*, 51(1), pp.15-32.
82. Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., Gu, J. (2018). Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884-i890. doi:10.1093/bioinformatics/bty560.
83. Chun J., Lee JH., Jung Y., Kim M., Kim S., Kim B.K. & Lim Y.W (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57(10), pp. 2259-2261.

84. Dang Thi Ngoc Thanh and Cao Ngoc Diep (2014). Isolation, characterization and identification of endophytic bacteria in maize (*Zea mays* L.) cultivated on Acrisols of the Southeast of Vietnam. *American Journal of Life Sciences*, 2(4), pp. 224-233.
85. Davis, J. J., Wattam, A. R., Aziz, R. K., Brettin, T., Butler, R., Butler, R. M., Stevens, R. (2020). The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D606-D612. doi:10.1093/nar/gkz943.
86. Dos Santos Ferreira N, Coniglio A, Puente M, Sant'Anna FH, Maroniche G, García J, Molina R, Nieves S, Volpiano CG, Ambrosini A, Passaglia LMP, Pedraza RO, Reis VM, Zilli JÉ, Cassan F (2022). Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Az39 as the type strain of *Azospirillum argentinense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2022 Aug, 72(8). doi: 10.1099/ijsem.0.00547.
87. Dreyfus, B., Garcia, J. L., & Gillis, M. (1988). Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., an aerobic nitrogen-fixing bacterium inducing stem nodulation on *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(1), pp. 89-98.
88. Eckert, B. (2001). *Azospirillum* spp. as plant growth-promoting rhizobacteria: A review of potential applications in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(4), pp. 395-403.
89. Elmerich, C., Kondorosi, A., & Newton, W. E. (2000). *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*. Springer Science & Business Media.
90. Felsenstein J (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), pp. 783-791.

91. Frank JA, Arntzen MO, Sun L, Hagen LH, McHardy AC, Horn SJ, Eijsink VGH, Schnürer A, Pope PB. (2016). Novel syntrophic populations dominate an ammonia-tolerant methanogenic microbiome. *mSystems*, 1(5): e00092-16 10.1128/mSystems.00092-16.
92. Galkiewicz, J. P., & Kellogg, C. A. (2008). Cross-Kingdom amplification using bacteria-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (24), pp.7828-7831.
93. Ganusova EE, Vo LT, Abraham PE, O'Neal Yoder L, Hettich RL, Alexandre G (2021). The *Azospirillum brasilense* Core Chemotaxis Proteins CheA1 and CheA4 Link Chemotaxis Signaling with Nitrogen Metabolism. *mSystems*, 6(1).
94. Glickman E. And 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, pp.793-796.
95. Gnerre S and MacCallum I (2011). High-quality draft assemblies of mammalian genomes from massively parallel sequence data. *PNAS*, 108(4), pp. 1513-8.
96. Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072-1075. doi:10.1093/bioinformatics/btt086.
97. Gusti Ayu Kade Sutariati, Nini Mila Rahni, Abdul Madiki, La Mudi, Jumarddin La Fua (2020). Isolation and Viability Test of Seed Incorporated by Indigenous Rhizobacteria from Areca Nut as Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). *International Journal of Scientific & Technology Research*, Volume 9, Issue 01, pp.3435-3439.

98. Giassi V., Kiritani C., Kupper K.C. (2016). Bacteria as growth-promoting agents for citrus rootstocks. *Microbiological Research*, 190, pp. 46-54.
99. Giles E. D. Oldroyd. (2019). Dissecting and engineering nitrogen symbioses in legumes. *Nature Reviews Microbiology*, DOI: 10.1038/s41579-019-0151-5.
100. Gillis M., Van Van T., Bardin R., Goor M., Hebbar P., William A., Segers P., Kersters K., Heulin T., Fernandez M.P., (1995). Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(2), pp. 274-289.
101. H. P. Browne, S. C. Forster, B. O. Anonye, N. Kumar, B. A. Neville, M. D. Stares, D. Goulding, and T. D. Lawley. (2016) Culturing of “unculturable” human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation,” *Nature*, vol, 533, pp. 543-546. doi: 10.1038/nature17645
102. Hamilton TL, Ludwig M, Dixon R, Boyd ES, Dos Santos PC, Setubal JC, Bryant DA, Dean DR, Peters JW (2011). Transcriptional profiling of nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol*, 193(17).
103. Harman. G. E. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*.
104. Housh AB, Noel R, Powell A, Waller S, Wilder SL, Sopko S, Benoit M, Powell G, Schueller MJ, Ferrieri RA (2023). Studies Using Mutant Strains of *Azospirillum brasilense* Reveal That Atmospheric Nitrogen Fixation and Auxin Production Are Light Dependent Processes. *Microorganisms*, 11(7), pp.1727.
105. Insaf Khan, Devendra Singh và Bhanwar Lal Jat (2017). Effects of biofertilizers on plant growth and yield characters of *Pisum sativum* L. *Advance Research Journal of Crop Improvement*, 8(1), pp. 99-108.

106. J. Isabelle, R. Coraline, G. Julien (2020). An overview of siderophore biosynthesis among fluorescent *Pseudomonas* and new insights into their complex cellular organization, 22(4), pp. 1447-1466.
107. J. Saikia, R.K. Sarma, R. Dhandia, et al. (2018). Alleviation of drought stress in pulse crops with ACC deaminase producing rhizobacteria isolated from acidic soil of Northeast India. *Sci. Rep.*, 8, pp. 3560.
108. Jan P Meier-Kolthoff 1, Alexander F Auch, Hans-Peter Klenk, Markus Göker, (2013), Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions, *BMC Bioinformatics*, DOI: 10.1186/1471-2105-14-60.
109. Jan P Meier-Kolthoff, Alexander F Auch, Hans-Peter Klenk, Markus Göker (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *National Library of Medicine*. DOI: 10.1186/1471-2105-14-60.
110. Jeong J, Yun K, Mun S, Chung WH, Choi SY, Nam YD, Lim MY, Hong CP, Park C, Ahn YJ, Han K (2021). The effect of taxonomic classification by full-length 16S rRNA sequencing with a synthetic long-read technology, 11(1), pp.1727.
111. Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2016). KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D353-D361. doi:10.1093/nar/gkw1092.
112. Kaneko T., Minamisawa K., Isawa T., Nakatsukasa H., Mitsui H., Kawaharada Y., Nakamura Y., Watanabe A., Kawashima K., Ono A., Shimizu Y., Takahashi C., Minami C., Fujishiro T., Kohara M., Nakayama S., Yamada M., Tabata S., Sato S (2010). Complete genomic structure of the cultivated rice endophyte *Azospirillum* sp. B510. *DNAREs*, 17, pp. 37-50.

113. Kaneko, T., Maita, S., Hirakawa, H., Uchiike, N., Minamisawa, K., Watanabe, A., & Sato, S. (2010). Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Research*, 17(6), pp.327-339.
114. Kaur, J., Mudgal, G., Chand (2022). An exopolysaccharide-producing novel *Agrobacterium pusense* strain JAS1 isolated from snake plant enhances plant growth and soil water retention. *Sci Rep* 12, 21330.
115. Ke J., Wang B., Yoshikuni Y. (2021). Microbiome engineering: synthetic biology of plant associated microbiomes in sustainable agriculture, *Trends in Biotechnology*, 39(3), pp. 244-261.
116. Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M. & Glöckner F.O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and nextgeneration sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41(1), pp. 1-11.
117. Kolter R, Balaban N, Julou T. (2022). Bacteria grow swiftly and live thriftily. *Curr Biol*, 32(12), pp. 599-605.
118. Krasnov, G. S., Pushkova, E. N., Novakovskiy, R. O., Kudryavtseva, L. P., Rozhmina, T. A., Dvorianinova, E. M., Melnikova, N. V. (2020). High-Quality Genome Assembly of *Fusarium oxysporum* f. sp. lini. *Front Genet*, 11, 959. doi:10.3389/fgene.2020.00959.
119. Kuan, K. B., Othman, R., Rahim. K. A., Shamsuddin, Z. H. (2016). Plant growthpromoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. *PLoS ONE*, 11(3), pp. 1-16.
120. Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), pp.1870-1974.

121. Kumar, A., Singh, M., & Sharma, R. (2023). Role of Nitrogen-Fixing Microorganisms in Sustainable Agriculture: A Review. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 25(2), pp.123-135.
122. Khan. M. S. (2019). Role of phosphate solubilizing bacteria in enhancing the growth and yield of wheat. *Journal of Plant Nutrition*.
123. Lao HY, Wong LL, Hui Y, Ng TT, Chan CT, Lo HW, Yau MC, Leung EC, Wong RC, Ho AY, Yip KT, Lam JY, Chow VC, Luk KS, Que TL, Chow FWN, Siu GK (2024). The clinical utility of Nanopore 16S rRNA gene sequencing for direct bacterial identification in normally sterile body fluids. *Front Microbiol*, 9(14).
124. Li H.B., Singh R.K., Singh P., Song Q.Q., Xing Y.X., Yang L.T., Li Y.R. (2017). Genetic Diversity of Nitrogen-Fixing and Plant Growth Promoting *Pseudomonas* Species Isolated from Sugarcane Rhizosphere. *Front. Microbiol*, 8:1268.
125. Liu G, Li T, Zhu X, Zhang X, Wang J (2023). An independent evaluation in a CRC patient cohort of microbiome 16S rRNA sequence analysis methods: OTU clustering, DADA2, and Deblur. *Front Microbiol*, 14.
126. Liu W.H., Chen F.F., Wang C.E., Fu H.H., Fang X.Q., Ye J.R., Shi J.Y. (2019). Indole-3-Acetic Acid in *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007: Enzymatic Identification of the Indole-3-Acetamide Synthesis Pathway. *Front. Microbiol*. 10,, pp. 2559.
127. Lukas Schütz, Andreas Gattinger, Matthias Meier, Adrian Müller, Thomas Boller, Paul Mäder, Natarajan Mathimaran (2017). Improving Crop Yield and Nutrient Use Efficiency via Biofertilization-A Global Meta-analysis, Volume 8 – 2017. DOI: [org/10.3389/fpls.2017.02204](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02204).

128. M. Miethke, M.A. Marahiel (2007). Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 71(3), pp. 413-51.
129. M. Satyaprakash, T. Nikitha, U.B. Reddi. (2017). A review on phosphorous and phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 6, pp. 2133-2144.
130. MacDonald NJ, Beiko RG. (2010). Efficient learning of microbial genotype-phenotype association rules. *Bioinformatics* 26:1834-1840. doi: 10.1093/bioinformatics/btq305.
131. MacLean, A. M., Finan, T. M., & Sadowsky, M. J. (2007). Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes. *Plant Physiology*, 144(2), 615–622.185.
132. Mardamootoo T., du Preez C. C., Barnard J. H. (2021). Phosphorus management issues for crop production: A review, *African Journal of Agricultural Research*, 17(7), pp. 939-952.
133. Martínez-Romero, E., Caballero-Mellado, J., Maldonado-Mendoza, I. E., & Hirsch, A. M. (2010). Rhizobial symbioses: Molecular interactions and evolutionary perspectives. *Plant and Soil*, 329(1-2), pp.15-37.
134. Martínez-Romero, J. C., Ormeño-Orrillo, E., Rogel, M. A., López-López, A., and Martínez-Romero, E. (2010). Trends in rhizobial evolution and some taxonomic remarks, in *Evolutionary Biology: Concepts, Molecular and Morphological Evolution*, ed. P. Pontarotti (Berlin: Springer. doi: 10.1007/978-3-642-12340-5_18), pp. 301-315.
135. Miché L., Bouillant M.L., Rohr R., Sallé G., Bally R. (2000). Physiological and cytological studies on the inhibition of *Striga* seed germination by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Eur. J. Plant Pathol.* doi: 10.1023/A:1008734609069, 106, pp. 347-351.

136. Mingkun L, Copeland A, Han J. DUK, (2015). Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4623924/pdf/40793_2015_Article_77.pdf. Accessed 26 Oct 2015.
137. Mizrahi- Man O, Davenport ER, Gilad Y (2013). Taxonomic classification of bacterial 16S rRNA genes using short sequencing reads: evaluation of effective study designs. Plos One 8. doi:10.1371/journal.pone.0053608.
138. Mohite B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth, Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 13(3), pp. 638-649.
139. Müller, Thomas, Behrendt, Undine (2021). Exploiting the biocontrol potential of plant-associated pseudomonads-a step towards pesticide-free agriculture?, Biological Control, Volume 155, article id. 104538.
140. Myo E.M., Ge B., Ma J., Cui H., Liu B., Shi L., Jiang M., Zhang K. (2019). Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces fradiae* NKZ-259 and its formulation to enhance plant growth. BMC Microbiology, 19, pp.155.
141. Nosrati, R., Owlia, P., Saderi, H., Rasooli, I., & Malboobi, M. A. (2014). Phosphate solubilization characteristics of efficient nitrogen fixing soil *Azotobacter* strains. Iranian journal of microbiology, 6(4), pp.285.
142. Nguyen Hoang Anh, Cao Tan Phat, Le Minh Nhut, Le Thi My Thu, Nguyen Duc Trong, Le Thanh Quang, Ly Ngoc Thanh Xuan, Tran Chi Nhan, Ngo Thanh Phong, Nguyen Quoc Khuong (2025). Effectiveness of Nitrogen-Fixing Bacteria *Rhodobacter sphaeroides* in Soil–Plant Nitrogen and Rice Performance in Extremely Saline Acid Sulfate Soil over Two Consecutive Seasons. Sustainability, 17(5), 2228. <https://doi.org/10.3390/su17052228>.

143. Nguyen Thu Ha, Nguyen Thu Van (2017). Biofertilizer in Vietnam - Management and Development. and Biopesticides, Taiwan.
144. Nguyen Van Suc (2006). The production and application of biofertilizers in Vietnam. International Workshop on Sustained Management of the SoilRhizosphere System for Efficient, Bangkok, Thailand.
145. Ochieng (2022). Biofertilizer Application in Maize Production: Benefits and Challenges in Kenya. African Journal of Agricultural Research, 17(6), pp. 312-324.
146. Oliveira ALM, Santos OJAP, Marcelino PRF, Milani KML, Zuluaga MYA, Zucareli C, Gonçalves LSA. (2017). Maize Inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 Cells Enriched with Exopolysaccharides and Polyhydroxybutyrate Results in High Productivity under Low N Fertilizer Input. Front Microbiol, 26(8), pp. 1873.
147. Orr H.C., James A., Leifert C., Cooper J.M. & Cummings S.P. (2011). Diversity and activity of free-living nitrogen-fixing bacteria and total bacteria in organic and conventionally managed soils. Applied and Environmental Microbiology, 77, pp. 911-919.
148. Ortiz, A., Sansinenea, E., Keswani (2024). Bioengineering *Bacillus* spp. for Sustainable Crop Production: Recent Advances and Resources for Biotechnological Applications. J Plant Growth Regul. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s00344-024-11553-y>.
149. P.N. Bhattacharyya, D.K. Jha. (2022). *Azospirillum*: dual role in nitrogen fixation and IAA production for maize growth. Plant and Soil.
150. Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., Tyson, G. W. (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. Genome Res, 25(7), 1043-1055. doi:10.1101/gr.186072.114.

151. Patel, A. K., Kumar, S., Meena, V. S. (2022). Indole-3-acetic acid production by plant growth-promoting bacteria: A review on the mechanisms and applications in agriculture, *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(3), pp. 789-802.
152. Patel, M., Singh, R., Kumar, S. (2022). Role of Indole-3-Acetic Acid in Plant Growth and Development. *Journal of Plant Science and Research*, 38(4), pp. 456-467.
153. Pawar N.B. & N.S. Suryawanshi, (2022). Impact of Biofertilizers on Paddy (*Oryza sativa* L.) Cultivar Jaya. *International Journal of Advanced Research in Science, Communication and Technology (IJARSCT)*, 2 (3): 122-128. DOI: 10.48175/IJARSCT-3072.
154. Rayko M, Kravchenko I, Lapidus A (2024). Complete Genome Sequence of a Novel *Azospirillum* Strain TA Isolated from Western Siberia Chervaya Taiga Soil. *Microorganisms*, 12(12), pp. 2599.
155. Raziye Zare Hoseini, Ebrahim Mohammadi Goltapeh and Sepideh Kalatejari (2015). Effect of bio-fertilizer on growth, development and nutrient content (leaf and soil) of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *J. Crop Prot.*, 4, pp. 691-704.
156. Relman, D. A., Schmidt, T. M., MacDermott, R. P., Falkow, S. (1992). Identification of the uncultured *Bacillus* of Whipple's disease. *New England Journal of Medicine*, 327(5), pp. 293-301.
157. Rivier AJ, Myers KS, Garcia AK, Sobol MS, Kaçar B (2023). Regulatory response to a hybrid ancestral nitrogenase in *Azotobacter vinelandii*, 11(5).
158. Rodrigues A.A Forzani M.V., de Souza Soares R., Sibov S.T., Daniel J., Vieira G. (2016). Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. *Pesq. Agropec. Trop*, 46, pp. 149-158.

159. Roy A, Anwesha Ghosh, Yash, Prateeksha Mehra, Sumit Roy and Punyasloke Bhadury (2025). Insights into the genome of *Azotobacter* sp. strain CWF10, isolated from an agricultural field in Central India. Retrieved from <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000930.v4>.
160. Ryan R. Wick, Louise M. Judd, Claire L. Gorrie, Kathryn E. Holt (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *Computational Biology*. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>.
161. S. Rungin, C. Indananda, P. Suttiviriya. (2012). Plant growth enhancing effects by a siderophore-producing endophytic streptomycete isolated from a Thai jasmine rice plant (*Oryza sativa* L. cv. KDML105). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 102(3), pp. 463-472.
162. S. Spaepen, J. Vanderleyden. (2010). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 3, a001438.
163. S. Viscardi, V. Ventrino, P. Duran, A. Maggio, S. De Pascale, M.L. Mora, O. Pepe. (2016). Assessment of plant growth promoting activities and abiotic stress tolerance of *Azotobacter chroococcum* strains for a potential use in sustainable agriculture. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 16(3), pp. 848-863.
164. S.B. Sharma, R.Z. Sayyed, M.H. Trivedi. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus*, 2, pp. 587-565.
165. S.D. Nachiket, S. Dharendra, K.S. Ramesh. (2010). Nitrogenase Enzyme. *Der Pharmacia Sinica*, 1(2), pp.77-84.
166. Sambrook J. and Russell D.W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 1-170.

167. Samina M., George L. (2006). Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microbial Ecology*, 51, pp. 326-335.
168. Schwieger, F. and Tebbe, C. C. (1998). A new approach to utilize PCR-single-strand conformation polymorphism for rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), pp. 4870-4876.
169. Seo H, Kim JH, Lee SM, Lee SW (2024). The Plant-Associated *Flavobacterium*: A Hidden Helper for Improving Plant Health. *Plant Pathol*, 40(3), pp. 251-260.
170. Shao Y, Harrison EM, Bi D, Tai C, He X, Ou HY, Rajakumar K, Deng (2011). Z. TADB: a web-based resource for Type 2 toxin-antitoxin loci in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Res*, 39, pp. 606 - 611.
171. Shiuan-Yuh Chien (2017). The Research and Development Trend of Bio-fertilizers in Taiwan. 2nd International Conference on Biofertilizers and Biopesticides, Taiwan.
172. Steenhoudt O and Vanderleyden J (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev*, 24(4), pp. 487-506.
173. Steenhoudt O., Vanderleyden J. *Azospirillum*. (2000). A free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: Genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol*. doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.x, 24, pp. 487-506.
174. Su-San Chang (2017). The Role of Industry in Conducting Research, Development, and Commercialization of Biopesticides and

- Biofertilizers. 2nd International Conference on Biofertilizers and Biopesticides, Taiwan.
175. Takimoto R, Tatemichi Y, Aoki W, Kosaka Y, Minakuchi H, Ueda M, Kuroda K (2022). A critical role of an oxygen-responsive gene for aerobic nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii* and its application to *Escherichia coli*, 12(1).
 176. Tatusov RL, Natale DA, Garkavtsev IV, Tatusova TA, Shankavaram UT, Rao BS, Kiryutin B, Galperin MY, Fedorova ND, Koonin EV. (2001). The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res* 29:22-28. doi: 10.1093/nar/29.1.22.
 177. Vamadeva Angadi, Prashant Kumar Rai and Bineeta M Bara (2017). Effect of organic manures and biofertilizers on plant growth, seed yield and seedling characteristics in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*; 6(3), pp. 807-810.
 178. Van, V.T., Berge O., Ke S.N., Balandreau J. and Heulin T., (2000). Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulfate acid soils of Vietnam. *Plant and Soil*, 218(1-2), pp. 273-284.
 179. Vessey, J. K. (2022). Benefits of using microbial products in sustainable agriculture. *Agricultural Sustainability Journal*.
 180. Virgo M, Mostowy S, Ho BT (2025). Emerging models to study competitive interactions within bacterial communities. *Trends Microbiol.* 2025 Jan 10:S0966-842X(24)00325-1. doi: 10.1016/j.tim.2024.12.009.
 181. Volpiano CG, Sant'Anna FH, Ambrosini A, de São José JFB, Beneduzi A, Whitman WB, de Souza EM, Lisboa BB, Vargas LK, Passaglia LMP (2021). Genomic Metrics Applied to Rhizobiales (Hyphomicrobiales):

- Species Reclassification, Identification of Unauthentic Genomes and False Type Strains, 12.
182. Wagner S.C. (2011). Biological Nitrogen Fixation. *Nature Education Knowledge*, 3(10), pp. 15.
 183. Wang. (2021). Impact of arbuscular mycorrhizal fungi on maize yield and soil health. *Agricultural Research*.
 184. Wattam, A. R., Abraham, D., Dalay, O., Disz, T. L., Driscoll, T., Gabbard, J. L., Sobral, B. W. (2014). PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource. *Nucleic Acids Res*, 42(Database issue), D581-591. doi:10.1093/nar/gkt1099).
 185. Weiland-Bräuer N (2021). Friends or Foes-Microbial Interactions in Nature. *Biology (Basel)*, 10(6), pp. 496.
 186. Y. Jesmi, T. Jabir, R. Mujeeb, J. Basic Microbiol (2017). Nitrogen fixing potential of various heterotrophic *Bacillus* strains from a tropical estuary and adjacent coastal regions, 11, pp. 922-932.
 187. Y. Zhao (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development, 61, pp. 49-64.
 188. Yasuda, M.; Dastogeer, K.M.G.; Sarkodee-Addo, E.; Tokiwa, C.; Isawa, T.; Shinozaki, S.; Okazaki, S (2022). Impact of *Azospirillum* sp. B510 on the Rhizosphere Microbiome of Rice under Field Conditions. Retrieved from <https://doi.org/10.3390/agronomy12061367>.
 189. Zerbino, D. R., and Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res*. 18, 821-829. doi: 10.1101/gr.074492.107.
 190. Zhang (2020). Nitrogen and its role in plant growth and development: a review. *Journal of Plant Nutrition*, 43(6), pp. 835-853.
 191. Zhang (2023). Biofertilizer Application in Rice Cultivation in China. *Agricultural Research*.

192. Zhang W, Chen Y, Huang K, Wang F, Mei Z (2023). Molecular Mechanism and Agricultural Application of the NifA-NifL System for Nitrogen Fixation, *International Journal of Molecular Sciences (IJMS)*, 24(2), pp. 907. DOI:10.3390/ijms24020907
193. Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, N. B., Feng, Z., Kuczmariski, D., Higley, P., Ishimaru, C. A., Arunakumari, A., Barletta, R. G., & Vidaver, A. K. (2002). Isolation and characterization of endophytic bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, pp. 2198-2208.