

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



LÊ ANH THƯ

**PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH VÀ ĐÁNH GIÁ CÁC HOẠT TÍNH
CÓ LỢI CỦA MỘT SỐ VI SINH VẬT TRONG ĐẤT RỪNG
CÓ PHÂN BỐ LAN HÀI ĐÀI CUỐN Ở MỘT SỐ
TỈNH MIỀN TRUNG**

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC

LÊ ANH THƯ

**SINH HỌC
THỰC NGHIỆM**

2023

Hà Nội - 2023

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



LÊ ANH THU

**PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH VÀ ĐÁNH GIÁ CÁC HOẠT TÍNH CÓ LỢI
CỦA MỘT SỐ VI SINH VẬT TRONG ĐẤT RỪNG CÓ PHÂN BỐ
LAN HÀI ĐÀI CUỐN Ở MỘT SỐ TỈNH MIỀN TRUNG**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm
Mã số: 8420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :
TS. Nguyễn Thế Trang

Hà Nội - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả

LỜI CẢM ƠN

Hoàn thành bản luận văn khoa học này, em xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới TS. Nguyễn Thế Trang cùng tập thể khoa học Phòng Công nghệ vật liệu sinh học, Viện Công nghệ sinh học đã tận tâm hướng dẫn, chỉ dạy cho tôi về chuyên môn, đồng thời động viên, khích lệ và tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn.

Cảm ơn tới PGS.TS. Nguyễn Văn Sinh cùng nhóm nghiên cứu Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật đã cung cấp mẫu đất cho quá trình nghiên cứu.

Cảm ơn tới lãnh đạo Trạm Quan trắc và Phân tích môi trường lao động, Viện Khoa học an toàn và Vệ sinh lao động đã cung cấp cơ sở hạ tầng, trang thiết bị giúp tôi thực hiện các thí nghiệm.

Với tất cả sự trân trọng và quý mến, em xin gửi lời cảm ơn chân thành nhất đến toàn bộ quý Thầy cô trong Học viện Khoa học và Công nghệ, quý Thầy cô và các bạn trong Viện Công nghệ sinh học đã truyền đạt những kiến thức quý báu, những kinh nghiệm trong nghiên cứu cho em trong suốt quá trình học tập và thực hành nghiên cứu.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến gia đình và các bạn học viên Lớp Cao học Sinh học thực nghiệm khóa 2021 đã luôn quan tâm và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập cũng như hoàn thiện luận văn.

Tôi xin trân trọng cảm ơn./.

MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG	vii
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	ix
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. GIỚI THIỆU VỀ LOÀI LAN HÀI ĐÀI CUỐN (<i>Paphiopedilum appletonianum</i>) VÀ TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VI SINH VẬT TRONG ĐẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC CHỨC NĂNG	3
1.1.1. Giới thiệu về loài lan hài đài cuốn (<i>Paphiopedilum</i> <i>appletonianum</i>)	3
1.1.2. Tình hình nghiên cứu vi sinh vật trong đất có hoạt tính sinh học chức năng trên thế giới	4
1.1.3. Tình hình nghiên cứu vi sinh vật trong đất có hoạt tính sinh học chức năng tại Việt Nam	6
1.2. MỘT SỐ NHÓM VI SINH VẬT TRONG ĐẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC CHỨC NĂNG	8
1.2.1. Nhóm vi sinh vật cố định nitơ	8
1.2.2. Nhóm vi sinh vật phân giải cellulose	9
1.2.3. Nhóm vi sinh vật phân giải photpho	11
1.2.4. Nhóm vi sinh vật sinh tổng hợp Indole- 3- Acetic Acid	12
1.3. VAI TRÒ CỦA VI SINH VẬT TRONG ĐẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC CHỨC NĂNG	13
1.3.1. Vai trò của nhóm vi sinh vật cố định nitơ	13
1.3.2. Vai trò của nhóm vi khuẩn phân giải cellulose	14
1.3.3. Vai trò của nhóm vi sinh vật phân giải photpho	14
1.3.4. Vai trò của nhóm vi sinh vật sinh tổng hợp Indole- 3- Acetic Acid	15
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	16

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	16
2.1.1. Các mẫu nghiên cứu	16
2.1.2. Hóa chất, thiết bị chính dùng trong nghiên cứu	17
2.1.3. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật	18
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	19
2.2.1. Phương pháp lấy mẫu	19
2.2.2. Phương pháp đánh giá các mẫu đất thu thập	19
2.2.3. Phương pháp xác định các nhóm vi sinh trong các mẫu đất thu thập	19
2.2.4. Phương pháp xác định vi sinh vật có khả năng cố định nitơ, phân giải cellulose, phân giải photpho và sinh tổng hợp Indole- 3- Acetic Acid trong các mẫu đất thu thập	21
2.2.5. Phương pháp định danh chủng vi sinh vật	22
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	25
3.1. ĐÁNH GIÁ CÁC MẪU ĐẤT THU ĐƯỢC KHU VỰC CÓ QUẦN THỂ LAN	25
3.1.1. Thông tin mẫu đất thu năm 2021 khu vực có quần thể Lan	25
3.1.2. Thông tin mẫu đất thu năm 2022 khu vực có quần thể Lan	28
3.2. XÁC ĐỊNH NHÓM VI KHUẨN HIẾU KHÍ, NẤM MỐC VÀ XẠ KHUẨN TRONG MẪU ĐẤT KHU VỰC CÓ QUẦN THỂ LAN	31
3.2.1. Nhóm vi khuẩn hiếu khí trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan	31
3.2.2. Nhóm nấm mốc trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan	34
3.2.3. Nhóm xạ khuẩn trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan	37
3.3. XÁC ĐỊNH NHÓM VI SINH VẬT CÓ KHẢ NĂNG CỐ ĐỊNH NITƠ, PHÂN GIẢI CELLULOSE, PHÂN GIẢI PHOTPHO VÀ SINH TỔNG HỢP INDOLE- 3- ACETIC ACID TRONG MẪU ĐẤT KHU VỰC CÓ QUẦN THỂ LAN	41
3.3.1. Nhóm vi sinh vật có khả năng cố định nitơ trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan	41
3.3.2. Nhóm vi sinh vật phân giải photpho trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan	44
3.3.3. Nhóm vi sinh vật phân giải cellulose trong mẫu đất khu	47

vực có quần thể Lan	
3.3.4. Nhóm vi sinh vật sinh tổng hợp Indole- 3- Acetic Acid trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan	49
3.4. PHÂN LẬP MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN VÀ XẠ KHUẨN TRONG MẪU ĐẤT KHU VỰC CÓ QUẦN THỂ LAN	52
3.4.1. Phân lập sơ bộ các chủng vi khuẩn trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan	52
3.4.2. Phân lập sơ bộ các chủng xạ khuẩn trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan	55
3.5. ĐỊNH DANH CHỦNG VI KHUẨN VÀ XẠ KHUẨN LỰA CHỌN TRONG MẪU ĐẤT KHU VỰC CÓ QUẦN THỂ LAN	59
3.5.1. Phân loại theo đặc điểm sinh học các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn lựa chọn	59
3.5.2. Phân loại theo khả năng sử dụng Kit chuẩn hóa sinh của hai chủng vi khuẩn lựa chọn	63
3.5.3. Phân loại theo phương pháp sinh học phân tử các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn lựa chọn	65
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	69
DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN	70
TÀI LIỆU THAM KHẢO	71

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Bp	Base pair (Cặp bazơ)
ĐNbn	Đà Nẵng Bà Nà
ĐLyt	Đăk Lăk, Yang Tao
ĐLkn	Đăk Lăk, Krông Nô
ĐLkb	Đăk Lăk, Krông Bông
ĐLknR	Đăk Lăk, Krông Nô, Lăk
IAA	Indole- 3- Acetic Acid
KPH	Không phát hiện
PCR	Polymerase Chain Reaction (Phản ứng chuỗi trùng hợp)
QNbK	Quảng Nam bò kết
QNnv	Quảng Nam nước vàng
QNbc	Quảng Nam bàn cờ
QT	Quảng Trị
VSV	Vi sinh vật
TCVN	Tiêu chuẩn Việt Nam

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng	Tên bảng	Trang
3.1	Kết quả thu mẫu đất năm 2021 tại khu vực có quần thể Lan	25
3.2	Kết quả thu mẫu đất năm 2022 tại khu vực có quần thể Lan	28
3.3	Số lượng tế bào các nhóm vi khuẩn hiếu khí trong mẫu đất thu năm 2021 khu vực có quần thể Lan	32
3.4	Số lượng tế bào các nhóm vi khuẩn hiếu khí trong mẫu đất thu năm 2022 khu vực có quần thể Lan	33
3.5	Số lượng tế bào các nhóm nấm mốc trong mẫu đất thu năm 2021 khu vực có quần thể Lan	35
3.6	Số lượng tế bào các nhóm nấm mốc trong mẫu đất thu năm 2022 khu vực có quần thể Lan	36
3.7	Số lượng tế bào các nhóm xạ khuẩn trong mẫu đất thu năm 2021 khu vực có quần thể Lan	38
3.8	Số lượng tế bào các nhóm xạ khuẩn trong mẫu đất thu năm 2022 khu vực có quần thể Lan	39
3.9	Số lượng tế bào vi sinh vật cố định nitơ trong các mẫu đất thu năm 2021 khu vực có quần thể Lan	41
3.10	Số lượng tế bào vi sinh vật cố định nitơ trong các mẫu đất thu năm 2022 khu vực có quần thể Lan	42
3.11	Số lượng tế bào vi sinh vật phân giải photphat trong các mẫu đất thu năm 2021 khu vực có quần thể Lan	45
3.12	Số lượng tế bào vi sinh vật phân giải photphat trong các mẫu đất thu năm 2022 khu vực có quần thể Lan	46

3.13	Số lượng tế bào vi sinh vật phân giải cellulose trong các mẫu đất thu năm 2021 khu vực có quần thể Lan	47
3.14	Số lượng tế bào vi sinh vật phân giải cellulose trong các mẫu đất thu năm 2022 khu vực có quần thể Lan	48
3.15	Số lượng tế bào vi sinh vật sinh tổng hợp Indole- 3- Acetic Acid trong các mẫu đất thu năm 2021 khu vực có quần thể Lan	50
3.16	Số lượng tế bào vi sinh vật sinh tổng hợp Indole- 3- Acetic Acid trong các mẫu đất thu năm 2022 khu vực có quần thể lan	51
3.17	Một số đặc điểm sinh học chủng vi khuẩn phân lập từ đất khu vực có quần thể Lan	53
3.18	Một số đặc điểm sinh học chủng xạ khuẩn phân lập từ đất khu vực có quần thể Lan	56
3.19	Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn nghiên cứu	61
3.20	Đặc điểm sinh học của hai chủng xạ khuẩn nghiên cứu	62
3.21	Khả năng sử dụng cơ chất theo Kit API 50 CHB của chủng QT03 và QNbk05 so sánh với loài trong bảng Index của Kit	63

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình	Tên hình	Trang
1.1	Lan hài đài cuốn	3
3.1	Hình ảnh vi khuẩn hiếu khí tổng số phân lập	32
3.2	Hình ảnh nấm mốc tổng số phân lập	35
3.3	Hình ảnh xạ khuẩn tổng số phân lập	38
3.4	Hình ảnh đại diện vi sinh vật cố định nitơ phân lập	41
3.5	Hình ảnh đại diện vi sinh vật phân giải photpho phân lập	44
3.6	Hình ảnh đại diện vi sinh vật phân giải cellulose phân lập	47
3.7	Hình ảnh đại diện nhóm vi sinh vật sinh tổng hợp Indole- 3-Acetic Acid	50
3.8	Hình ảnh vòng phân giải cellulase của các chủng tuyển chọn	60
3.9	Hình ảnh khuẩn lạc và tế bào 2 chủng vi khuẩn nghiên cứu	60
3.10	Hình ảnh khuẩn lạc và tế bào 2 chủng xạ khuẩn nghiên cứu	62
3.11	Ảnh sử dụng Kit chuẩn CHB của chủng vi khuẩn sau 48 giờ	63
3.12	Sản phẩm PCR của 2 chủng vi khuẩn và 2 chủng xạ khuẩn	66
3.13	Cây phát sinh chủng loại thuộc nhóm vi khuẩn	67
3.14	Cây phát sinh chủng loại thuộc nhóm xạ khuẩn	68

MỞ ĐẦU

Vi sinh vật có vai trò quan trọng trong tuần hoàn vật chất, chúng luôn tham gia vào quá trình phân giải các chất và chuyển hóa thành các hợp chất có ích khác giúp duy trì sự cân bằng trong tự nhiên. Vi sinh vật đất là một nhóm các sinh vật bao gồm các vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm, vi tảo và động vật nguyên sinh... Chỉ nói riêng vi khuẩn cũng có rất nhiều loại như vi khuẩn hiếu khí, kỵ khí, tự dưỡng, dị dưỡng, vi khuẩn cố định photpho, cố định nitơ, giúp phân hủy chất thải và tạo điều kiện tốt để thực vật và các loài sinh vật khác phát triển. Tính đặc thù của từng hệ sinh thái thể hiện ở sự thay đổi liên tục của năng lượng và vật chất, liên quan đến các chu trình tuần hoàn vật chất, mà cụ thể ở đây là các nguyên tố sinh học như carbon, nitơ, lưu huỳnh, photpho và các nguyên tố vi lượng khác nên trạng thái cân bằng của các hệ sinh thái luôn luôn bị phá vỡ. Số lượng của vi sinh vật trong đất phụ thuộc vào nhiều yếu tố như môi trường, nhiệt độ, độ ẩm, các chất hữu cơ trong đất ... Nhiệt độ từ $20 \div 30$ °C, độ ẩm lý tưởng từ $70 \div 80$ % và có độ thoáng khí tốt được coi là thích hợp cho sự phát triển của nhiều loại vi sinh vật. Mặc dù kích thước của vi sinh vật rất nhỏ nhưng với số lượng lớn khoảng $10^6 \div 10^9$ tế bào/g đất đóng vai trò quan trọng trong hệ sinh thái. Vi sinh vật trong đất tham gia tích cực vào quá trình phân giải các hợp chất hữu cơ cung cấp chất dinh dưỡng cho thực vật: cố định nitơ không khí thành các hợp chất nitơ (NH_3 , NH_4^+) cung cấp cho cây; tham gia hình thành chất mùn tạo thức ăn dự trữ cho cây trồng và cấu tạo nên cấu tạo của đất, phân giải phế thải hữu cơ nông lâm nghiệp, công nghiệp và đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ môi trường. Bên cạnh các vi sinh vật gây bệnh tham gia vào việc gây ô nhiễm môi trường thì cũng có nhiều vi sinh vật có khả năng đối kháng với các vi sinh vật gây bệnh hại cho cây trồng [1].

Lan hài đài cuốn - *Paphiopedilum appletonianum* (Gower) Rolfe) là loài thực vật quý hiếm nằm trong danh mục IA của Nghị định số 06/2019/NĐ-CP ngày 22 tháng 01 năm 2019 của Chính phủ về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm và thực thi công ước về buôn bán quốc tế các loài động vật, thực vật hoang dã nguy cấp [2]. Nhiệm vụ “Đánh giá, điều tra, đề xuất quy định, quy trình kỹ thuật bảo tồn và xây dựng mô hình bảo tồn, phát triển 02 loài lan nguy cấp, quý, hiếm, có giá trị cao, được ưu tiên bảo vệ Lan hài chai (*Paphiopedilum callosum* (Rchb.f.) Stein) và Lan hài cuốn (*Paphiopedilum appletonianum* (Gower) Rolfe) ở Việt Nam, mã số UQSNMT.01/21-23” do PGS.TS. Nguyễn Văn Sinh và cộng sự thực hiện, việc nghiên cứu về môi trường sống phù hợp của loài là cần thiết làm cơ

sở khoa học cho công tác bảo tồn loài. Trong môi trường đất sống, thành phần vi sinh vật đóng vai trò quan trọng trong sự sinh trưởng và phát triển của loài lan, chúng tham gia vào quá trình phân giải các chất hữu cơ tạo nên mùn và các hợp chất cần thiết liên quan đến các chu trình trao đổi chất, đóng vai trò cân bằng trong từng hệ sinh thái, thành phần vi sinh vật cho phép đánh giá điều kiện sinh thái môi trường đất. Từ lâu, chế phẩm phân bón vi sinh đã được sử dụng để khắc phục ảnh hưởng xấu của việc sử dụng phân bón hoá học đến cây trồng và gây ô nhiễm môi trường an toàn với môi trường sinh thái, việc sử dụng chế phẩm vi sinh vật phù hợp với xu hướng an toàn của nông nghiệp hiện nay. Việc nghiên cứu môi trường sống phù hợp của loài Lan làm cơ sở cho công tác bảo tồn loài, đồng hành tìm kiếm các chủng vi sinh vật bản địa có hoạt tính sinh học nhằm định hướng phát triển các chế phẩm vi sinh ứng dụng là hết sức cần thiết [3].

Mục tiêu cơ bản của đề tài:

Đánh giá được một số nhóm vi sinh vật tổng số trong mẫu đất khu vực quần thể Lan hài đài cuốn ở một số tỉnh miền Trung. Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn và xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulase cao.

Nội dung nghiên cứu:

- Đánh giá các mẫu đất thu được khu vực có quần thể Lan.
- Xác định nhóm vi khuẩn hiếu khí, nấm mốc và xạ khuẩn hữu ích trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan cung cấp dữ liệu cho công tác bảo tồn loài.
- Xác định nhóm vi sinh vật có khả năng cố định nitơ tự do, phân giải cellulose, phân giải photpho và sinh tổng hợp Indole- 3- Acetic Acid trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan.
- Phân lập một số chủng vi khuẩn và xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp enzym cellulase cao trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan.
- Định danh chủng vi khuẩn và xạ khuẩn lựa chọn.

Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài: Nghiên cứu về môi trường sống phù hợp của loài Lan là cơ sở khoa học cho công tác bảo tồn loài Lan.

Những đóng góp của luận văn:

- Cung cấp cơ sở dữ liệu về vi sinh vật trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan.
- Tuyển chọn chủng vi sinh vật có hoạt tính sinh học nhằm định hướng phát triển các chế phẩm vi sinh ứng dụng.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. GIỚI THIỆU VỀ LOÀI LAN HÀI ĐÀI CUỐN (*Paphiopedilum appletonianum*) VÀ TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VI SINH VẬT TRONG ĐẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC CHỨC NĂNG

1.1.1. Giới thiệu về loài Lan hài đài cuốn (*Paphiopedilum appletonianum*)

Đồng danh: *Cypripedium appletonianum* Gower; *Paphiopedilum ppletonianum* var. *poyntzianum* (O'Brien) Pfitz.

Tên khác: Hài táo, Lan hài apleton, Vệ hài apleton, Vệ hài đài trắng

Họ lan – *Orchidaceae*

Loài Lan hài đài có đặc điểm gồm 4 ÷ 6 lá xòe. Dạng lá thuôn dài, kích thước 15 ÷ 25 x 2 ÷ 4 cm, có các khoang màu lục nhạt và lục thẫm ở mỗi bên. Cụm hoa dạng mảnh với cuống dài 20-50 cm và thường có một hoa đơn lẻ. Lá bắc hình mác, dài 1,5-2,1 cm, rìa lá có lông. Những bông hoa có đường kính 6-10 cm, và các lá đài bên ngoài hơi có lông. Lá đài gần trục màu lục nhạt với các gân dọc màu thẫm hơn, hình trứng, kích thước 2,7 ÷ 4,5 x 2 ÷ 3,2 cm. Các lá đài khác cùng màu, hình bầu dục, kích thước 2 ÷ 3 x 1 ÷ 1,5 cm. Cánh hoa màu xanh ở dưới, có nhiều đốm đỏ thẫm, nhạt dần đến hồng tía ở trên, hình thìa, kích thước 4,4 ÷ 5,8 x 1,2 ÷ 1,8 cm. Môi màu nâu tía nhạt, có gân sâu và mép mỏng, dài 3,6 ÷ 4,6 cm. Nhị màu vàng, hình trứng rộng, kích thước 0,7 ÷ 0,9 x 0,8 ÷ 0,9 cm, bầu dài từ 3 tới 6 cm, có lông.



Hình 1.1. Lan hài đài cuốn
(Ảnh của nhà sinh vật học Phùng Mỹ Trung)

Loài Lan này sống trong rừng nguyên sinh nhiệt đới mưa mùa, mọc thành đám nhỏ trên đất nhiều mùn ở sườn đỉnh núi, dưới tán rừng nguyên sinh rậm trên núi đá granit, ở độ cao 900 ÷ 1.900 m. Loài hoa hiếm này phân bố rải rác ở các khu vực núi cao của Việt Nam và nhiều quốc gia trong khu vực Đông Nam Á.

Quá trình phát triển của loài Lan hài đài cuốn phụ thuộc vào nhiều yếu tố như ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm, chất lượng đất... Loài Lan này sinh sản bằng hạt và chồi.

Đây là loài hoa có màu sắc rất đẹp, được ưu chuộng. Tuy nhiên, loài này đang có nguy cơ bị tuyệt chủng do việc thu hái để bán trồng làm cảnh và mất môi trường sống tự nhiên. Loài Lan hài đài cuốn đã được ghi vào Sách Đỏ Việt Nam với phân hạng VU B1 + 2b, c, e và cần có biện pháp bảo vệ môi trường sống tự nhiên của loài, ngăn chặn việc thu hái và buôn bán trái phép [4].

1.1.2. Tình hình nghiên cứu vi sinh vật trong đất có hoạt tính sinh học chức năng trên thế giới

Việc nghiên cứu vi sinh vật trong đất và các chức năng sinh học của chúng là rất quan trọng để phát triển nền nông nghiệp bền vững. Với tốc độ gia tăng dân số nhanh chóng và biến đổi khí hậu toàn cầu hiện nay, đã tạo ra nhiều thách thức cho ngành nông nghiệp và đặt ra yêu cầu cao đối với năng suất và hiệu suất sản xuất. Vi sinh vật trong đất có thể giúp nâng cao năng suất cây trồng, giảm sự phụ thuộc vào phân bón hóa học và thuốc trừ sâu. Nghiên cứu về vi sinh vật trong đất có thể giúp phát triển các biện pháp canh tác mới, giảm thiểu tác động tiêu cực của nông nghiệp đến môi trường và đảm bảo an toàn thực phẩm. Ngoài ra, việc nghiên cứu vi sinh vật đất cũng giúp giải quyết các vấn đề liên quan đến biến đổi khí hậu, như làm tăng khả năng lưu giữ cacbon trong đất, giảm thiểu phát thải nhà kính, tăng sức chứa của đất và đảm bảo sự cân bằng sinh thái. Do đó, việc nghiên cứu vi sinh vật trong đất là hết sức cần thiết để phát triển nông nghiệp bền vững và đảm bảo an toàn thực phẩm trong tương lai. Trong bộ rễ của thực vật là một hệ sinh thái tuy nhỏ nhưng vô cùng phức tạp, ước tính có hàng chục nghìn loài vi sinh vật khác nhau. Tại đây sự tương tác giữa thực vật, đất, vi sinh vật diễn ra mạnh mẽ. Vi sinh vật đất trong vùng rễ sử dụng những chất tiết của cây là chất dinh dưỡng đồng thời cung cấp chất dinh dưỡng lại cho cây trồng thông qua quá trình trao đổi và phân giải chất. Nhiều nhà khoa học đang tìm hiểu về các loài vi sinh vật trong đất và chức năng của chúng trong hệ sinh thái. Kết quả nghiên cứu đã cho thấy rằng vi sinh vật trong đất đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ môi trường và hỗ trợ sự phát triển của thực vật.

Trong đất, vi khuẩn thường có số lượng lớn khoảng $10^7 \div 10^8$ CFU/g, trong đó vi khuẩn hiếu khí có số lượng gấp 2 ÷ 3 lần vi khuẩn kỵ khí. Vi sinh vật trong đất rất đa dạng và có khả năng thích nghi cao để đáp ứng tốt các điều kiện trong đất bằng cách sản xuất các enzyme và các chất hữu cơ để tăng cường quá trình hấp thụ dinh dưỡng, giải phóng các chất dinh dưỡng từ chất hữu cơ và chất khoáng, ngoài ra vi sinh vật còn có thể tạo ra các màng sinh học để bảo vệ tránh khỏi các tác nhân có hại [5]; [6].

Hàm lượng phân trong đất có thể giúp ta xác định mức độ phát triển của cây trồng và độ đa dạng của vi sinh vật trong đất. Phân là một chất tự nhiên cần thiết cho sự tăng trưởng của cây, hỗ trợ vi sinh vật trong đất trong việc trao đổi chất và hỗ trợ sự phát triển của hệ sinh thái. Tuy nhiên, hàm lượng phân quá cao hoặc quá thấp cũng có thể gây tác động xấu đến vi sinh vật trong đất và sự phát triển của cây trồng. Vì vậy, hàm lượng phân trong đất cần kiểm soát để đảm bảo sự phát triển tốt nhất của hệ sinh thái. Trong trồng trọt, hàm lượng photpho trong đất thường rất thấp và không thể đáp ứng nhu cầu của cây trồng nên người ta thường bổ sung thêm phân bón chứa lân, tuy nhiên, cây trồng chỉ có thể hấp thụ được một phần nhỏ lượng phân bón cung cấp và phần lớn sẽ bị giữ lại trong đất, phần lớn này có thể bị cố định trong đất hoặc có thể bị rửa trôi gây lãng phí và ô nhiễm môi trường. Để giảm thiểu tình trạng này, người ta có thể sử dụng các phương pháp như chia nhỏ lượng phân bón và bón trực tiếp vào rễ cây để giảm lượng phân bón bị rửa trôi, đồng thời có thể sử dụng các chất keo giúp giữ lân trong đất hoặc sử dụng phân bón hữu cơ và phân bón vi sinh là những nguồn phân bón có thể giúp tăng cường hoạt động của vi sinh vật trong đất, giúp chuyển đổi phần lớn các chất dinh dưỡng cố định thành dạng tan và dễ hấp thụ hơn. Các vi sinh vật phân giải lân vừa giúp giảm được lượng phân lân bón cho cây trồng, đồng thời giải phóng được cả lượng lân tích trữ trong đất. Bởi những lợi ích như vậy, các vi sinh vật phân giải lân được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm, đồng thời nhiều nước trên thế giới đã sản xuất chế phẩm vi sinh theo nhiều hướng, nhiều cách thức khác nhau [7]; [8]; [9].

Các chủng nấm thuộc loài *Aspergillus*; vi khuẩn thuộc loài *Bacillus* có khả năng chuyển hóa photphat khó tan thành dạng dễ hòa tan ở trong đất nhờ tiết ra các axit hữu cơ như formic, succinic, axetic, lactic, propionic và fumaric. Các axit này có thể làm giảm pH và hòa tan photphat khó tan [10]; [11]; [12].

Vi sinh vật có hoạt tính sinh học chức năng là một “cánh tay” đắc lực giúp việc bổ sung phân bón vào đất đạt hiệu quả và bền vững. Các loại vi sinh vật này có khả năng phân giải lân bằng cách sản xuất các enzyme phân hủy phức hợp lân giúp

cho cây trồng hấp thụ lân tốt hơn. Vi sinh vật phân giải lân thường được tìm thấy trong đất và đáy biển, được tách ra và nhân giống để sản xuất phân bón vi sinh. Các chủng vi sinh vật phân giải lân khác nhau có các đặc tính và khả năng phân giải lân khác nhau, do đó cần phải tìm hiểu kỹ trước khi lựa chọn loại vi sinh vật phù hợp cho đất và cây trồng cụ thể. Nghiên cứu của Canada và Tây Ban Nha đã chứng minh tính hữu ích của vi sinh vật phân giải lân, đặc biệt là chủng *P. striata* và *Acenitobacter*. Việc sử dụng phân bón có chứa vi sinh vật phân giải lân thay cho phân bón hóa học không chỉ giúp tiết kiệm chi phí mà còn giảm tác động tiêu cực đến môi trường và cải thiện chất lượng sản phẩm [12]; [13]; [14].

Hiện nay công nghệ sinh học đang được ứng dụng rộng rãi trong sản xuất phân bón và các sản phẩm liên quan đến nông nghiệp. Điều này giúp tăng hiệu quả sản xuất, giảm chi phí và hạn chế tác động xấu đến môi trường. Nhiều quốc gia đã đẩy mạnh nghiên cứu và ứng dụng công nghệ này để phát triển nông nghiệp bền vững và cải thiện đời sống của người dân nông thôn. Tuy nhiên, việc sản xuất phân bón vi sinh cũng phụ thuộc vào điều kiện tự nhiên và kinh tế xã hội của mỗi nước. Một số nước có điều kiện thuận lợi để phát triển công nghệ sản xuất phân bón vi sinh với qui mô công nghiệp, trong khi đó, một số nước khác chỉ có thể sản xuất phân bón vi sinh trên cấp độ gia đình hoặc nhỏ hơn, vấn đề quan trọng là việc sản xuất phân bón vi sinh và các sản phẩm liên quan đến nông nghiệp phải được thực hiện theo hướng tiện cho người sử dụng và cho hiệu quả kinh tế cao nhất. Ngoài ra, các sản phẩm này cũng phải đảm bảo an toàn cho người sử dụng và bảo vệ môi trường [15]; [16]; [17].

1.1.3. Tình hình nghiên cứu vi sinh vật trong đất có hoạt tính sinh học chức năng tại Việt Nam

Tình hình nghiên cứu về vi sinh vật trong đất có hoạt tính sinh học chức năng tại Việt Nam đang phát triển và được tập trung vào nhiều lĩnh vực khác nhau, bao gồm sản xuất nông nghiệp, bảo vệ môi trường, và địa chất học. Nhiều nhà khoa học đang tìm hiểu về sự tác động của vi sinh vật trong đất và chức năng của chúng đối với hệ sinh thái tại Việt Nam. Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng vi sinh vật trong đất có hoạt tính sinh học chức năng là một phần quan trọng của hệ thống sinh thái tại Việt Nam và có thể đóng vai trò trong việc hỗ trợ sự phát triển nông nghiệp và bảo vệ môi trường. Với mục tiêu phát triển nông nghiệp sinh thái bền vững và để đáp ứng nhu cầu của người sử dụng, cũng như trên thế giới thì tại Việt Nam có nhiều đề tài nghiên cứu về vi sinh vật có hoạt tính sinh học chức năng. Cụ thể là khả năng phân giải lân khó tan cũng như cố định đạm và sinh chất sinh tổng hợp IAA.

Các nghiên cứu dựa vào các phương pháp phân loại vi khuẩn và phân loại nấm mốc đã phân loại và định danh được 05 chủng vi sinh vật sử dụng cho sản xuất phân bón vi sinh vật chức năng cho cây cà phê: 03 chủng vi khuẩn cố định nitơ là *Azotobacter chroococum* Ab-CF 7.2, *Acetobacter diazotrophicus* Ac-CF 2.2 và *Azospirillum brasilense* As-CF1.5; 01 chủng vi khuẩn phân giải lân là *Bacillus subtilis* VL-CF7.3 và 1 chủng nấm mốc phân giải lân là *Aspergillus tubingensis* ML-CF1.3. Tất cả các chủng vi sinh vật được tuyển chọn đều thuộc nhóm vi sinh vật an toàn sinh học cấp 1 theo qui định của cộng đồng Châu Âu. Kết quả nghiên cứu cho thấy cả 5 chủng có tên phân loại như trên đều có thể ứng dụng vào việc sản xuất chế phẩm phân vi sinh cho cây trồng [18]; [19]; [20]; [21]; [22].

Về hoạt tính phân giải lân, có nghiên cứu và sử dụng vi sinh vật phân giải lân của Phạm Bích Hiên và cộng sự. Kết quả đánh giá cho thấy hoạt tính sinh học của 1 số chủng *Bacillus* phân giải lân như sau: chủng vi sinh vật B07 tạo đường kính vòng phân giải lân thấp nhất (14 mm), hàm lượng lân tan là 26,5 (mg/lít); chủng B04 tạo đường kính vòng phân giải lân cao nhất (20 mm), hàm lượng lân tan lên tới 39,3 mg/lít. Ngoài khả năng phân giải lân, các chủng vi sinh vật nghiên cứu còn có hoạt tính sinh tổng hợp IAA: chủng B07 130,0 ug/ml, B04 228,0 ug/ml, B17 69,0 ug/ml, B19 125,0 ug/ml cho khả năng kháng khuẩn tạo vòng đối kháng vi khuẩn héo xanh có đường kính lần lượt là 6,0; 12,0 và 13,0 (mm). Sau đó các chủng vi sinh vật được nhân lên theo phương pháp lên men chìm, chế tạo chất mang và phối trộn tạo ra chế phẩm, phân hữu cơ vi sinh vật phân giải lân để hoàn thiện chế phẩm phân giải lân từ hỗn hợp 3 chủng *Bacillus*. Chế phẩm đã được kiểm tra chất lượng sau đó đưa vào sản xuất tại các doanh nghiệp [20].

Trong nghiên cứu tuyển chọn chủng *Bacillus*, các nghiên cứu đã tìm được chủng *B. subtilis* B16 có hoạt tính đối kháng với vi khuẩn gây bệnh héo xanh cho cây khoai tây cao, đường kính vòng ức chế vi khuẩn của chủng *B. subtilis* B16 là 22 mm cho thấy khả năng kháng khuẩn của chủng này khá cao; ngoài ra thì chủng B16 còn có khả năng sản xuất hoạt chất kích thích sinh trưởng thực vật, cụ thể thì hàm lượng IAA thô thu được là 133 µg/ml. Ngoài khả năng phân giải lân và cố định đạm thì vi sinh vật còn có khả năng tổng hợp một số chất kháng các loại nấm và sâu bệnh. Từ 20 mẫu rễ, cành cây cam thu thập ở Hàm Yên - Tuyên Quang, đã tuyển chọn được 40 chủng xạ khuẩn. Trong số 40 chủng phân lập được có: 30% xạ khuẩn kháng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, 12,5% kháng *Pseudomonas aeruginosa*, 2,5% kháng *Bacillus subtilis*. Từ đó tiến hành chọn được 2 chủng R12-4 và C12 có hoạt tính kháng vi khuẩn và nấm cao. Với chủng R12-4 có tạo vòng kháng khuẩn

với vi khuẩn kiềm định *S. aureus*, *P. aeruginosa* lần lượt là 18 và 24 mm; chủng C12 tạo vòng kháng nấm với nấm kiềm định *Collectrichum truncatum*, *F. oxysporum*, *Fusarium udum*, *Geotrichum candidum* lần lượt là 20; 14; 12; 22 mm. Phân loại cho kết quả 2 chủng đều thuộc chi *Streptomyces*. Dựa trên phân tích đặc điểm sinh học và trình tự gen 16S rRNA chủng C12 thuộc loài *Streptomyces angustmycetius*, được định danh là *Streptomyces angustmycetius* C12 và chủng R12-4 thuộc loài *Streptomyces prasinopilosus*, được định danh là *Streptomyces prasinopilosus* R12-4 [23]; [24].

Với nghiên cứu về vi sinh vật trên đất trồng ngô ngoại thành Hà Nội, các tác giả đã phân lập được 100 chủng vi sinh vật có hoạt tính phân giải lân khó tan. Trong đó có 52 % phân giải yếu, 45 % phân giải trung bình và chỉ có 3 % có khả năng chuyển hóa tốt. Ba chủng mạnh nhất có khả năng chuyển hóa được trên 41 % quặng photphorit. Các nghiên cứu trên nấm đã tìm thấy chủng *Aspergillus awamori* Nakazawa MN1 với khả năng phân giải lân cao. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy KNO_3 , $NaNO_3$ và $(NH_4)_2SO_2$ là những nguồn nitơ tốt nhất cho môi trường sinh trưởng của chủng MN1, đồng thời tạo khả năng phân giải lân tốt nhất. Để lựa chọn thành công các chủng vi sinh vật dùng để sản xuất phân bón vi sinh, các tác giả rất quan tâm đến tác động của nhiệt độ, pH, tốc độ lắc ... lên sinh trưởng và hoạt tính của chúng. Các yếu tố này ảnh hưởng đến khả năng phát triển và sản xuất các hoạt chất của vi sinh vật, do đó việc kiểm soát các yếu tố này là rất quan trọng để đạt được sản phẩm phân bón vi sinh tốt nhất. [23].

Ngoài các đánh giá về hoạt tính sinh học của vi sinh vật trong đất thì hiện nay cũng có các đánh giá về các yếu tố ảnh hưởng đến mật độ của vi sinh vật trong đất cây trồng. Điển hình như tại đất trồng ngô Hà Nội, theo từng giai đoạn sinh trưởng phát triển của cây ngô thì mật độ vi sinh vật chuyển hóa hydratcacbon có sự biến động [25].

1.2. MỘT SỐ NHÓM VI SINH VẬT TRONG ĐẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC CHỨC NĂNG

1.2.1. Nhóm vi sinh vật cố định nitơ

Nhóm vi khuẩn cố định nitơ là một nhóm vi khuẩn có khả năng cố định nitơ trong đất và cung cấp cho các tế bào của thực vật. Vi khuẩn này có thể tồn tại như một vi sinh vật độc lập hoặc hợp tác với các tế bào thực vật. Các vi khuẩn cố định nitơ có thể giúp giảm sự phụ thuộc của cây trồng vào các nguồn nitơ nhân tạo thay thế bằng nguồn nitơ tự nhiên cho các tế bào cây, giúp cây sinh trưởng và phát triển

tốt hơn. Việc sử dụng các vi khuẩn cố định nitơ trong quản lý đất và canh tác nông nghiệp có thể giúp giảm sự phụ thuộc vào phân bón hóa học và tăng sức đề kháng tự nhiên của cây trong môi trường sống. Vi khuẩn *Clostridium* là một trong những loài vi khuẩn cố định nitơ phân tử điển hình, trong đó *Clostridium pasteurianum* là loài cố định đạm cao nhất với khả năng cố định $5 \div 10$ mg nitơ khi sử dụng hết 1g cacbon. Ngoài ra, nhóm vi khuẩn cố định nitơ tự do hiếu khí cũng gồm các chi *Beijerinckia* spp. và *Azotobacter* spp. [26]; [27]; [28].

- Nhóm vi khuẩn thuộc chi *Beijerinckia* spp. là vi khuẩn hiếu khí có khả năng cố định nitơ nhờ việc chuyển đổi khí nitơ trong không khí thành các hợp chất dễ dàng hấp thu được cho cây trồng. Chúng cũng có thể sinh tổng hợp các chất kích thích sinh trưởng giúp cây trồng phát triển tốt hơn và đạt năng suất cao hơn. Vi khuẩn *Beijerinckia* spp. có thể phát triển tốt trong môi trường pH 3 và nhiệt độ từ $16 \div 37$ °C. Chúng không sinh bào tử, chịu được môi trường chua cao. Tuy nhiên, sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường vô đạm, có thể xuất hiện khuẩn lạc nhầy, lồi. Điều này cần được chú ý để đảm bảo chất lượng sản phẩm. Ngoài khả năng cố định nitơ chúng còn có khả năng tổng hợp các chất kích thích sinh trưởng cho cây trồng.

- *Azotobacter* spp. là loại vi khuẩn có kích thước trung bình, không sinh bào tử và có thể phát triển trong điều kiện kỵ khí. Đây là vi khuẩn Gram âm và thường được phát hiện trong đất. Khi nuôi cấy trong môi trường đặc, *Azotobacter* spp. có màu hồng hoặc nâu đen và sinh sắc tố hình quang màu vàng lục hoặc lam lục. *Azotobacter* spp. có thể phát triển tốt trong điều kiện pH từ $4,5 \div 9$, nhưng quá trình cố định nitơ chỉ được thực hiện trong khoảng pH $5,5 \div 7,2$, nhiệt độ thích hợp cho sự phát triển của chúng từ $26 \div 30$ °C. Việc phát triển của *Azotobacter* spp. phụ thuộc vào độ ẩm và hàm lượng các nguyên tố khoáng trong đất. Một số loài tuyển chọn của *Azotobacter* spp. có khả năng cố định lên đến 30 mg nitơ trên 1g dinh dưỡng cacbon [26]; [27]; [28]; [29].

1.2.2. Nhóm vi sinh vật phân giải cellulose

Cellulose hợp chất polysaccharit cao phân tử rất bền vững, cấu tạo bởi nhiều gốc glucoza, liên kết với nhau nhờ dây nối β 1,4 - glucozit, có công thức cấu tạo là $(C_6H_{10}O_5)_n$. Hệ thống enzyme phân giải cellulose do vi sinh vật cung cấp thường rất chậm và không thể phân hủy hoàn toàn cellulose trong sinh khối, điều này là do cellulose là một polymer khá phức tạp và khó bị phân hủy. Ngoài ra, một số tế bào vi sinh vật có thể không đủ enzyme phân giải hoặc không có khả năng tiếp cận cellulose trên bề mặt sinh khối dẫn đến việc quá trình phân hủy cellulose bị gián

đoạn hoặc không hoàn toàn. Trong tự nhiên một nửa hợp chất cacbon trong sinh khối trên mặt đất là cellulose, nên khi cellulose không được phân hủy hoàn toàn nó sẽ trở thành một thành phần chính trong các chất hữu cơ không tan trong nước làm kéo dài thời gian tái sinh đất, gây ảnh hưởng đến sự phát triển của cây trồng. Nhóm vi sinh vật phân giải cellulose có vai trò quan trọng trong quá trình phân hủy sinh học và tái chế chất hữu cơ trong tự nhiên, đóng vai trò quan trọng trong chu trình cacbon. Ngoài ra, chúng cũng được sử dụng trong các ứng dụng công nghiệp như sản xuất giấy và sản xuất năng lượng sinh học từ tảo biển và rơm khô [30]; [31]; [32].

Vi sinh vật phân giải cellulose bao gồm vi khuẩn, nấm và động vật, chúng sản xuất ra cellulase là một loại enzyme có khả năng phân giải cellulose thành các đơn vị đường đơn giản. Trong tự nhiên, cellulase đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân hủy sinh học và tái chế chất hữu cơ. Trong ngành công nghiệp, enzyme cellulase được sử dụng rộng rãi trong sản xuất giấy, sản xuất thức ăn gia súc, sản xuất bia rượu, sản xuất đường và sản xuất năng lượng sinh học. Cellulase được chia thành các loại khác nhau tùy thuộc vào cách chúng tác động và phân hủy cellulose. Các loại cellulase chính bao gồm endoglucanase, exoglucanase và β -glucosidase. Endoglucanase cắt đứt liên kết glycosidic trong mạch cellulose, exoglucanase cắt đứt các đầu cuối của mạch cellulose, và β -glucosidase phân giải các đơn vị đường cellulose thành đường đơn giản. Cellulase cũng được sử dụng trong các ứng dụng sinh học, như trong việc phân tích các mẫu sinh học hoặc để cải thiện chức năng tiêu hóa của động vật ăn cỏ [30]; [31]; [32].

Xạ khuẩn là một nhóm vi khuẩn đặc biệt trong quá trình phân giải cellulose, phần lớn xạ khuẩn là Gram dương, hiếu khí, hoại sinh, có cấu tạo đặc trưng bởi sự phân nhánh. Chúng có khả năng sản xuất các enzyme cellulase để phân hủy cellulose thành glucose và các đường oligosaccharide. Bên cạnh đó, xạ khuẩn còn có khả năng sản xuất các chất ức chế sinh trưởng vi khuẩn khác, giúp chúng chiếm ưu thế trong quá trình phân giải cellulose trong môi trường. Một số xạ khuẩn có khả năng phân giải cellulose là các loài thuộc chi *Streptomyces*, *Nocardia*, *Actinomyces*, *Proactinomyces*, *Thermoactinomyces*...

Có rất nhiều loài nấm có khả năng phân giải cellulose cao, điển hình là các loài *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Penicillium pinophilum*, *Sporotrium pulverlentum*. Chúng phân hủy xác của thực vật trong đất và giúp chuyển hóa một lượng hữu cơ khổng lồ trong đất. Chúng thường phân hủy cellulose khi nhiệt độ cao từ $20 \div 30$ °C, khoảng pH $3,5 \div 6,6$. Các vi khuẩn kỵ khí

ura ẩm và ura nóng thường phân hủy cellulose bằng cách sản xuất cellulase để thủy phân cellulose thành các đường đơn như glucoza, maltoza, saccaroza. Các đường này sau đó được sử dụng như nguồn cung cấp năng lượng cho quá trình trao đổi chất và phát triển của vi khuẩn. Ngoài ra, các vi khuẩn này thường cũng sản xuất các enzyme khác như hemicellulase và ligninase để phân hủy các thành phần khác trong tế bào thực vật [30]; [31]; [32]

1.2.3. Nhóm vi sinh vật phân giải photpho

Photpho (P) là một trong các nguyên tố dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển của cây trồng. Nó là thành phần chính của ATP (adenosine triphosphate) - một phân tử năng lượng cơ bản cung cấp năng lượng cho các quá trình sinh trưởng và phát triển của cây. Tuy nhiên, hiệu suất sử dụng photpho bởi cây trồng rất thấp, chỉ khoảng 25 %, nghĩa là hầu hết lượng photpho trong đất không được sử dụng. Điều này là do photpho trong đất thường tồn tại dưới dạng các hợp chất khó hấp thụ như Ca-P, Fe-P, Al-P, Mn-P... Các hợp chất này không dễ dàng bị thủy phân để tạo ra dạng photpho có thể hấp thụ bởi cây trồng. Lượng dự trữ photpho trong đất dao động từ 0,025 ÷ 0,3 % P₂O₅, tuy nhiên, chỉ có một phần nhỏ của nó có thể được sử dụng bởi cây trồng. Thành phần photpho dễ tan và khó tan trong đất được quyết định bởi nhiều yếu tố như tính chất đất, thành phần cơ giới, hàm lượng chất hữu cơ, pH đất, nhiệt độ và độ ẩm... để cải thiện hiệu quả sử dụng photpho, người ta có thể áp dụng các biện pháp như bón phân chứa photpho hòa tan (được cung cấp dưới dạng P₂O₅), sử dụng các chất hoạt động vi sinh có khả năng giải phóng photpho từ đất, sử dụng các kỹ thuật canh tác như cây trồng xen canh, chuyển đổi cây trồng... [26].

Vi sinh vật phân giải photpho - vi sinh vật chuyển hóa lân được coi là một trong những yếu tố quan trọng trong hệ sinh thái. Vi sinh vật chuyển hóa lân và khoáng hóa lân hữu cơ thường có khả năng sản xuất enzyme phosphatase, giúp phân hủy các hợp chất lân hữu cơ và vô cơ trong đất. Ngoài ra, chúng cũng có khả năng tạo ra các chất hữu cơ có chứa lân, giúp cung cấp nguồn lân dễ hấp thụ cho cây trồng. Nhờ sự phân giải của các vi sinh vật này mà photpho có thể được tái tạo và sử dụng lại trong quá trình trồng trọt. Năm 1911, J. Stoklasa đã cấy vi khuẩn *B. mycoides*, *B. subtilis*, *Proteus vulgaris* trên môi trường có axit nucleic làm nguồn P và N duy nhất và cho kết quả lượng lân được phân giải là 23,3; 37,7 và 42,0 %. Đến năm 1952, Menkina đã phân lập từ hai loại vi khuẩn *Bacillus megaterium var. phosphaticum*, *Serratia carroller* có khả năng vô cơ hóa hợp chất lân [33].

Vi sinh vật phân giải hợp chất lân thuộc nhiều nhóm, nhiều loại khác nhau, có thể chiếm khoảng 10 ÷ 15% hệ vi sinh vật đất. Vi khuẩn phân giải những hợp chất lân vô cơ khó tan thường gặp gồm các giống: *Pseudomonas* (*Ps. denitrificans*), *Alcaligenes* (*A. faecalis*), *Achromobacter* (*A. delicatulus*), *Agrobacterium* (*A. radiobacter*), *Aerobacter* (*A. aerogenes*), *Escherichia* (*E. freundii*), *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* (*F. aurantiacus*), *Chlorobacterium* (*Chl. denitrificans*), *Mycobacterium* (*M. cyaneum*), *Sarcina* (*S. flava*), *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* và một số *Pseudomonas*. Người ta đã ứng dụng chúng làm chế phẩm phân bón sinh học. Ngoài ra, khoảng 20% xạ khuẩn như *Actinomyces* sp., *Micromonospora* sp., *Streptomyces* sp. cùng với nấm như *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Sclerotium* cũng có khả năng hòa tan hợp chất lân khó tan [34]; [35].

Các điều kiện ảnh hưởng tới khả năng phân giải lân của vi sinh vật:

Độ pH: ở pH < 6,5, các ion PO_4^{3-} phản ứng với nhôm và sắt, ở pH > 7,5 các ion PO_4^{3-} phản ứng với canxi và magie để tạo thành các hợp chất ít hòa tan [35].

Nhiệt độ là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình phân giải lân. Tuy nhiên, các chủng vi sinh vật có thể có sự khác biệt trong khoảng nhiệt độ thích hợp tối ưu. Vì vậy, khi ứng dụng vi sinh vật để cải thiện chất lượng đất và năng suất cây trồng, cần phải xác định rõ chủng vi sinh vật cần sử dụng, điều kiện môi trường thích hợp cho chúng phát triển và hoạt động hiệu quả. Nhìn chung nhiệt độ tối ưu khoảng 20 ÷ 40 °C [35].

Hợp chất hữu cơ cung cấp năng lượng cho quá trình sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật, đồng thời cũng giúp tăng khả năng phân giải các chất dinh dưỡng. Các chất hữu cơ như đường, chất béo, protein, axit amin đều có thể tăng cường khả năng phân giải của vi sinh vật [35].

Độ ẩm: vi sinh vật phân giải photpho thường phát triển tốt ở độ ẩm trung bình đến cao. Tuy nhiên, độ ẩm quá cao cũng có thể ảnh hưởng đến quá trình này bởi vì nó có thể dẫn đến tình trạng ngập úng, thiếu oxy và ảnh hưởng đến hoạt động của vi sinh vật [35].

1.2.4. Nhóm vi sinh vật sinh tổng hợp Indole- 3- Acetic Acid

Indole-3-Acetic Acid (IAA) là một loại hormone thuộc nhóm auxin, giữ vai trò quan trọng trong sự phát triển của cây trồng. IAA được tổng hợp trong các mô của thực vật và có tác dụng giúp tăng trưởng các mô và tế bào. Nó cũng có khả

năng điều chỉnh các quá trình sinh học của cây, bao gồm quá trình phát triển rễ và phân nhánh giúp tăng khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng, tăng sự chịu nhiệt và kháng bệnh của cây trồng. Ngoài ra, IAA cũng có tác dụng ngăn chặn hiện tượng sinh lý của lá, giúp cây tập trung vào sự phát triển của rễ, thân và hoa. Tuy nhiên, việc sử dụng IAA cần được thực hiện cẩn thận và đúng liều lượng để tránh ảnh hưởng đến sức khỏe của cây trồng và môi trường. Có nhiều loại vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp IAA, trong số đó phải kể đến các dòng vi khuẩn thuộc chủng *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Xanthomonas*, ... bên cạnh đó thì nấm *Trichoderma* và *Aspergillus* cũng được xác định có khả năng sinh tổng hợp IAA giúp kích thích sự tăng trưởng của cây trồng. Năm 2017, Trần Bảo Trâm và cộng sự đã phân lập và tuyển chọn được 1 chủng vi khuẩn thuộc loài *Kluyvera cryorescens* cho hàm lượng sinh tổng hợp IAA cao, đạt 97,7 µg/mL. Năm 2020, Nguyễn Thị Thu Liên và cộng sự đã có những nghiên cứu về khả năng sinh chất điều hòa sinh trưởng IAA ở một số chủng vi khuẩn lam dạng sợi như: *Anabaena*, *Arthrospira*, *Dolichospermum*, *Lyngbya*, *Nostoc* và *Oscillatoria* [36]; [37].

1.3. VAI TRÒ CỦA VI SINH VẬT TRONG ĐẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC CHỨC NĂNG

1.3.1. Vai trò của nhóm chủng vi sinh vật cố định nitơ

Noble Hiltner là người đầu tiên tại Đức sản xuất phân bón vi sinh ứng dụng cơ chế cố định đạm sinh học và được đặt tên là Nitragen. Việc ứng dụng vi sinh vật cố định nitơ trong sản xuất phân bón đã được nghiên cứu và phát triển rất nhiều trong những năm qua. Các loại phân bón vi sinh vật cố định nitơ giúp tăng năng suất và chất lượng cây trồng, đồng thời còn giảm thiểu tác động xấu của việc sử dụng phân bón hóa học đến môi trường. Việc phát triển các chủng vi sinh vật có ích khác cũng là một hướng đi mới trong nghiên cứu và sản xuất phân bón vi sinh vật cố định nitơ để cải thiện hiệu quả và độ bền của sản phẩm.

Chế phẩm *Azotobacter* là một loại phân bón vi sinh học được sử dụng để cung cấp nitơ cho cây trồng. *Azotobacter* là một loại vi khuẩn cố định nitơ tự do trong không khí và chuyển hóa nitơ khí thành dạng nitơ hữu cơ, có sẵn cho cây trồng sử dụng. Vi khuẩn *Azotobacter* cũng có khả năng sản xuất các hormone thực vật như B1, gibberellin và cytokinin, giúp kích thích tăng trưởng và phát triển của cây trồng.

Tại Việt Nam, năm 1987, phân Nitragin trên nền đất mang than bùn đã được công bố hoàn thiện đánh dấu một bước phát triển lớn trong việc sản xuất phân bón vi sinh sau hơn 20 năm nghiên cứu. Từ các nghiên cứu nói trên ta có thể đưa ra kết luận rằng : vi sinh vật cố

định đạm có vai trò rất quan trọng trong việc phát triển nông nghiệp để hướng tới mục tiêu phát triển nền sinh thái nông nghiệp bền vững. Vai trò của vi sinh vật cố định nitơ trong đất giúp phân hủy các xác chất của động thực vật, chuyển hóa đạm hữu cơ thành dạng có ích cho thực vật, cung cấp nguồn dinh dưỡng cho hệ vi sinh vật đất và tạo vòng khép kín tuần hoàn nitơ trong tự nhiên [5]; [19]; [21].

1.3.2. Vai trò của nhóm vi sinh vật phân giải cellulose

Vi sinh vật có khả năng tiết ra nhiều loại enzyme ngoại bào để có thể thực hiện phân giải cellulose một cách hiệu quả nhất. Phân giải cellulose cơ bản là quá trình sinh học được thực hiện bởi các enzyme cellulaza – nó đóng vai trò quan trọng trong phản ứng thủy phân cầu nối β -1,4 giữa hai phân tử glucose cấu tạo nên cellulose. Trong tự nhiên, vi sinh vật phân giải cellulose giúp môi trường đất xử lý một lượng lớn xác động thực vật giúp cung cấp nguồn nguyên liệu chính cho quá trình tạo mùn giúp cải thiện cấu trúc của đất và giúp tăng khả năng giữ nước và chất dinh dưỡng. Ngoài ra việc phân giải cellulose giúp bổ sung nguồn cacbon dễ hấp thụ cho hệ vi sinh vật đất [5]; [30]; [33].

1.3.3. Vai trò của nhóm vi sinh vật phân giải photpho

Nhóm vi sinh vật phân giải photpho có vai trò rất quan trọng trong việc cung cấp photpho cho cây trồng. Chúng có khả năng chuyển hóa hợp chất photpho khó tan thành dạng dễ tiêu cho cây trồng sử dụng. Vi sinh vật tiết ra enzyme phân giải photpho, các hợp chất photpho khó tan trong đất sẽ bị phân giải thành các dạng đơn giản hơn như PO_4^{3-} giúp cây trồng dễ dàng hấp thụ và sử dụng. Ngoài ra, vi sinh vật phân giải photpho còn giúp giảm thiểu tác động của phân bón trên môi trường. Khi sử dụng phân bón có chứa photpho, một phần photpho sẽ không được cây trồng hấp thụ và sẽ tồn tại trong đất, lượng photpho quá lớn có thể gây ô nhiễm môi trường và ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của cây trồng. Vi sinh vật phân giải photpho có khả năng hấp thụ các hợp chất photpho dư thừa trong đất, giúp giảm thiểu tác động của phân bón lên môi trường. Vi sinh vật phân giải photpho đóng vai trò trong việc duy trì độ bền của đất và cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng một cách hiệu quả hơn [25], [33].

1.3.4. Vai trò của nhóm vi sinh vật sinh tổng hợp Indole- 3- Acetic Acid

Nhóm vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp IAA như chất chuyển hóa thứ cấp giúp tham gia vào quá trình hấp thu dinh dưỡng cho cây, có vai trò quan trọng đối với sự sinh trưởng và năng suất của cây trồng. Nhóm vi sinh vật sinh tổng hợp Indole-3-Acetic Acid (IAA) có vai trò quan trọng trong tăng trưởng và phát triển của cây trồng. IAA là một loại hormone thực vật tự nhiên, được sản xuất bởi vi sinh vật và tác động đến quá trình sinh trưởng của cây. Các vi sinh vật này có khả năng sản xuất IAA - một chất điều hòa sinh học, giúp kích thích quá trình tăng trưởng của cây trồng bằng cách thay đổi các điều kiện nhất định như tính thấm lọc, tăng tính thấm nước, giảm áp lực thành tế bào và tăng tổng hợp thành tế bào. Ngoài ra, IAA còn có thể ngăn chặn và trì hoãn hiện tượng sinh lý của lá, thúc đẩy sự ra hoa, tạo quả. Do đó, sử dụng các chủng vi sinh vật sinh tổng hợp IAA có thể giúp tăng hiệu quả sản xuất cây trồng và cải thiện chất lượng sản phẩm, đồng thời giảm thiểu sử dụng phân bón hóa học và thuốc trừ sâu [24].

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Các mẫu nghiên cứu

Tổng số và vị trí các mẫu đất thu được như sau:

❖ *Mẫu thu thập năm 2021: với 29 mẫu*

1/ Mẫu đất được thu ở góc cây lan thuộc huyện Lao Bảo (Quảng Trị - QT):

- Tuyến khảo sát: gồm 03 mẫu đất cây 1, cây 2 và cây 3 được ký hiệu sau: QT01 (thu tại gốc cây 1), QT02 (thu tại gốc cây 2), QT03 (thu tại gốc cây 3).

2/ Mẫu đất được thu ở góc cây lan thuộc Khu Bảo tồn loài và sinh cảnh Voi, Nông Sơn (Quảng Nam - QN):

- Tuyến khảo sát: Tuyến bờ kết, gồm 08 mẫu đất được ký hiệu mẫu sau: Bờ kết - bk (QNBk từ 01 ÷ 08) thu tại gốc cây ở 563 m.

- Tuyến khảo sát: Khe nước vàng, gồm 08 mẫu đất được ký hiệu mẫu sau: Nước vàng - nv (QNnv từ 01 ÷ 08) thu tại gốc cây ở 172 m.

- Tuyến khảo sát: Tuyến Bàn cờ, gồm 02 mẫu đất được ký hiệu mẫu sau: Bàn cờ - bc (QNbc từ 01 ÷ 02) quần thể chỉ mọc trên 1 khối đá lớn ở 330 m.

- Tuyến khảo sát: Tuyến Bàn cờ, gồm 02 mẫu đất được ký hiệu mẫu sau: Bàn cờ - bc (QNbc từ 03 ÷ 04) quần thể chỉ mọc trên 1 khối đá lớn ở 307 m.

3/ Mẫu đất được thu ở góc cây lan thuộc Khu Rừng đặc dụng Bà Nà-Núi Chúa, Đà Nẵng - ĐN:

- Tuyến khảo sát: Bà Nà km 16, gồm 01 mẫu đất được ký hiệu mẫu sau: Bà Nà - bn (ĐNbn01) thu tại gốc cây ở 1.030 m.

- Tuyến khảo sát: gồm 05 mẫu đất được ký hiệu mẫu sau: Bà Nà - bn (ĐNbn từ 03-07) thu tại gốc cây ở 1.075 m.

❖ *Mẫu thu thập năm 2022: với 24 mẫu*

Điểm 1: cây 1 lô 77, khoảnh 6, tiểu khu 1424 xã Khuê Ngọc Điền, huyện Krông Bông, Đắk Lắk; ở 792 m thu 01 mẫu và ở 768 m thu 01 mẫu, cộng là 02 mẫu được ký hiệu ĐLkb từ 01 ÷ 02.

Điểm 2: xã Yang Tao, huyện Lắk, Đắk Lắk; ở 818 m, thu 10 mẫu được ký hiệu ĐLyt từ 01 ÷ 10.

Điểm 3: khoảnh 5 xã Krông Nô, huyện Lắk, Đắk Lắk; ở 886 m thu 04 mẫu được ký hiệu ĐLkn từ 01 ÷ 04.

Điểm 4: xã Krông Nô, huyện Lắk, Đắk Lắk; ở 696 m thu 08 mẫu được ký hiệu ĐLknR từ 01 ÷ 08.

Các mẫu để xác định vi sinh vật được bảo quản tại Phòng Công nghệ vật liệu sinh học, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; Phòng Quan Trắc và Phân tích môi trường lao động, Trạm Quan Trắc và Phân tích môi trường lao động – Viện Khoa học An toàn và Vệ sinh Lao động.

2.1.2. Hóa chất, thiết bị chính dùng trong nghiên cứu

2.1.2.1. Hóa chất chính

STT	Tên hóa chất
1	Cao nấm men
2	Cao thịt
3	Mannitol
4	K_2HPO_4
5	KH_2PO_4
6	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
7	Cycloheximide
8	DL-malic acid
9	KOH
10	$(NH_4)_2SO_4$
11	Glucose
12	$(NH_4)_2MoO_4$
13	$MnSO_4$
14	H_3BO_3
15	$AlCl_3$
16	$Ca_3(PO_4)_2$
17	$(NH_4)_2MoO_4$
18	$FeSO_4$
19	$ZnSO_4$
20	Na_2MoO_4
21	Agar
22	Bộ Kit chuẩn hóa sinh 50 API CHB

23	Bộ kit TOPO TA Cloning ^d
24	Master mix của hãng ThermoFisher, DNA chủng và cặp mồi 27F/1492R với trình tự như sau: 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'.

2.1.2.2. Thiết bị chính

STT	Tên thiết bị	Hãng sản xuất
1	Kính hiển vi quang học Olympus CH2	Model CHS, Nhật Bản
2	Máy đo pH	Mettler Toledo, Thụy Sĩ
3	Cân điện tử AB 204	Mettler Toledo, Thụy Sĩ
4	Tủ âm	Trung Quốc
5	Digital Micropipette Model 5.000 DG	Nichipet, Nhật Bản
6	Lò vi sóng	Samsung, Hàn Quốc
7	Máy Vortex	Rotolab OSI, Pháp
8	Bể ổn nhiệt	Teche, OSI
9	Pipetman các loại	Gilson, Pháp
10	Máy lắc ổn nhiệt	Hàn Quốc
11	Nồi khử trùng ước	Trung Quốc
12	Tủ sấy khô	Sellab, Mỹ
13	Tủ lạnh	Sharp, Nhật
14	Máy đo quang phổ	Labomec, Đức
15	Ống đong các thể tích	Isolab, Đức

2.1.3. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật

1/ Môi trường MPA (g/l): Cao thịt 5; pepton 10; NaCl 5; thạch 20; nước 1000 ml; pH 7,0.

2/ Môi trường Gause 1 (g/l): Tinh bột tan 20; K₂HPO₄ 0,5; MgSO₄ 0,5; KNO₃ 0,5; NaCl 0,5; FeSO₄ 0,01; thạch 20; nước 1000 ml; pH 7,2 ÷ 7,4.

3/ Môi trường Czapeck (g/l): Saccharose 30; NaNO₃ 2; K₂HPO₄ 1; MgSO₄ 0,5; KCl 0,5; FeNO₃ 0,01; thạch 20; nước 1000 ml; pH 7,0.

4/ Môi trường xác định hoạt lực enzym

- MPA-CMC (g/l): cao thịt 3; pepton 5; NaCl 5; CMC 1%; agar 20; nước cất 1.000 ml.

- Gauze1-CMC (g/l): tinh bột tan 10; K_2HPO_4 0,5; $MgSO_4$ 0,5; KNO_3 1; $NaCl$ 0,5; $FeSO_4$ 0,01; CMC 1; agar 20; nước cất 1.000 ml; pH 7,0.

- Czapeck - CMC (g/l): Saccharose 30; $NaNO_3$ 2; K_2HPO_4 1; $MgSO_4$ 0,5; KCl 0,5; $FeNO_3$ 0,01; CMC 1; agar 20; nước cất 1.000 ml; pH 7,0.

5/ Môi trường Ashby không đậm (g/l): Mannitol 10; $CaCO_3$ 5; K_2HPO_4 0,5; $MgSO_4.7H_2O$ 0,2; $NaCl$ 0,2; $FeCl_3$ vi lượng; $MnSO_4.4H_2O$ vi lượng; agar 15; Nước cất 1.000 ml. pH 6,8.

6/ Môi trường Rojo Công gô theo Rodriger (1982) có thành phần (g/l): K_2HPO_4 0,5; $Mg SO_4.7H_2O$ 0,2; $NaCl$ 0,1; Yeast extract 0,5; $FeCl_3$ 0,015; DL-malic acid 5; KOH 4,8; agar 20; Nước cất 1.000 ml. Bổ sung 10 ml đỏ Công gô dung dịch stock (250 mg đỏ Công gô trong 100 ml nước), pH 6,8.

7/ Môi trường Gerresen có thành phần (g/l): $(NH_4)_2SO_4$ 0,5; $NaCl$ 0,2; Glucose 10; $Ca_3(PO_4)_2$ 5; agar 20; dung dịch vi lượng 1 ml, nước cất 1.000 ml. pH 6,8.

Dung dịch vi lượng có thành phần (g): $(NH_4)_2MoO_4$ 0,5; $MnSO_4$ 0,5; H_3BO_3 0,5; $CuSO_4$ 0,1; $FeSO_4$ 0,1; $ZnSO_4$ 0,02; $CaCl_2$ 0,2; $AlCl_3$ 0,02; Nước cất 0,2 lít.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp lấy mẫu

Phương pháp lấy mẫu được thực hiện theo tiêu chuẩn TCVN 7538 – 2: 2005: Chất lượng đất – Lấy mẫu – Phần 2: Hướng dẫn kỹ thuật lấy mẫu. Lấy mẫu đất bằng khoan, xẻng, đảm bảo đúng độ sâu, đủ khối lượng đất đồng đều ở toàn độ sâu lấy mẫu [38].

2.2.2. Phương pháp đánh giá các mẫu đất thu thập

Hướng dẫn mô tả đất: Chất lượng đất- Phương pháp đơn giản để mô tả đất (TCVN 6857: 2001, ISO 11259:1998): Xác định loại thành phần cơ giới của đất trong điều kiện ẩm tự nhiên theo cách kiểm tra bằng vè tay ngay tại thực địa [39].

2.2.3. Phương pháp xác định các nhóm vi sinh trong các mẫu đất thu thập

Xác định mật độ vi sinh vật: Xác định mật độ VSV theo TCVN 4884-1:2015, ISO 4833-1: 2013 và TCVN 6507-1:2019, ISO 6887-1:2017 [40]; [41].

Xác định thành phần và số lượng vi sinh vật trong đất: Xác định số lượng vi sinh vật trong đất theo theo TCVN 4884-1:2015, ISO 4833-1: 2013 và TCVN 6507-1:2019, ISO 6887-1:2017. Số lượng các nhóm vi sinh vật được xác định trên môi trường nuôi cấy đặc trưng: MPA, Gause 1, Czapek [40]; [41].

Xác định hoạt tính kháng sinh: Các phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn theo phương pháp thời thạch, phương pháp đục lỗ thạch và phương pháp khoan giấy lọc [41]; [42].

Xác định đặc điểm sinh học và phân loại vi khuẩn: Mô tả các đặc điểm hình thái của các chủng, xác định đặc điểm sinh học và định danh theo Sổ tay định loại vi sinh vật của Bergey's 1994.

- *Mô tả đặc điểm hình thái*: Quan sát hình thái khuẩn lạc bằng cách cấy ria vi khuẩn lên thạch đĩa; Quan sát hình thái tế bào vi khuẩn dưới kính hiển vi quang học và kính hiển vi điện tử quét; nhuộm Gram (Hucher & Corn); nhuộm bào tử (Schaeffer & Fulton) và đo kích thước tế bào trên kính hiển vi điện tử.

- *Xác định đặc điểm sinh hoá*: Thử khả năng sử dụng oxy, hoạt tính catalase, khả năng di động và khả năng lên men [41]; [42]; [43].

- *Phân loại vi khuẩn theo kit chuẩn API*: Kit API 50CHB là kit dùng để xác định trực khuẩn Gram (+) thuộc chi *Bacillus*. Xử lý kết quả bằng phần mềm API (Phân loại được xác định xuất sắc %ID \geq 99,9; Xác định rất tốt %ID \geq 99,0; Xác định tốt % ID \geq 90,0; Xác định chấp nhận được %ID \geq 80,0; Không xác định %ID < 80,0). Sơ bộ định tên VK dựa vào kết quả phân tích của phân mềm APILAB PLUS 3.3.3 cho kit API 50 CHB kết hợp với hệ thống phân loại vi khuẩn của Bergey's, 1994 [42].

Xác định đặc điểm sinh học và phân loại của xạ khuẩn: Xác định các đặc điểm nuôi cấy, hình thái và đặc điểm sinh lý- sinh hoá của xạ khuẩn theo ISP (Shirling EB & D Gottlieb, 1966).

Phân loại vi khuẩn và xạ khuẩn dựa trên trình tự gene 16S rRNA: Quy trình tách chiết DNA tổng số của vi khuẩn được tách tiến hành theo Masterson & cs. (Sambrook & Russell, 2001).

2.2.4. Phương pháp xác định vi sinh vật có khả năng cố định nitơ, phân giải cellulose, phân giải photpho và sinh tổng hợp Indole- 3- Acetic Acid trong các mẫu đất thu thập

Phương pháp xác định nhóm vi sinh vật phân giải cellulose, phân giải photphat, cố định nitơ tự do và sinh tổng hợp Indole- 3- Acetic Acid.

- Phương pháp xác định nhóm vi sinh vật phân giải cellulose theo TCVN 6168:2002: Các môi trường MPA, Gause 1, Czapek bổ sung CMC 1 % được khử trùng ở 1atm trong 30 phút, đổ đĩa Petri, nuôi cấy vi sinh vật và nuôi ở 37 °C, sau khi vi sinh vật phát triển mạnh thì thử bằng thuốc thử Lugol, xác định vòng phân giải cellulase [45].

- Phương pháp xác định nhóm vi sinh vật phân giải photphat theo TCVN 6167:1996: Vi khuẩn phân giải lân được phân lập và tuyển chọn trên môi trường Gerresen: Khuẩn lạc *Bacillus* có khuẩn lạc tròn đều, hơi lượn sóng, nhẵn, thường có các vòng tròn đồng tâm trên bề mặt, có màu trắng sữa và chuyển sang màu kem, có khi màu nâu nhạt có ánh mờ, đục. Vi khuẩn phân giải lân sẽ tạo vòng phân giải $Ca_3(PO_4)$ khó tan trong suốt bao quanh khuẩn lạc [46].

- Phương pháp xác định nhóm vi sinh vật cố định nitơ tự do theo TCVN 6166:2002: Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật cố định nitơ: Các chủng vi khuẩn *Azotobacter* cố định nitơ được phân lập và tuyển chọn trên môi trường Ashby không đạm: Khuẩn lạc dạng nhầy, đàn hồi, lồi, có khi nhẵn nheo và khi già, khuẩn lạc có màu vàng lục, màu hồng hoặc màu nâu đen và các chủng *Azospirillum* trên môi trường Rojo Công gô: Khuẩn lạc của *Azospirillum* màu đỏ tía sau 4 ngày nuôi cấy ở 37 °C [47].

- Phương pháp xác định nhóm vi sinh vật sinh tổng hợp IAA theo TCVN 10784: 2015: Vi sinh vật – Xác định khả năng sinh tổng hợp Axit 3 – Indol – Acetic (IAA): Vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp IAA là vi sinh vật tạo được vòng màu đỏ bao quanh khuẩn lạc/ cụm khuẩn lạc [48]

- Các thí nghiệm đều được lặp lại 03 lần, kết quả được tính trung bình.

2.2.5. Phương pháp định danh chủng vi sinh vật

2.2.5.1. Phân loại theo đặc điểm sinh học

Quan sát hình thái tế bào của chủng: Đặc điểm hình thái của tế bào được quan sát dưới kính hiển vi điện tử và được chụp tại Khoa Hình thái, Viện 69 thuộc Bộ Tư lệnh bảo vệ Lăng Chủ tịch Hồ Chí Minh.

Phương pháp nhuộm Gram vi khuẩn: Chủng nghiên cứu được nhuộm Gram theo trình tự như sau: Dùng que cấy lấy sinh khối chủng được nuôi cấy qua đêm và dàn đều trên lam kính có chứa một giọt nước cất đã khử trùng sao cho tạo thành một lớp mỏng. Sau khi mẫu đã khô, hơ nhanh trên ngọn lửa đèn cồn để cố định mẫu (1 ÷ 3 giây). Nhỏ dung dịch tím kết tinh trong khoảng thời gian 1 phút. Rửa nhẹ mẫu bằng nước cất và để khô rồi tiếp tục nhỏ Lugol và giữ trong khoảng 1 phút. Sau bước này, mẫu nhuộm được rửa nhanh bằng cồn 95 % trong 6 giây. Mẫu tiếp tục được nhuộm với safranin trong 30 giây (nhuộm bằng fucsin) và rửa nhẹ rồi để khô. Sau khi nhuộm mẫu được quan sát bằng kính hiển vi quang học dưới vật kính dầu có độ phóng đại 100 lần. Nếu tế bào Gram dương sẽ bắt màu tím đậm còn nếu tế bào là Gram âm sẽ bắt màu hồng hoặc màu đỏ.

Xác định khả năng sinh bào tử: cấy vi khuẩn trên môi trường thạch thường. Sau 3 ngày tiến hành xử lý nhiệt ở 80 °C. Dùng vi khuẩn đã xử lý nhiệt cấy lại trên ống thạch nuôi ở 30 °C. Sau 24 giờ nếu xuất hiện khuẩn lạc thì kết luận chủng vi khuẩn có khả năng sinh bào tử [40]; [41].

2.2.5.2. Phân loại vi khuẩn theo kit chuẩn API 50 CHB

Chủng vi khuẩn cấy sau 24 giờ trên thạch nghiêng, lấy 2 ÷ 3 vòng que cấy hoà tan vào nước muối sinh lý, dùng pipet vô trùng hút 2 ml từ nước muối sinh lý đã có vi sinh vật vào môi trường API 50 CHB, lắc đều. Dùng pipet hút dịch từ môi trường API 50 CHB cho vào các chíp (vạch 1), tiếp theo nhỏ parafin khoảng 5 ÷ 6 giọt cho đầy. Nuôi 37°C, sau 24 giờ và 48 giờ ghi kết quả. Trong suốt quá trình nuôi cấy, các đường lên men tạo thành axit làm giảm pH, được nhận biết bằng sự đổi màu chất chỉ thị.

2.2.5.3. Phân loại theo sinh học phân tử dựa trên trình tự gene 16S rRNA

a) Tách chiết ADN tổng số

Qui trình tách chiết ADN tổng số được tiến hành theo Masterson & cộng sự

- Nuôi xạ khuẩn trong 10 ml môi trường dịch thể (cao thịt 2 gram/l, caomen 2 g/l, pepton 5 gram/lit, NaCl 8 gram/lit, pH 7) tới gần pha log.
- (2) Ly tâm lạnh 1,5 ml huyền phù ở 8.000 vòng/ 5 phút để thu sinh khối.
- (3) cặn sinh khối được nghiền với nitơ lỏng
- (4) Bổ sung 50 µl lyzozym, vortex, ủ ở 37 °C/ 30 phút.
- (5) Bổ sung 30 µl proteaza K, vortex, ủ ở 56 °C/ 1 giờ.
- (6) Chiết bằng 650 µl hỗn hợp phenol : chloroform : izoamylalcohol (25 : 24 : 1), vortex.
- (7) Ly tâm 12.000 vòng/ 10 phút thu dịch nổi.
- (8) Tủa bằng 40 µl acetat Na 3 M, pH 5,2 + 1 ml cồn tuyệt đối.
- (9) Để lạnh ở -20 °C ít nhất 4 giờ
- (10) Ly tâm 14.000 vòng/ 20 phút, thu cặn.
- (11) Rửa bằng 500 µl cồn 70 °C, ly tâm 12.000 vòng/10 phút, thu cặn.
- (12) Làm khô trong box vô trùng.
- (13) Hoà tan cặn trong 40 ÷ 60 µl đệm TE - RNAaza, ủ ở 37 °C/ 1 giờ.
- (14) Kiểm tra độ tinh sạch của ADN bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 260 nm và 280 nm. $C_{ADN}(\text{protein}) = A_{260} / A_{280} \times 50 \times \text{độ pha loãng mẫu}$. Tỷ lệ ADN/protein > 1,8 là mẫu sạch protein.
- (15) Điện di kiểm tra trên gel agarosa 0.8 %, điện thế 100V. Nhuộm bản gel trong dung dịch ethidium bromide 1 % /10 phút.

Nhân bản đoạn ADN thuộc gene 16S rARN bằng PCR

Thu nhận đoạn gene 16S rARN bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi

27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',

1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

Phản ứng PCR cho sản phẩm là đoạn gene dài khoảng 1500 kb.

PCR được tiến hành với tổng thể tích 25 µl/ mẫu: ADN tổng số (1 µl), 16F (1 µl), 16R (1 µl), dNTPs 10 mM (1 µl), Taq polymeraza (0,25 µl), đệm Taq polymeraza 10 X, nước khử ion.

Chu trình nhiệt: (1) 95 °C - 3 phút, (2) 95 °C - 30 giây, (3) 55 °C - 15 giây, (4) 72 °C - 1 phút . Lặp lại 30 lần từ bước 2 ÷ 4; 72 °C - 7 phút. Giữ ở 4 °C.

b) Thu nhận ADN gene 16S rRNA

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 0,8%, phân đoạn ADN có độ dài ~ 1500 bp được thu nhận, tiến hành thổi gel và tinh sạch sản phẩm bằng kit QiaQuick PCR Purification (Qiagen, Hilden, Đức).

(1) Thêm 3 lần thể tích của dung dịch đệm ADB (Agarose Dissolving Buffer) vào mỗi thể tích gel. Ủ trong bể ổn nhiệt 55°C trong 5 ÷ 10 phút, đến khi tan hết gel.

(2) Chuyển dung dịch gel đã hoà tan vào cột Zymo-Spin, sau đó ly tâm 12.000 vòng/ phút trong 5 ÷ 10 giây.

(3) Thêm 200µl dung dịch đệm rửa (Wash Buffer) vào cột, ly tâm 12.000 vòng/ phút trong 5 ÷ 10 giây, lặp lại bước này hai lần.

(4) Thêm trực tiếp 8 µl nước khử ion vào màng của cột, đặt cột vào trong ống 1,5 ml và ly tâm 12.000 vòng/ phút trong 1 phút. Thu sản phẩm ADN tinh sạch.

c. Xác định trình tự gene 16S rRNA

(1) Trình tự ADN được xác định bằng kit Dye-deoxy Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Weiterstadt, Đức), sản phẩm được phân tích trên máy đọc trình tự tự động ABI 377 (Perkin-Elmer, Mỹ).

(2) Chuỗi nucleotit được xử lý bằng chương trình Bioedit;.

(3) Truy cập dữ liệu ngân hàng gene EMBL để so sánh bằng chương trình GENDOC 2.5 (Nicholas, 1999).

(4) Sử dụng chương trình phân tích phả hệ và tiến hóa MEGA 2.1 để xác định mối quan hệ di truyền giữa các chủng được phân tích.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN







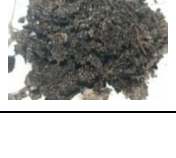
3.1. ĐÁNH GIÁ CÁC MẪU ĐẤT THU ĐƯỢC KHU VỰC CÓ QUẦN THỂ LAN


3.1.1. Thông tin mẫu đất thu năm 2021 khu vực có quần thể Lan

Địa điểm lấy 29 mẫu đất được thu năm 2021 ở 3 địa điểm sau:

Kết quả đánh giá mẫu thu năm 2021 trình bày bảng 3.1 và mẫu thu năm 2022 trình bày ở bảng 3.2.

Bảng 3.1. Kết quả thu mẫu đất năm 2021 tại khu vực có quần thể Lan

STT	Tọa độ quần thể khu vực thu mẫu	Tuyến khảo sát	Ký hiệu mẫu	Đặc điểm mẫu	Mẫu
<i>Hương Hóa, Quảng Trị</i>					
1	16°48'7"N-106°35'55"E	Cây 1	QT01	Khô xốp, sẫm màu	
2	16°48'7"N-106°35'54"E	Cây 2	QT02	Khô xốp, sẫm màu, có mùn cây	
3	16°48'7"N-106°35'55"E	Cây 3	QT03	Khô xốp, sẫm màu	
<i>Khu Bảo tồn loài và sinh cảnh Voi, Nông Sơn, Quảng Nam</i>					
4	15°39'19"N-107°57'57"E	Tuyến Bò kết	QNbk01	Ấm xốp, sẫm màu, có rễ cây	
5	15°39'19"N-107°57'57"E	Tuyến Bò kết	QNbk02	Ấm xốp, sẫm màu, có rễ cây	
6	15°39'19"N-107°57'57"E	Tuyến Bò kết	QNbk03	Ấm xốp, sẫm màu, có nhiều rễ cây	
7	15°39'19"N-107°57'57"E	Tuyến Bò kết	QNbk04	Ấm xốp, sẫm màu, có rễ cây	

8	15°39'19"N- 107°57'57"E	Tuyến Bồ kết	QNbk05	Âm xốp, sẫm màu, có nhiều rễ cây	
9	15°39'19"N- 107°57'57"E	Tuyến Bồ kết	QNbk06	Âm xốp, sẫm màu, có rễ cây	
10	15°39'19"N- 107°57'57"E	Tuyến Bồ kết	QNbk07	Âm xốp, sẫm màu, có rễ cây, lẫn cát	
11	15°39'19"N- 107°57'57"E	Tuyến Bồ kết	QNbk08	Âm xốp, sẫm màu, có rễ cây, lẫn cát	
12	15°40'30"N- 107°56'7"E	Khe nước vàng	QNnv01	Âm, nhiều sỏi, ít đất, lẫn nhiều lá và rễ cây	
13	15°40'30"N- 107°56'7"E	Khe nước vàng	QNnv02	Âm, nhiều sỏi, ít đất, lẫn nhiều lá và rễ cây	
14	15°40'30"N- 107°56'7"E	Khe nước vàng	QNnv03	Âm, nhiều sỏi, ít đất, lẫn nhiều lá và rễ cây	
15	15°40'30"N- 107°56'7"E	Khe nước vàng	QNnv04	Âm, nhiều sỏi, ít đất, lẫn nhiều rễ cây	
16	15°40'30"N- 107°56'7"E	Khe nước vàng	QNnv05	Âm, nhiều sỏi, ít đất, lẫn nhiều rễ cây	
17	15°40'30"N- 107°56'7"E	Khe nước vàng	QNnv06	Âm, nhiều sỏi, ít đất, lẫn nhiều rễ cây	
18	15°40'30"N- 107°56'7"E	Khe nước vàng	QNnv07	Âm, nhiều sỏi, ít đất, lẫn nhiều rễ cây	

19	15°40'30"N- 107°56'7"E	Khe nước vàng	QNnv08	Âm, nhiều sỏi, ít đất, lẫn nhiều rễ cây	
20	15°42'26"N- 107°56'51"E	Tuyến Bàn cờ	QNbc01	Sẫm, lẫn ít sỏi	
21	15°42'26"N- 107°56'51"E	Tuyến Bàn cờ	QNbc02	Mẫu đất đen, vón cục	
22	15°42'31"N- 107°56'51"E	Tuyến Bàn cờ	QNbc03	Sẫm, lẫn cỏ cây	
23	15°42'31"N- 107°56'51"E	Tuyến Bàn cờ	QNbc04	Sẫm, ít đất, nhiều rễ mùn cây	
<i>Khu Rừng đặc dụng Bà Nà - Núi Chúa, Đà Nẵng</i>					
24	16°0'14"N- 107°59'41"E	Bà Nà - km 16	ĐNbn01	Nâu vàng, lẫn rễ cây	
25	16°0'12"N- 107°59'37"E	Bà Nà - km 16	ĐNbn03	Sẫm vón cục, lẫn rễ cây	
26	16°0'12"N- 107°59'37"E	Bà Nà - km 16	ĐNbn04	Nâu vàng, lẫn rễ cây	
27	16°0'12"N- 107°59'37"E	Bà Nà - km 16	ĐNbn05	Sẫm, lẫn rễ cây	
28	16°0'12"N- 107°59'37"E	Bà Nà - km 16	ĐNbn06	Sẫm đen, đất nhỏ, lẫn rễ cây	
29	16°0'12"N- 107°59'37"E	Bà Nà - km 16	ĐNbn07	Xám, đất nhỏ, khô	

Từ bảng 3.1. cho thấy 29 mẫu đất:

+ Quảng Trị thu 03 mẫu: QT01-QT03 đất khô xốp, sẫm màu, mẫu QT 02 có thêm mùn cây lẫn trong đất.





+ Quảng Nam thu 20 mẫu: 08 mẫu QNbk01-QNbk08 đất ẩm xốp, sẫm màu, có lẫn rễ cây chiếm tỉ lệ 40%; 08 mẫu QNnv01-QNnv08 đất ẩm, nhiều sỏi, ít đất, lẫn nhiều lá và rễ cây chiếm tỉ lệ 40%, 04 mẫu QNbc01-QNbc04 đất sẫm, vón cục nhiều rễ mùn cây chiếm tỉ lệ 20 % trong tổng số 20 mẫu thu được.





+ Đà Nẵng thu 06 mẫu: mẫu ĐNbn01; ĐNbn04 đất nâu vàng, lẫn rễ cây và 04 mẫu ĐNbn03; ĐNbn05; ĐNbn06 đất sẫm vón cục, lẫn rễ cây; mẫu ĐNbn07 đất nhỏ, xám, khô. 6 mẫu đất thu được tại Khu Rừng đặc dụng Bà Nà - Núi Chúa, Đà Nẵng có sự khác biệt giữa các mẫu về màu sắc, tính chất của đất.









3.1.2. Thông tin mẫu đất thu năm 2022 khu vực có quần thể Lan




Địa điểm lấy 24 mẫu đất được thu năm 2022 ở 4 địa điểm sau:

Bảng 3.2. Kết quả thu mẫu đất năm 2022 tại khu vực có quần thể Lan

STT	Tọa độ quần thể khu vực thu mẫu	Ký hiệu mẫu	Đặc điểm mẫu	Mẫu
<i>Tiểu khu 1424 xã Khuê Ngọc Điền, huyện Krông Bông, Đắk Lắk</i>				
1	12°28'02.8"N- 108°20'28.6"E	ĐLkb01	Âm, không sỏi, đất mịn, ít rễ cây	
2	12°28'02.8"N- 108°20'28.6"E	ĐLkb02	Âm, không sỏi, đất mịn, ít rễ cây	
<i>Xã Yang Tao, huyện Lắk, Đắk Lắk</i>				
3	12°26'22.3"N- 108°20'32.9"E	ĐLyt01	Âm, không sỏi, đất mịn	
4	12°26'22.3"N- 108°20'32.9"E	ĐLyt02	Âm, không sỏi, đất mịn, ít rễ cây	

5	12 ^o 26'22.3"N- 108 ^o 20'32.9"E	ĐLyt03	Âm, không sỏi, đất mịn	
6	12 ^o 26'22.3"N- 108 ^o 20'32.9"E	ĐLyt04	Âm, không sỏi, đất mịn	
7	12 ^o 26'22.3"N- 108 ^o 20'32.9"E	ĐLyt05	Âm, không sỏi, đất mịn, có rễ cây	
8	12 ^o 26'22.3"N- 108 ^o 20'32.9"E	ĐLyt06	Âm, không sỏi, đất mịn, có rễ cây	
9	12 ^o 26'22.3"N- 108 ^o 20'32.9"E	ĐLyt07	Âm, không sỏi, đất mịn	
10	12 ^o 26'22.3"N- 108 ^o 20'32.9"E	ĐLyt08	Âm, không sỏi, đất mịn, có rễ cây	
11	12 ^o 26'22.3"N- 108 ^o 20'32.9"E	ĐLyt09	Âm, không sỏi, đất mịn, ít rễ cây	
12	12 ^o 26'22.3"N- 108 ^o 20'32.9"E	ĐLyt10	Âm, không sỏi, đất mịn, nhiều rễ cây	
<i>Khoảnh 5 xã Krông Nô, huyện Lắk, Đắk Lắk</i>				
13	12 ^o 14'07.0"N- 108 ^o 13'15.9"E	ĐLkn01	Âm, có ít sỏi, ít rễ cây	

14	12 ^o 14'07.0"N- 108 ^o 13'15.9"E	ĐLkn02	Âm, không sỏi, ít rễ cây	
15	12 ^o 14'07.0"N- 108 ^o 13'15.9"E	ĐLkn03	Âm, không sỏi, ít rễ cây	
16	12 ^o 14'07.0"N- 108 ^o 13'15.9"E	ĐLkn04	Âm tươi, không sỏi, ít rễ cây	
<i>Xã Krông Nô, huyện Lắk, Đắk Lắk</i>				
17	12 ^o 14'07.0"N- 108 ^o 13'15.9"E	ĐLknR01	Âm tươi, lẫn nhiều sỏi, ít rễ cây	
18	12 ^o 14'07.0"N- 108 ^o 13'15.9"E	ĐLknR02	Âm vón cục, lẫn nhiều sỏi	
19	12 ^o 14'07.0"N- 108 ^o 13'15.9"E	ĐLknR03	Âm, lẫn nhiều sỏi, ít rễ cây	
20	12 ^o 14'07.0"N- 108 ^o 13'15.9"E	ĐLknR04	Âm, lẫn nhiều sỏi, ít rễ cây	
21	12 ^o 14'07.0"N- 108 ^o 13'15.9"E	ĐLknR05	Âm, lẫn nhiều sỏi, ít rễ cây	

22	12 ^o 14'07.0"N- 108 ^o 13'15.9"E	ĐLknR06	Âm vón, lẫn ít sỏi, ít rễ cây	
23	12 ^o 14'07.0"N- 108 ^o 13'15.9"E	ĐLknR07	Âm, lẫn nhiều sỏi, ít rễ cây	
24	12 ^o 14'07.0"N- 108 ^o 13'15.9"E	ĐLknR08	Âm cục, lẫn ít sỏi, ít rễ cây	

Từ bảng 3.2. cho thấy 24 mẫu đất tại các điểm:

Điểm 1: cây 1 lô 77, khoảnh 6, tiểu khu 1424 xã Khuê Ngọc Điền, huyện Krông Bông, Đắk Lắk: thu 01 mẫu ẩm, 02 mẫu được ký hiệu ĐLkb01-ĐLkb02, các mẫu không sỏi, đất mịn, ít rễ cây.

Điểm 2: xã Yang Tao, huyện Lắk, Đắk Lắk: thu 10 mẫu được ký hiệu ĐLyt10-ĐLyt10, cơ bản các mẫu ẩm, không sỏi, đất mịn. Trong đó có 6/10 mẫu chiếm tỉ lệ 60 % trong tổng số mẫu đất có lẫn rễ cây.

Điểm 3: khoảnh 5 xã Krông Nô, huyện Lắk, Đắk Lắk: thu 04 mẫu được ký hiệu ĐLkn01-ĐLkn04, có đặc tính tương tự nhau, các mẫu ẩm, không sỏi hoặc ít sỏi, ít rễ cây.

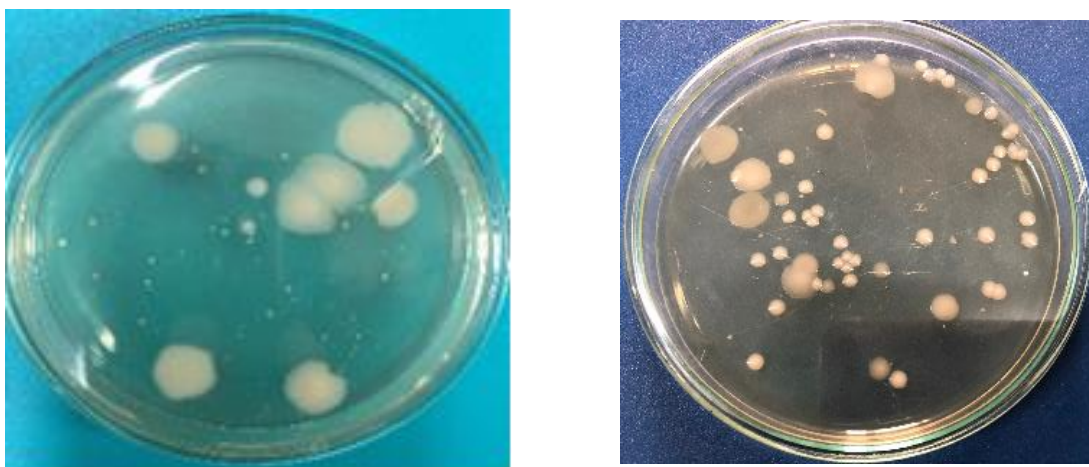
Điểm 4: xã Krông Nô, huyện Lắk, Đắk Lắk: thu 08 mẫu được ký hiệu ĐLknR01- ĐLknR08, các mẫu ẩm toi hoặc vón cục, lẫn nhiều sỏi, ít rễ cây.

3.2. XÁC ĐỊNH NHÓM VI KHUẨN HIẾU KHÍ, NẤM MỐC VÀ XẠ KHUẨN TRONG MẪU ĐẤT KHU VỰC CÓ QUẦN THỂ LAN

3.2.1. Nhóm vi khuẩn hiếu khí trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan

Tiến hành xử lý 29 mẫu đất thu năm 2021: 24 mẫu đất thu năm 2022 tại các vị trí nói trên để xác định số lượng vi khuẩn hiếu khí. Đối với mẫu đất rắn: lấy 10g mẫu đất cho vào 90 ml nước vô trùng được nồng độ pha loãng 10⁻¹. Lắc đều dịch trong ống nghiệm, lấy 1 ml ở nồng độ 10⁻¹ cho vào 9 ml dịch nước pha loãng thu được nồng độ 10⁻². Làm tương tự như vậy với các nồng độ pha loãng tiếp theo. Xác

định số lượng tổng vi khuẩn hiếu khí trên môi trường nuôi cấy đặc trưng MPA, nuôi cấy ở nhiệt độ 30 °C trong 24 ÷ 48h.



Hình 3.1. Hình ảnh vi khuẩn hiếu khí tổng số phân lập

Kết quả về số lượng của vi khuẩn hiếu khí được trình bày tại bảng 3.3 và bảng 3.4.

Bảng 3.3. Số lượng tế bào các nhóm vi khuẩn hiếu khí trong mẫu đất thu năm 2021 khu vực có quần thể Lan

STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng vi khuẩn hiếu khí (CFU/g)
<i>Hướng Hóa, Quảng Trị</i>		
1	QT01	2,91. 10 ⁷
2	QT02	2,63. 10 ⁷
3	QT03	3,90. 10 ⁷
<i>Khu Bảo tồn loài và sinh cảnh Voi, Nông Sơn, Quảng Nam</i>		
4	QNbk01	9,21. 10 ⁶
5	QNbk02	7,22. 10 ⁶
6	QNbk03	7,21. 10 ⁶
7	QNbk04	8,25. 10 ⁶
8	QNbk05	9,20. 10 ⁶
9	QNbk06	8,24. 10 ⁶
10	QNbk07	9,23. 10 ⁶
11	QNbk08	9,33. 10 ⁶
12	QNnv01	2,36. 10 ⁶
13	QNnv02	3,41. 10 ⁶

STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng vi khuẩn hiếu khí (CFU/g)
14	QNnv03	$1,32. 10^7$
15	QNnv04	$4,32. 10^6$
16	QNnv05	$3,11. 10^6$
17	QNnv06	$3,32. 10^6$
18	QNnv07	$4,53. 10^6$
19	QNnv08	$2,31. 10^6$
20	QNbc01	$6,30. 10^5$
21	QNbc02	$7,20. 10^5$
22	QNbc03	$3,55. 10^5$
23	QNbc04	$7,34. 10^5$
<i>Khu Rừng đặc dụng Bà Nà - Núi Chúa, Đà Nẵng</i>		
24	ĐNbn01	$1,36. 10^6$
25	ĐNbn03	$2,95. 10^7$
26	ĐNbn04	$6,37. 10^6$
27	ĐNbn05	$4,35. 10^6$
28	ĐNbn06	$2,35. 10^6$
29	ĐNbn07	$8,18. 10^6$

Bảng 3.4. Số lượng tế bào các nhóm vi khuẩn hiếu khí trong mẫu đất thu năm 2022 khu vực có quần thể Lan

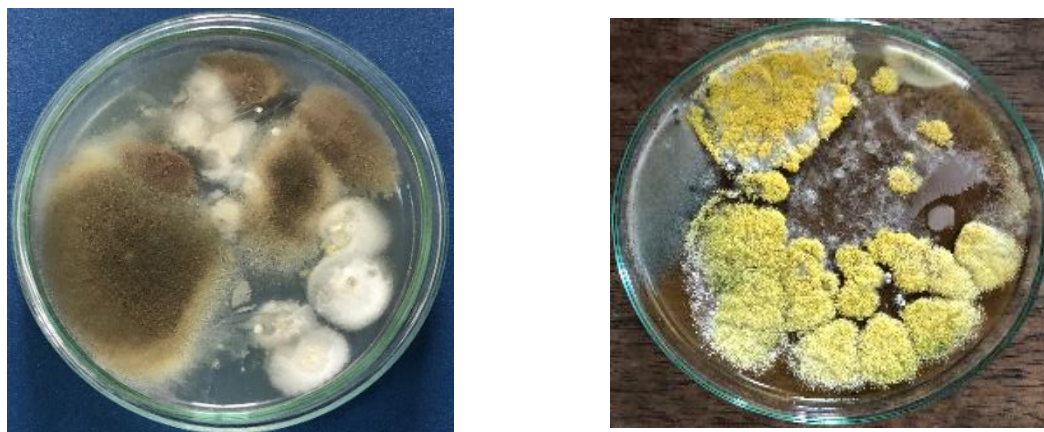
STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng vi khuẩn hiếu khí (CFU/g)
<i>Điểm 1 xã Khuê Ngọc Điền, huyện Krông Bông, Đắk Lắk</i>		
1	ĐLkb01	$3,92. 10^7$
2	ĐLkb02	$5,63. 10^7$
<i>Điểm 2 Xã Yang Tao, huyện Lắk, Đắk Lắk</i>		
3	ĐLyt01	$2,32. 10^6$
4	ĐLyt02	$4,53. 10^6$
5	ĐLyt03	$4,33. 10^6$
6	ĐLyt04	$6,31. 10^5$
7	ĐLyt05	$2,20. 10^6$
8	ĐLyt06	$7,86. 10^6$
9	ĐLyt07	$8,25. 10^6$
10	ĐLyt08	$9,45. 10^6$

STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng vi khuẩn hiếu khí (CFU/g)
11	ĐLyt09	6,32. 10 ⁶
12	ĐLyt10	9,45. 10 ⁶
<i>Điểm 3 xã Krông Nô, huyện Lắk, Đắk Lắk</i>		
13	ĐLkn01	9,56. 10 ⁵
14	ĐLkn02	8,19. 10 ⁵
15	ĐLkn03	7,34. 10 ⁵
16	ĐLkn04	9,39. 10 ⁵
<i>Điểm 4 xã Krông Nô, huyện Lắk, Đắk Lắk</i>		
17	ĐLknR01	7,57. 10 ⁵
18	ĐLknR02	8,56. 10 ⁵
19	ĐLknR03	5,72. 10 ⁶
20	ĐLknR04	8,12. 10 ⁷
21	ĐLknR05	7,45. 10 ⁶
22	ĐLknR06	6,76. 10 ⁶
23	ĐLknR07	7,89. 10 ⁶
24	ĐLknR08	9,21. 10 ⁶

Kết quả tại bảng 3.3 và bảng 3.4 cho thấy: vi khuẩn hiếu khí tổng số trong các mẫu đất rất đa dạng, thành phần và số lượng khá phong phú, đạt từ $10^5 \div 10^7$ CFU/g. Số liệu thống kê có tính tương đồng với nghiên cứu của Vũ Thị Hạnh Nguyễn và cộng sự về xác định các nhóm vi sinh vật trong đất [18].

3.2.2. Nhóm nấm mốc trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan

Tiến hành xử lý 29 mẫu đất thu năm 2021 và 24 mẫu đất thu năm 2022 tại các vị trí nói trên để xác định số lượng vi khuẩn hiếu khí. Đối với mẫu đất rắn: lấy 10g mẫu đất cho vào 90 ml nước vô trùng được nồng độ pha loãng 10^{-1} . Lắc đều dịch trong ống nghiệm, lấy 1 ml ở nồng độ 10^{-1} cho vào 9 ml dịch nước pha loãng thu được nồng độ 10^{-2} . Làm tương tự như vậy với các nồng độ pha loãng tiếp theo. Xác định số lượng tổng vi khuẩn hiếu khí trên môi trường nuôi cấy đặc trưng Czapek, nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 24 ÷ 48h.



Hình 3.2. Hình ảnh nấm mốc tổng số phân lập

Kết quả phân tích ở 29 mẫu đất thu năm 2021 và 24 mẫu đất thu năm 2022 tại các vị trí nói trên để xác định số lượng nấm mốc. Kết quả về số lượng của các nhóm nấm mốc được trình bày tại bảng 3.5 và bảng 3.6.

Bảng 3.5. Số lượng tế bào các nhóm nấm mốc trong mẫu đất thu năm 2021
khu vực có quần thể Lan

STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng nấm mốc tổng số (CFU/g)
<i>Hương Hóa, Quảng Trị</i>		
1	QT01	4,17. 10 ⁶
2	QT02	3,64. 10 ⁶
3	QT03	8,32. 10 ⁶
<i>Khu Bảo tồn loài và sinh cảnh Voi, Nông Sơn, Quảng Nam</i>		
4	QNbk01	3,21. 10 ⁶
5	QNbk02	9,14. 10 ⁵
6	QNbk03	9,20. 10 ⁵
7	QNbk04	3,60. 10 ⁶
8	QNbk05	2,21. 10 ⁶
9	QNbk06	3,45. 10 ⁶
10	QNbk07	1,28. 10 ⁶
11	QNbk08	3,32. 10 ⁶
12	QNnv01	2,72. 10 ⁶
13	QNnv02	4,37. 10 ⁶

STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng nấm mốc tổng số (CFU/g)
14	QNnv03	6,14. 10 ⁶
15	QNnv04	6,44. 10 ⁶
16	QNnv05	9,31. 10 ⁵
17	QNnv06	6,35. 10 ⁶
18	QNnv07	5,52. 10 ⁶
19	QNnv08	4,26. 10 ⁶
20	QNbc01	2,07. 10 ⁵
21	QNbc02	1,90. 10 ⁵
22	QNbc03	2,71. 10 ⁵
23	QNbc04	5,02. 10 ⁵
<i>Khu Rừng đặc dụng Bà Nà - Núi Chúa, Đà Nẵng</i>		
24	ĐNbn01	1,36. 10 ⁶
25	ĐNbn03	6,43. 10 ⁶
26	ĐNbn04	6,21. 10 ⁶
27	ĐNbn05	1,32. 10 ⁷
28	ĐNbn06	6,35. 10 ⁶
29	ĐNbn07	5,34. 10 ⁶

Bảng 3.6. Số lượng tế bào các nhóm nấm mốc trong mẫu đất thu năm 2022
khu vực có quần thể Lan

STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng nấm mốc tổng số (CFU/g)
<i>Điểm 1 xã Khuê Ngọc Điền, huyện Krông Bông, Đắk Lắk</i>		
1	ĐLkb01	2,27. 10 ⁶
2	ĐLkb02	4,65. 10 ⁶
<i>Điểm 2 Xã Yang Tao, huyện Lắk, Đắk Lắk</i>		
3	ĐLyt01	4,36. 10 ⁶
4	ĐLyt02	5,53. 10 ⁶
5	ĐLyt03	5,27. 10 ⁶
6	ĐLyt04	6,07. 10 ⁵

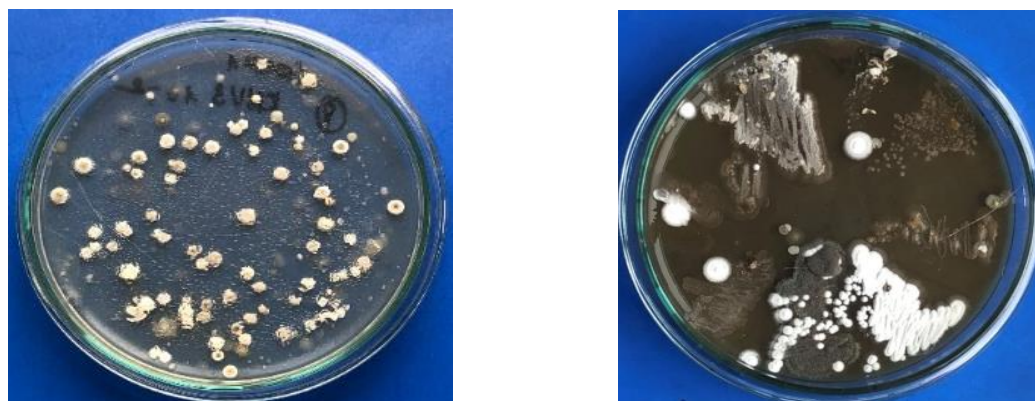
STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng nấm mốc tổng số (CFU/g)
7	ĐLyt05	7,92. 10 ⁶
8	ĐLyt06	5,27. 10 ⁶
9	ĐLyt07	9,23. 10 ⁵
10	ĐLyt08	9,34. 10 ⁶
11	ĐLyt09	6,72. 10 ⁶
12	ĐLyt10	4,45. 10 ⁶
<i>Điểm 3 xã Krông Nô, huyện Lắk, Đắk Lắk</i>		
13	ĐLkn01	7,12. 10 ⁵
14	ĐLkn02	9,91. 10 ⁵
15	ĐLkn03	5,56. 10 ⁵
16	ĐLkn04	2,32. 10 ⁶
<i>Điểm 4 xã Krông Nô, huyện Lắk, Đắk Lắk</i>		
17	ĐLknR01	8,60. 10 ⁵
18	ĐLknR02	6,53. 10 ⁵
19	ĐLknR03	5,56. 10 ⁶
20	ĐLknR04	7,21. 10 ⁶
21	ĐLknR05	6,23. 10 ⁶
22	ĐLknR06	7,56. 10 ⁷
23	ĐLknR07	3,67. 10 ⁶
24	ĐLknR08	8,71. 10 ⁶

Kết quả tại bảng 3.5 và bảng 3.6 cho thấy: nấm mốc tổng số trong các mẫu đất rất đa dạng, thành phần và số lượng khá phong phú, từ $10^5 \div 10^7$ CFU/g. Số liệu thống kê có tính tương đồng với nghiên cứu của Vũ Thị Hạnh Nguyên về xác định các nhóm vi sinh vật trong đất [18].

3.2.3. Nhóm xạ khuẩn trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan

Tiến hành xử lý 29 mẫu đất thu năm 2021, 24 mẫu đất thu năm 2022 tại các vị trí nói trên để xác định số lượng vi khuẩn hiếu khí. Đối với mẫu đất rắn: lấy 10g mẫu đất cho vào 90 ml nước vô trùng được nồng độ pha loãng 10^{-1} . Lắc đều dịch trong ống nghiệm, lấy 1 ml ở nồng độ 10^{-1} cho vào 9 ml dịch nước pha loãng thu được nồng độ 10^{-2} . Làm tương tự như vậy với các nồng độ pha loãng tiếp theo. Xác

định số lượng tổng vi khuẩn hiếu khí trên môi trường nuôi cấy đặc trung Gause 1, nuôi cấy ở nhiệt độ 30 °C trong 24 ÷ 48h.



Hình 3.3. Hình ảnh xạ khuẩn tổng số phân lập

Kết quả về số lượng của các nhóm xạ khuẩn được trình bày tại bảng 3.7 và bảng 3.8.

Bảng 3.7. Số lượng tế bào các nhóm xạ khuẩn trong mẫu đất thu năm 2021
khu vực có quần thể Lan

STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng xạ khuẩn tổng số (CFU/g)
<i>Hướng Hóa, Quảng Trị</i>		
1	QT01	5,12. 10 ⁵
2	QT02	6,41. 10 ⁵
3	QT03	5,20. 10 ⁵
<i>Khu Bảo tồn loài và sinh cảnh Voi, Nông Sơn, Quảng Nam</i>		
4	QNbk01	1,21. 10 ⁵
5	QNbk02	7,15. 10 ⁴
6	QNbk03	6,23. 10 ⁵
7	QNbk04	8,22. 10 ⁵
8	QNbk05	2,22. 10 ⁶
9	QNbk06	8,27. 10 ⁵
10	QNbk07	9,11. 10 ⁵
11	QNbk08	9,32. 10 ⁵
12	QNnv01	3,77. 10 ⁵

STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng xạ khuẩn tổng số (CFU/g)
13	QNnv02	6,50. 10 ⁵
14	QNnv03	1,30. 10 ⁶
15	QNnv04	6,31. 10 ⁵
16	QNnv05	2,90. 10 ⁵
17	QNnv06	5,34. 10 ⁵
18	QNnv07	6,21. 10 ⁵
19	QNnv08	6,71. 10 ⁵
20	QNbc01	2,39. 10 ⁴
21	QNbc02	1,44. 10 ⁴
22	QNbc03	7,52. 10 ⁴
23	QNbc04	6,22. 10 ⁴
<i>Khu Rừng đặc dụng Bà Nà - Núi Chúa, Đà Nẵng</i>		
24	ĐNbn01	1,31. 10 ⁵
25	ĐNbn03	4,33. 10 ⁵
26	ĐNbn04	1,44. 10 ⁶
27	ĐNbn05	3,02. 10 ⁵
28	ĐNbn06	7,32. 10 ⁵
29	ĐNbn07	1,90. 10 ⁵

Bảng 3.8. Số lượng tế bào các nhóm xạ khuẩn trong mẫu đất thu năm 2022

khu vực có quần thể Lan

STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng xạ khuẩn tổng số (CFU/g)
<i>Điểm 1 xã Khuê Ngọc Điền, huyện Krông Bông, Đắk Lắk</i>		
1	ĐLkb01	7,15. 10 ⁶
2	ĐLkb02	8,43. 10 ⁶
<i>Điểm 2 Xã Yang Tao, huyện Lắk, Đắk Lắk</i>		
3	ĐLyt01	7,34. 10 ⁵
4	ĐLyt02	8,21. 10 ⁶
5	ĐLyt03	9,71. 10 ⁵

STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng xạ khuẩn tổng số (CFU/g)
6	ĐLyt04	2,32. 10 ⁵
7	ĐLyt05	7,24. 10 ⁵
8	ĐLyt06	9,29. 10 ⁵
9	ĐLyt07	8,17. 10 ⁵
10	ĐLyt08	7,25. 10 ⁶
11	ĐLyt09	8,27. 10 ⁵
12	ĐLyt10	5,29. 10 ⁶
<i>Điểm 3 xã Krông Nô, huyện Lắk, Đắk Lắk</i>		
13	ĐLkn01	4,40. 10 ⁴
14	ĐLkn02	5,47. 10 ⁴
15	ĐLkn03	7,62. 10 ⁴
16	ĐLkn04	3,45. 10 ⁴
<i>Điểm 4 xã Krông Nô, huyện Lắk, Đắk Lắk</i>		
17	ĐLknR01	7,52. 10 ⁴
18	ĐLknR02	6,26. 10 ⁴
19	ĐLknR03	5,38. 10 ⁵
20	ĐLknR04	8,33. 10 ⁵
21	ĐLknR05	8,45. 10 ⁶
22	ĐLknR06	4,23. 10 ⁵
23	ĐLknR07	8,32. 10 ⁵
24	ĐLknR08	2,91. 10 ⁵

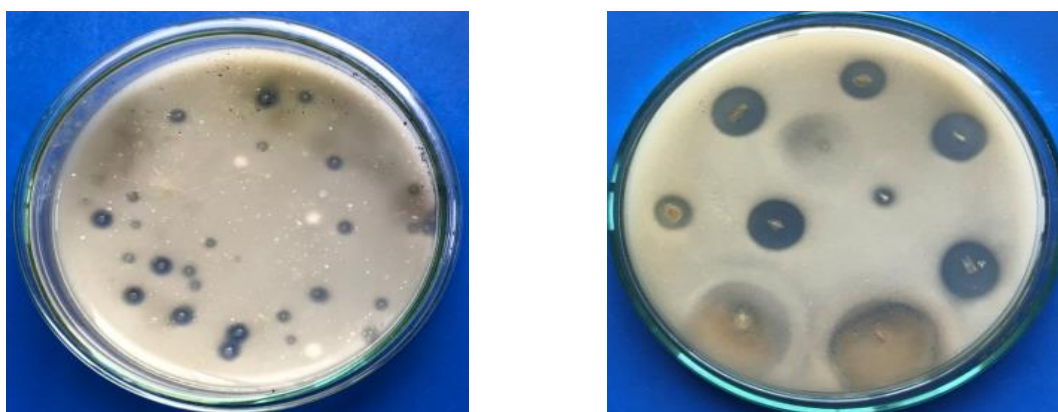
Kết quả tại bảng 3.7 và bảng 3.8 cho thấy : xạ khuẩn trong các mẫu đất rất đa dạng, thành phần và số lượng khá phong phú, đạt từ $10^4 \div 10^6$ CFU/g. Số liệu thống kê có tính tương đồng với nghiên cứu của Vũ Thị Hạnh Nguyên về xác định các nhóm vi sinh vật trong đất [18].

Qua kết quả trên cho thấy, thành phần và số lượng các nhóm vi sinh vật khá phong phú. Thông qua số lượng và thành phần các nhóm vi sinh vật trong đất có thể khẳng định cấu tạo của đất tốt. Tuy nhiên, số lượng nấm mốc khá cao $10^5 \div 10^7$ CFU/g còn số lượng các nhóm xạ khuẩn thấp, điều đó chứng tỏ có khả năng có gây nên các nguồn bệnh cho cây.

3.3. XÁC ĐỊNH NHÓM VI SINH VẬT CÓ KHẢ NĂNG CỐ ĐỊNH NITƠ, PHÂN GIẢI CELLULOSE, PHÂN GIẢI PHOTPHO VÀ SINH TỔNG HỢP INDOLE- 3- ACETIC ACID TRONG MẪU ĐẤT KHU VỰC CÓ QUẦN THỂ LAN

3.3.1. Nhóm vi sinh vật có khả năng cố định nitơ trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan

Sau khi phân lập được 3 nhóm vi sinh vật như vi khuẩn hiếu khí tổng số, xạ khuẩn tổng số và vi nấm tổng số. Tiến hành phân tích đánh giá số lượng tế bào vi sinh vật cố định nitơ. Các chủng vi khuẩn *Azotobacter* cố định nitơ được phân lập và tuyển chọn trên môi trường Ashby không đạm: Khuẩn lạc dạng nhầy, đàn hồi, lồi, có khi nhăn nheo và khi già, khuẩn lạc có màu vàng lục, màu hồng hoặc màu nâu đen và các chủng *Azospirillum* trên môi trường Rojo Công gô: Khuẩn lạc của *Azospirillum* màu đỏ tía sau 4 ngày nuôi cấy ở 37 °C. Hình ảnh đại diện nhóm vi sinh vật có hoạt tính sinh học cố định nitơ được trình bày ở hình 3.4.



Hình 3.4. Hình ảnh đại diện vi sinh vật cố định nitơ phân lập

Tiến hành phân tích đánh giá số lượng tế bào vi sinh vật cố định nitơ các mẫu đất khu vực có quần thể lan, kết quả thu được kết quả tại các bảng sau :

Bảng 3.9. Số lượng tế bào vi sinh vật cố định nitơ trong các mẫu đất thu năm 2021 khu vực có quần thể Lan

STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng tế bào cố định nitơ (CFU/g)
<i>Hướng Hóa, Quảng Trị</i>		
1	QT01	4,16. 10 ²
2	QT02	5,71. 10 ²
3	QT03	6,85. 10 ²
<i>Khu Bảo tồn loài và sinh cảnh Voi, Nông Sơn, Quảng Nam</i>		

STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng tế bào cố định nitơ (CFU/g)
4	QNbk01	4,26. 10 ³
5	QNbk02	7,14. 10 ³
6	QNbk03	5,53. 10 ⁴
7	QNbk04	8,79. 10 ⁴
8	QNbk05	2,45. 10 ³
9	QNbk06	8,12. 10 ⁴
10	QNbk07	8,34. 10 ³
11	QNbk08	7,56. 10 ³
12	QNnv01	5,47. 10 ³
13	QNnv02	8,12. 10 ³
14	QNnv03	7,23. 10 ³
15	QNnv04	5,69. 10 ³
16	QNnv05	7,13. 10 ³
17	QNnv06	5,09. 10 ³
18	QNnv07	4,34. 10 ³
19	QNnv08	7,21. 10 ³
20	QNbc01	6,34. 10 ²
21	QNbc02	7,67. 10 ²
22	QNbc03	6,34. 10 ²
23	QNbc04	5,67. 10 ³
<i>Khu Rừng đặc dụng Bà Nà - Núi Chúa, Đà Nẵng</i>		
24	ĐNbn01	3,76. 10 ³
25	ĐNbn03	6,95. 10 ³
26	ĐNbn04	5,34. 10 ⁴
27	ĐNbn05	6,78. 10 ³
28	ĐNbn06	4,12. 10 ³
29	ĐNbn07	6,31. 10 ⁴

Bảng 3.10. Số lượng tế bào vi sinh vật cố định nitơ trong các mẫu đất thu năm 2022 khu vực có quần thể Lan

STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng tế bào cố định nitơ (CFU/g)
<i>Điểm 1 xã Khuê Ngọc Điền, huyện Krông Bông, Đắk Lắk</i>		
1	ĐLkb01	2,26. 10 ²

STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng tế bào cố định nito (CFU/g)
2	ĐLkb02	$3,71. 10^2$
<i>Điểm 2 Xã Yang Tao, huyện Lắk, Đắk Lắk</i>		
3	ĐLyt01	$3,23. 10^3$
4	ĐLyt02	$5,19. 10^3$
5	ĐLyt03	$1,56. 10^4$
6	ĐLyt04	$6,72. 10^3$
7	ĐLyt05	$6,01. 10^3$
8	ĐLyt06	$2,05. 10^4$
9	ĐLyt07	$8,12. 10^3$
10	ĐLyt08	$7,02. 10^3$
11	ĐLyt09	$3,27. 10^3$
12	ĐLyt10	$4,56. 10^3$
<i>Điểm 3 xã Krông Nô, huyện Lắk, Đắk Lắk</i>		
13	ĐLkn01	$7,63. 10^3$
14	ĐLkn02	$6,94. 10^3$
15	ĐLkn03	$5,21. 10^4$
16	ĐLkn04	$6,32. 10^3$
<i>Điểm 4 xã Krông Nô, huyện Lắk, Đắk Lắk</i>		
17	ĐLknR01	$5,13. 10^3$
18	ĐLknR02	$5,09. 10^3$
19	ĐLknR03	$4,12. 10^3$
20	ĐLknR04	$7,05. 10^3$
21	ĐLknR05	$6,01. 10^2$
22	ĐLknR06	$5,02. 10^2$
23	ĐLknR07	$4,12. 10^2$
24	ĐLknR08	$5,36. 10^2$

Kết quả tại bảng 3.9 và 3.10 cho thấy: Số lượng tế bào vi sinh vật cố định nito trong các mẫu đất khá đa dạng và phong phú, đạt trung bình từ $10^2 \div 10^4$ CFU/g. Số liệu thống kê phù hợp với các nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu và đồng nghiệp về vi sinh vật cố định đạm trong đất [19].

3.3.2. Nhóm vi sinh vật phân giải photpho trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan

Sau khi phân lập được 3 nhóm vi sinh vật như vi khuẩn hiếu khí tổng số, xạ khuẩn tổng số và vi nấm tổng số. Tiến hành phân tích đánh giá số lượng tế bào vi sinh vật phân giải photpho theo phương pháp TCVN 6167: 1996. Cân 10 g mẫu (có thể nghiền nhỏ mẫu trước) chính xác đến 0,01 g và cho vào bình chứa 90 ml dịch pha loãng là nước muối sinh lý (NaCl 0,85 %). Trộn kỹ mẫu bằng thiết bị trộn cơ học từ 5 đến 10 phút sao cho vi sinh vật trong dung dịch phân bố đồng đều. Để cho các phần tử nặng lắng xuống trong thời gian không quá 15 phút, gạn lấy dung dịch huyền phù. Dùng pipet tiếp tục pha loãng dung dịch huyền phù đến nồng độ pha loãng 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . Dùng Pipet vô trùng riêng cho từng độ pha loãng, lấy ra lượng mẫu là 0,05 ml từ các dịch mẫu cấy vào 1 đĩa Petri chứa môi trường chọn lọc Gerresen: Khuẩn lạc *Bacillus* có khuẩn lạc tròn đều, hơi lượn sóng, nhẵn, thường có các vòng tròn đồng tâm trên bề mặt, có màu trắng sữa và chuyển sang màu kem, có khi màu nâu nhạt có ánh mờ, đục. Vi khuẩn phân giải lân sẽ tạo vòng phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$ khó tan trong suốt bao quanh khuẩn lạc.

Hình ảnh đại diện các nhóm vi sinh vật có hoạt tính sinh học được trình bày ở hình 3.5.



Hình 3.5. Hình ảnh đại diện vi sinh vật phân giải photpho

Tiến hành phân tích đánh giá số lượng tế bào vi sinh vật phân giải photpho các mẫu đất khu vực có quần thể lan, kết quả thu được kết quả tại các bảng sau :

Bảng 3.11. Số lượng tế bào vi sinh vật phân giải photphat trong các mẫu đất thu năm 2021 khu vực có quần thể Lan

STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng tế bào phân giải photpho (CFU/g)
<i>Hương Hóa, Quảng Trị</i>		
1	QT01	$5,19. 10^2$
2	QT02	$4,91. 10^2$
3	QT03	$5,39. 10^2$
<i>Khu Bảo tồn loài và sinh cảnh Voi, Nông Sơn, Quảng Nam</i>		
4	QNbk01	$6,46. 10^3$
5	QNbk02	$5,52. 10^3$
6	QNbk03	$6,28. 10^3$
7	QNbk04	$4,96. 10^4$
8	QNbk05	$8,83. 10^3$
9	QNbk06	$9,40. 10^3$
10	QNbk07	$5,73. 10^3$
11	QNbk08	$7,34. 10^4$
12	QNnv01	$8,24. 10^3$
13	QNnv02	$6,56. 10^4$
14	QNnv03	$6,91. 10^3$
15	QNnv04	$8,56. 10^3$
16	QNnv05	$5,63. 10^4$
17	QNnv06	$3,34. 10^4$
18	QNnv07	$5,43. 10^3$
19	QNnv08	$2,67. 10^3$
20	QNbc01	$4,39. 10^2$
21	QNbc02	$5,54. 10^2$
22	QNbc03	$6,78. 10^2$
23	QNbc04	$8,22. 10^2$
<i>Khu Rừng đặc dụng Bà Nà - Núi Chúa, Đà Nẵng</i>		
24	ĐNbn01	$4,24. 10^4$
25	ĐNbn03	$7,33. 10^3$
26	ĐNbn04	$8,45. 10^3$
27	ĐNbn05	$6,89. 10^4$

STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng tế bào phân giải photpho (CFU/g)
28	ĐNbn06	5,78. 10 ³
29	ĐNbn07	5,36. 10 ³

Bảng 3.12. Số lượng tế bào vi sinh vật phân giải photpho trong các mẫu đất thu năm 2022 khu vực có quần thể Lan

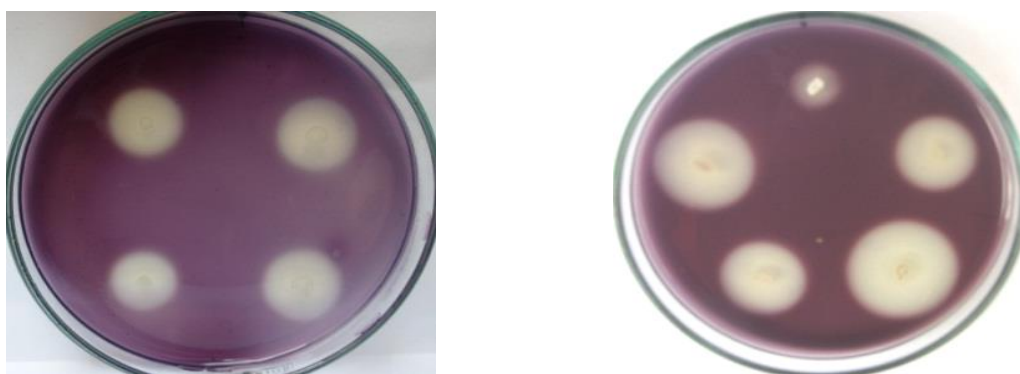
STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng tế bào phân giải photpho (CFU/g)
<i>Điểm 1 xã Khuê Ngọc Điền, huyện Krông Bông, Đắk Lắk</i>		
1	ĐLkb01	3,15. 10 ³
2	ĐLkb02	2,96. 10 ²
<i>Điểm 2 Xã Yang Tao, huyện Lắk, Đắk Lắk</i>		
3	ĐLyt01	4,16. 10 ³
4	ĐLyt02	5,22. 10 ³
5	ĐLyt03	3,98. 10 ³
6	ĐLyt04	1,96. 10 ⁴
7	ĐLyt05	7,82. 10 ³
8	ĐLyt06	5,39. 10 ³
9	ĐLyt07	6,71. 10 ³
10	ĐLyt08	2,01. 10 ⁴
11	ĐLyt09	8,56. 10 ³
12	ĐLyt10	7,51. 10 ³
<i>Điểm 3 xã Krông Nô, huyện Lắk, Đắk Lắk</i>		
13	ĐLkn01	2,23. 10 ⁴
14	ĐLkn02	7,33. 10 ³
15	ĐLkn03	8,10. 10 ³
16	ĐLkn04	2,89. 10 ⁴
<i>Điểm 4 xã Krông Nô, huyện Lắk, Đắk Lắk</i>		
17	ĐLknR01	2,57. 10 ⁴
18	ĐLknR02	1,78. 10 ⁴
19	ĐLknR03	4,11. 10 ³
20	ĐLknR04	3,45. 10 ³
21	ĐLknR05	5,33. 10 ²
22	ĐLknR06	6,72. 10 ²
23	ĐLknR07	3,56. 10 ²
24	ĐLknR08	9,41. 10 ¹

Kết quả tại bảng 3.11 và bảng 3.12 cho thấy: Số lượng tế bào vi sinh vật phân giải photpho trong các mẫu đất khá đa dạng và phong phú đạt trung bình từ $10^1 \div 10^4$ CFU/g. Số liệu thống kê phù hợp với các nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu và đồng nghiệp về vi sinh vật cố định đạm trong đất [19].

3.3.3. Nhóm vi sinh vật phân giải cellulose trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan

Sau khi phân lập được 3 nhóm vi sinh vật như vi khuẩn hiếu khí tổng số, xạ khuẩn tổng số và vi nấm tổng số. Tiến hành phân tích đánh giá số lượng tế bào vi sinh vật phân giải cellulose bằng theo phương pháp TCVN 6168: 2002, sau khi vi sinh vật phát triển mạnh thì thử bằng thuốc thử Lugol, xác định vòng phân giải cellulase.

Hình ảnh đại diện các nhóm vi sinh vật có hoạt tính sinh học được trình bày ở hình 3.6.



Hình 3.6. Hình ảnh đại diện vi sinh vật phân giải cellulose

Tiến hành phân tích đánh giá số lượng tế bào vi sinh vật phân giải cellulose các mẫu đất khu vực có quần thể lan, kết quả thu được kết quả tại các bảng sau :

Bảng 3.13. Số lượng tế bào vi sinh vật phân giải cellulose trong các mẫu đất thu năm 2021 khu vực có quần thể Lan

STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng tế bào phân giải cellulose (CFU/g)
<i>Hướng Hóa, Quảng Trị</i>		
1	QT01	$6,90. 10^3$
2	QT02	$4,21. 10^2$
3	QT03	$3,34. 10^2$
<i>Khu Bảo tồn loài và sinh cảnh Voi, Nông Sơn, Quảng Nam</i>		
4	QNbk01	$3,37. 10^3$

STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng tế bào phân giải cellulose (CFU/g)
5	QNbk02	5,23. 10 ³
6	QNbk03	9,56. 10 ²
7	QNbk04	7,67. 10 ³
8	QNbk05	6,43. 10 ³
9	QNbk06	3,26. 10 ³
10	QNbk07	7,26. 10 ³
11	QNbk08	4,34. 10 ⁴
12	QNnv01	9,73. 10 ³
13	QNnv02	5,12. 10 ⁴
14	QNnv03	9,32. 10 ³
15	QNnv04	4,43. 10 ⁴
16	QNnv05	7,67. 10 ⁴
17	QNnv06	5,72. 10 ⁴
18	QNnv07	3,21. 10 ⁴
19	QNnv08	2,78. 10 ⁴
20	QNbc01	7,32. 10 ²
21	QNbc02	5,27. 10 ³
22	QNbc03	5,34. 10 ³
23	QNbc04	6,56. 10 ²
<i>Khu Rừng đặc dụng Bà Nà - Núi Chúa, Đà Nẵng</i>		
24	ĐNbn01	5,34. 10 ³
25	ĐNbn03	7,22. 10 ³
26	ĐNbn04	9,053. 10 ⁴
27	ĐNbn05	4,21. 10 ³
28	ĐNbn06	7,25. 10 ⁴
29	ĐNbn07	2,92. 10 ³

Bảng 3.14. Số lượng tế bào vi sinh vật phân giải cellulose trong các mẫu đất thu năm 2022 khu vực có quần thể Lan

STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng tế bào phân giải cellulose (CFU/g)
<i>Điểm 1 xã Khuê Ngọc Điền, huyện Krông Bông, Đắk Lắk</i>		
1	ĐLkb01	1,90. 10 ³
2	ĐLkb02	2,16. 10 ³

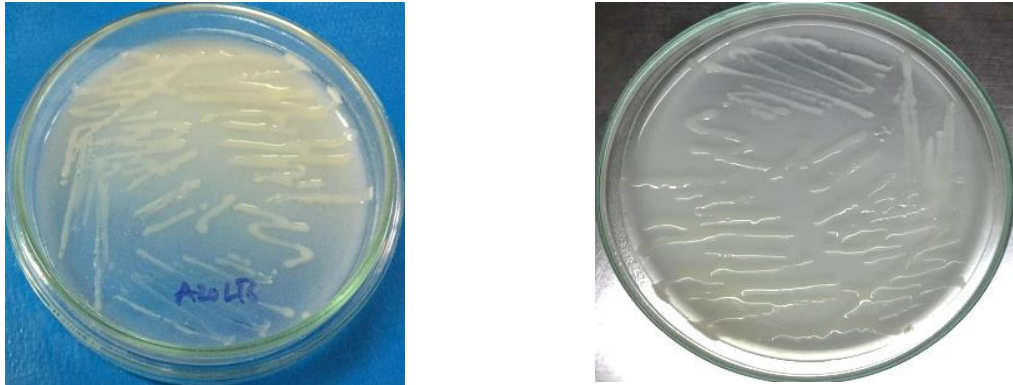
STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng tế bào phân giải cellulose (CFU/g)
<i>Điểm 2 Xã Yang Tao, huyện Lăk, Đắk Lắk</i>		
3	ĐLyt01	$2,35. 10^3$
4	ĐLyt02	$4,01. 10^3$
5	ĐLyt03	$9,67. 10^2$
6	ĐLyt04	$3,42. 10^3$
7	ĐLyt05	$2,56. 10^3$
8	ĐLyt06	$4,19. 10^3$
9	ĐLyt07	$5,24. 10^3$
10	ĐLyt08	$1,34. 10^4$
11	ĐLyt09	$9,71. 10^3$
12	ĐLyt10	$2,09. 10^4$
<i>Điểm 3 xã Krông Nô, huyện Lăk, Đắk Lắk</i>		
13	ĐLkn01	$6,32. 10^3$
14	ĐLkn02	$7,20. 10^3$
15	ĐLkn03	$3,03. 10^4$
16	ĐLkn04	$5,90. 10^3$
<i>Điểm 4 xã Krông Nô, huyện Lăk, Đắk Lắk</i>		
17	ĐLknR01	$2,57. 10^4$
18	ĐLknR02	$3,71. 10^4$
19	ĐLknR03	$2,88. 10^4$
20	ĐLknR04	$1,56. 10^4$
21	ĐLknR05	$7,12. 10^2$
22	ĐLknR06	$5,36. 10^2$
23	ĐLknR07	$4,31. 10^2$
24	ĐLknR08	$3,51. 10^2$

Kết quả tại bảng 3.13 và 3.14 cho thấy: Số lượng tế bào vi sinh vật phân giải cellulose trong các mẫu đất khá đa dạng và phong phú đạt trung bình từ $10^1 \div 10^4$ CFU/g.

3.3.4. Nhóm vi sinh vật sinh tổng hợp Indole- 3- Acetic Acid trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan

Sau khi phân lập được 3 nhóm vi sinh vật như vi khuẩn hiếu khí tổng số, xạ khuẩn tổng số và vi nấm tổng số. Tiến hành phân tích đánh giá số lượng tế bào vi

sinh vật sinh tổng hợp Indole- 3- Acetic Acid theo TCVN 10784: 2015: Vi sinh vật – Xác định khả năng sinh tổng hợp Axit 3 – Indol – Acetic (IAA): Vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp IAA là vi sinh vật tạo được vòng màu đỏ bao quanh khuẩn lạc/ cụm khuẩn lạc, hình ảnh đại diện các nhóm vi sinh vật có hoạt tính sinh học được trình bày ở hình 3.7.



Hình 3.7. Hình ảnh đại diện nhóm vi sinh vật sinh tổng hợp Indole- 3- Acetic Acid

Tiến hành phân tích đánh giá số lượng tế bào vi sinh vật sinh tổng hợp Indole- 3- Acetic Acid các mẫu đất khu vực có quần thể lan, kết quả thu được kết quả tại các bảng sau :

Bảng 3.15. Số lượng tế bào vi sinh vật sinh tổng hợp Indole- 3- Acetic Acid trong các mẫu đất thu năm 2021 khu vực có quần thể Lan

STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng tế bào sinh tổng hợp IAA (CFU/g)
<i>Hương Hóa, Quảng Trị</i>		
1	QT01	5,46. 10 ³
2	QT02	7,37. 10 ³
3	QT03	4,73. 10 ³
<i>Khu Bảo tồn loài và sinh cảnh Voi, Nông Sơn, Quảng Nam</i>		
4	QNbk01	7,25. 10 ³
5	QNbk02	7,36. 10 ³
6	QNbk03	7,34. 10 ⁴
7	QNbk04	8,21. 10 ³
8	QNbk05	7,45. 10 ³
9	QNbk06	4,67. 10 ⁴
10	QNbk07	6,34. 10 ³

STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng tế bào sinh tổng hợp IAA (CFU/g)
11	QNbk08	6,42. 10 ³
12	QNnv01	4,29. 10 ³
13	QNnv02	8,72. 10 ²
14	QNnv03	8,25. 10 ²
15	QNnv04	6,74. 10 ³
16	QNnv05	2,32. 10 ³
17	QNnv06	6,366. 10 ³
18	QNnv07	3,98. 10 ³
19	QNnv08	5,34. 10 ³
20	QNbc01	4,35. 10 ²
21	QNbc02	6,32. 10 ²
22	QNbc03	6,43. 10 ³
23	QNbc04	7,34. 10 ²
<i>Khu Rừng đặc dụng Bà Nà - Núi Chúa, Đà Nẵng</i>		
24	ĐNbn01	7,34. 10 ³
25	ĐNbn03	6,21. 10 ³
26	ĐNbn04	8,24. 10 ⁴
27	ĐNbn05	8,53. 10 ⁴
28	ĐNbn06	7,76. 10 ⁴
29	ĐNbn07	7,32. 10 ³

Bảng 3.16. Số lượng tế bào vi sinh vật sinh tổng hợp Indole- 3- Acetic Acid trong các mẫu đất thu năm 2022 khu vực có quần thể Lan

STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng tế bào sinh tổng hợp IAA (CFU/g)
<i>Điểm 1 xã Khuê Ngọc Điền, huyện Krông Bông, Đắk Lắk</i>		
1	ĐLkb01	3,45. 10 ³
2	ĐLkb02	1,36. 10 ³
<i>Điểm 2 Xã Yang Tao, huyện Lắk, Đắk Lắk</i>		
3	ĐLyt01	5,23. 10 ³
4	ĐLyt02	6,31. 10 ³
5	ĐLyt03	7,01. 10 ³

STT	Ký hiệu mẫu	Số lượng tế bào sinh tổng hợp IAA (CFU/g)
6	ĐLyt04	8,42. 10 ³
7	ĐLyt05	7,19. 10 ³
8	ĐLyt06	1,36. 10 ⁴
9	ĐLyt07	6,34. 10 ³
10	ĐLyt08	5,41. 10 ³
11	ĐLyt09	4,23. 10 ³
12	ĐLyt10	8,56. 10 ²
<i>Điểm 3 xã Krông Nô, huyện Lắk, Đắk Lắk</i>		
13	ĐLkn01	6,78. 10 ³
14	ĐLkn02	6,94. 10 ³
15	ĐLkn03	7,24. 10 ⁴
16	ĐLkn04	8,03. 10 ³
<i>Điểm 4 xã Krông Nô, huyện Lắk, Đắk Lắk</i>		
17	ĐLknR01	4,32. 10 ³
18	ĐLknR02	3,11. 10 ³
19	ĐLknR03	2,98. 10 ³
20	ĐLknR04	4,34. 10 ³
21	ĐLknR05	4,02. 10 ²
22	ĐLknR06	6,32. 10 ²
23	ĐLknR07	2,13. 10 ²
24	ĐLknR08	5,02. 10 ²

Kết quả tại bảng 3.15 và 3.16 cho thấy: Số lượng tế bào vi sinh vật sinh tổng hợp Indole- 3- Acetic Acid trong các mẫu đất khá đa dạng và phong phú đạt trung bình từ $10^1 \div 10^4$ CFU/g.

3.4. PHÂN LẬP MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN VÀ XẠ KHUẨN TRONG MẪU ĐẤT KHU VỰC CÓ QUẦN THỂ LAN

3.4.1. Phân lập sơ bộ các chủng vi khuẩn trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan

Từ 29 mẫu đất thu năm 2021 tại quần thể Lan ở Hướng Hóa tỉnh Quảng Trị, khu Bảo tồn loài và sinh cảnh Voi, Nông Sơn tỉnh Quảng Nam và Khu rừng đặc dụng Bà Nà - Núi Chúa thành phố Đà Nẵng, đã phân lập và thuần khiết được 18 chủng vi khuẩn. Để nghiên cứu khả năng phát triển, đặc điểm hình dạng khuẩn lạc, khả năng sinh sắc tố tan của vi khuẩn, các chủng được nuôi cấy trên môi trường

MPA-CMC. Xác định đặc điểm hình thái khuẩn lạc sau 48 giờ nuôi và đường kính vòng phân giải cellulase (D-d) \pm 0,2 mm. Kết quả được trình bày ở bảng 3.17

Bảng 3.17. Một số đặc điểm sinh học chủng vi khuẩn phân lập từ đất khu vực có quần thể Lan

TT	Ký hiệu chủng	Khả năng sinh trưởng	Hình dạng khuẩn lạc	Màu sắc khuẩn lạc	Mặt dưới khuẩn lạc	Hình thái tế bào	Gram	Đường kính vòng phân giải cellulase (D-d) \pm 0,2 mm
<i>Hương Hóa, Quảng Trị</i>								
1	QT01	Tốt	Tròn, bề mặt trơn, trắng đục, không có nhân	Trắng	Trắng	Cầu	+	21
2	QT02	Tốt	Tròn, bề mặt trơn, bóng, không có nhân	Vàng nâu	Vàng nâu	Que	-	22
3	QT03	Tốt	Tròn, lồi, trắng đục, không có nhân	Trắng đục	Trắng	Que	+	36
4	QT04	Yếu	Tròn, bề mặt trơn, hơi khô, không có nhân	Trắng	Trắng	Cầu	+	13
5	QT05	Yếu	Hơi tròn, bề mặt nhẵn, hơi khô, có nhân	Vàng nâu	Vàng nâu	Que	-	16

6	Cm1V06	Tốt	Tròn, bề mặt nhẵn, hơi khô, có nhân	Trắng	Trắng	Cầu	-	19
<i>Khu Bảo tồn loài và sinh cảnh Voi, Nông Sơn, Quảng Nam</i>								
7	QNbk01	Tốt	Tròn, bề mặt trơn, bóng không có nhân	Trắng	Trắng	Cầu	+	21
8	QNbk02	Tốt	Tròn, bề mặt trơn, bóng không có nhân	Vàng	Nâu	Que	-	20
9	QNbk03	Tốt	Tròn, bề mặt trơn, bóng không có nhân	Vàng	Nâu	Cầu	+	17
10	QNbk04	Tốt	Tròn, bề mặt nhẵn, bóng, có nhân	Trắng	Trắng	Cầu	+	15
11	QNbk05	Tốt	Nhẵn, răng cưa, trắng kem	Trắng kem	Trắng	Que	+	23
12	QNbk06	Yếu	Tròn, bề mặt nhẵn, hơi khô, có nhân	Vàngnâu	Nâu	Cầu	+	22
13	QNbk07	Yếu	Tròn, bề mặt trơn, hơi khô, không có nhân	Trắng	Trắng	Cầu	+	21

<i>Khu Rừng đặc dụng Bà Nà - Núi Chúa, Đà Nẵng</i>								
14	ĐNbn01	Tốt	Tròn, bề mặt tron, bóng, không có nhân	Vàng	Vàng	Que	-	19
15	ĐNbn02	Yếu	Tròn, bề mặt tron, bóng, không có nhân	Trắng	Trắng	Cầu	-	12
16	ĐNbn03	Yếu	Tròn, bề mặt tron, bóng, không có nhân	Vàng	Vàng	Que	+	11
17	ĐNbn04	Tốt	Tròn, bề mặt tron, bóng, không có nhân	Vàng	Vàng	Cầu	+	12
18	ĐNbn05	Tốt	Tròn, bề mặt nhẵn, hơi khô, có nhân	Vàng	Vàng	Cầu	+	14

Chú thích: (-) : Gram âm

(+): Gram dương

Kết quả nghiên cứu trên Bảng 3.17 cho thấy, các chủng vi khuẩn đều phát triển tốt, tạo ra khuẩn lạc đặc trưng khi nuôi cấy trên môi trường MPA-CMC. Tổng số 18 chủng khảo sát có 12 chủng thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm chiếm tỉ lệ 66,67 % và 6 chủng thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương chiếm tỉ lệ 33,33 %.

3.4.2. Phân lập sơ bộ các chủng xạ khuẩn trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan

Từ 29 mẫu đất thu năm 2021 tại quần thể Lan ở Hướng Hóa tỉnh Quảng Trị, khu Bảo tồn loài và sinh cảnh Voi, Nông Sơn tỉnh Quảng Nam và khu rừng đặc

dụng Bà Nà - Núi Chúa thành phố Đà Nẵng đã phân lập và thuần khiết được 27 chủng xạ khuẩn. Để nghiên cứu khả năng sinh trưởng, đặc điểm hình dáng khuẩn lạc, khả năng sinh sắc tố tan của xạ khuẩn và đường kính vòng phân giải cellulase (D-d) $\pm 0,2$ mm, các chủng được nuôi trên môi trường và xác định sau 120 giờ nuôi. Kết quả được trình bày ở bảng 3.18.

Bảng 3.18 Một số đặc điểm sinh học chủng xạ khuẩn phân lập từ đất khu vực có quần thể Lan

STT	Ký hiệu	Đặc điểm khuẩn lạc	Nhóm màu	Đường kính vòng phân giải cellulase (D-d) $\pm 0,2$ mm
<i>Hương Hóa, Quảng Trị</i>				
1	QT01	Khuẩn ty khi sinh màu trắng xám, tròn, bề mặt bông mịn, có viền, viền khuẩn lạc trong, khuẩn lạc đồng nhất, không sinh sắc tố	Trắng	30
2	QT02	Khuẩn lạc màu trắng, tròn, có viền, viền khuẩn lạc trong, bề mặt khuẩn lạc xù xì, khuẩn lạc dạng hạt, khuẩn lạc không đồng nhất, không sinh sắc tố	Trắng	19
3	QT03	Khuẩn lạc có màu trắng, tròn, bề mặt của khuẩn lạc xù xì, khuẩn lạc dạng sợi, có viền, viền khuẩn lạc trong, bằng phẳng, khuẩn lạc không đồng nhất, không sinh sắc tố	Trắng	18
4	QT04	Khuẩn lạc có màu trắng, tròn, bề mặt của khuẩn lạc xù xì, khuẩn lạc dạng hạt, khuẩn lạc không đồng nhất, không sinh sắc tố	Trắng	13
5	QT05	Khuẩn lạc màu trắng, tròn, bề mặt khuẩn lạc xù xì, khuẩn lạc dạng hạt, khuẩn lạc không đồng nhất, không sinh sắc tố	Trắng	11

6	QT06	Khuẩn lạc màu trắng, tròn, bề mặt khuẩn lạc xù xì, khuẩn lạc dạng hạt, khuẩn lạc không đồng nhất, không sinh sắc tố	Trắng	12
<i>Khu Bảo tồn loài và sinh cảnh Voi, Nông Sơn, Quảng Nam</i>				
7	QNbk01	Khuẩn lạc màu trắng, nhỏ, tròn, mọc yếu, bề mặt khuẩn lạc xù xì, khuẩn lạc dạng hạt, khuẩn lạc không đồng nhất, không sinh sắc tố	Trắng	19
8	QNbk02	Khuẩn lạc màu xám, bề mặt khuẩn lạc xù xì, khuẩn lạc dạng hạt, khuẩn lạc không đồng nhất, không sinh sắc tố	Xám	18
9	QNbk03	Khuẩn ty khi sinh màu trắng sữa, tròn, mọc tốt, bề mặt khuẩn lạc bông mịn, khuẩn lạc đồng nhất, không sinh sắc tố	Trắng	20
10	QNbk04	Khuẩn lạc màu trắng, tròn, có viền, bề mặt khuẩn lạc xù xì, khuẩn lạc dạng hạt, khuẩn lạc không đồng nhất, không sinh sắc tố	Trắng	16
11	QNbk05	Khuẩn lạc màu xám, bề mặt khuẩn lạc xù xì, khuẩn lạc dạng hạt, khuẩn lạc không đồng nhất, không sinh sắc tố	Xám	14
12	QNbk06	Khuẩn lạc màu trắng, nhỏ, tròn, bề mặt khuẩn lạc xù xì, khuẩn lạc dạng hạt, khuẩn lạc không đồng nhất, không sinh sắc tố	Trắng	16
13	QNbk07	Khuẩn lạc màu nâu, tròn, có viền, viền khuẩn lạc dạng sợi, bề mặt khuẩn lạc xù xì, khuẩn lạc đồng nhất, không sinh sắc tố	Nâu	12
14	QNbk08	Khuẩn lạc màu trắng, tròn, bề mặt khuẩn lạc xù xì, dạng hạt, khuẩn lạc không đồng nhất, không sinh sắc tố	Trắng	16

15	QNbK09	Khuẩn ty khi sinh màu trắng, tròn, dạng hạt, có viền, viền khuẩn lạc trong, khuẩn lạc đồng nhất, không sinh sắc tố	Trắng	18
16	QNbK10	Khuẩn ty khi sinh màu xám, bề mặt xù xì, dạng nhung, khuẩn lạc không đồng nhất, không sinh sắc tố	Xám	17
17	QNbK11	Khuẩn lạc màu trắng, tròn, bề mặt khuẩn lạc xù xì, khuẩn lạc dạng hạt, có viền, viền khuẩn lạc trong, bằng phẳng, khuẩn lạc không đồng nhất, không sinh sắc tố	Trắng	16
<i>Khu Rừng đặc dụng Bà Nà - Núi Chúa, Đà Nẵng</i>				
18	ĐNbN01	Khuẩn lạc màu trắng, tròn, bề mặt khuẩn lạc xù xì, khuẩn lạc dạng nhung, có viền, viền khuẩn lạc lồi cong, khuẩn lạc không đồng nhất, không sinh sắc tố	Trắng	18
19	ĐNbN02	Khuẩn lạc màu trắng, tròn, có viền, viền khuẩn lạc trắng đục, viền lồi lên, bề mặt khuẩn lạc bằng phẳng, khuẩn lạc đồng nhất, không sinh sắc tố	Trắng	19
20	ĐNbN03	Khuẩn lạc màu trắng, tròn, bề mặt khuẩn lạc bông mịn, có viền, viền khuẩn lạc dạng sợi, khuẩn lạc không đồng nhất, không sinh sắc tố	Trắng	18
21	ĐNbN04	Khuẩn lạc màu nâu, tròn, có viền, viền khuẩn lạc vàng, viền khuẩn lạc dạng sợi, bề mặt khuẩn lạc xù xì, khuẩn lạc không đồng nhất, không sinh sắc tố	Trắng	15
22	ĐNbN05	Khuẩn lạc màu xám, tròn, bề mặt khuẩn lạc bông mịn, không viền, khuẩn lạc không đồng nhất, không sinh sắc tố	Xám	12

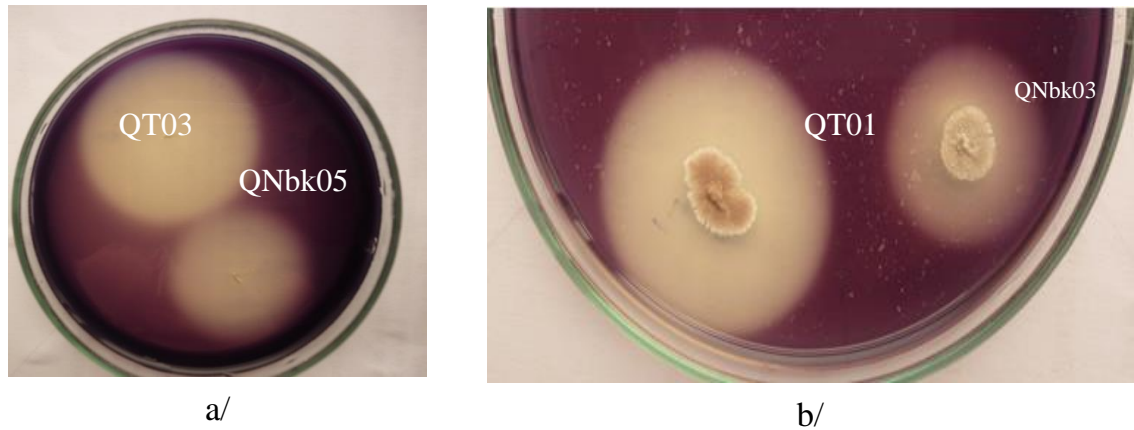
23	ĐNbn06	Khuẩn ty khi sinh màu trắng, tròn, bề mặt bông mịn, có viền, viền khuẩn lạc trong, khuẩn lạc đồng nhất, không sinh sắc tố	Trắng	17
24	ĐNbn07	Khuẩn lạc màu trắng, tròn, bề mặt khuẩn lạc xù xì, có viền, viền khuẩn lạc dạng sợi, khuẩn lạc không đồng nhất, không sinh sắc tố	Trắng	16
25	ĐNbn08	Khuẩn lạc màu trắng, tròn, bề mặt khuẩn lạc xù xì, có viền, viền khuẩn lạc dạng sợi, khuẩn lạc không đồng nhất, không sinh sắc tố	Trắng	11
26	ĐNbn09	Khuẩn lạc màu trắng, tròn, bề mặt khuẩn lạc xù xì, có viền, viền khuẩn lạc dạng sợi, khuẩn lạc không đồng nhất, không sinh sắc tố	Trắng	9
27	ĐNbn10	Khuẩn lạc màu trắng, tròn, bề mặt khuẩn lạc xù xì, có viền, viền khuẩn lạc dạng sợi, khuẩn lạc không đồng nhất, không sinh sắc tố	Trắng	7

Kết quả từ Bảng 3.18 cho thấy nhóm khuẩn lạc màu trắng chiếm số lượng lớn 22/27 chủng chiếm tỉ lệ 81,48 %, đường kính vòng phân giải cellulase (D-d) giao động từ 7- 30 mm.

3.5. ĐỊNH DANH CHỦNG VI KHUẨN VÀ XẠ KHUẨN LỰA CHỌN TRONG MẪU ĐẤT KHU VỰC CÓ QUẦN THỂ LAN

3.5.1. Phân loại theo đặc điểm sinh học các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn lựa chọn

Từ 29 mẫu đất thu năm 2021 tại quần thể Lan ở Hướng Hóa tỉnh Quảng Trị, khu Bảo tồn loài và sinh cảnh Voi, Nông Sơn tỉnh Quảng Nam và khu rừng đặc dụng Bà Nà - Núi Chúa thành phố Đà Nẵng đã phân lập được 18 chủng vi khuẩn và 27 chủng xạ khuẩn, lựa chọn được 2 chủng vi khuẩn QT03 có vòng phân giải cellulase (D-d) là 36 mm, QNbk05 có vòng phân giải 23 mm, chủng xạ khuẩn QT01 có vòng phân giải 30 mm và QNbk03 có vòng phân giải 20 mm được trình bày trên hình 3.8

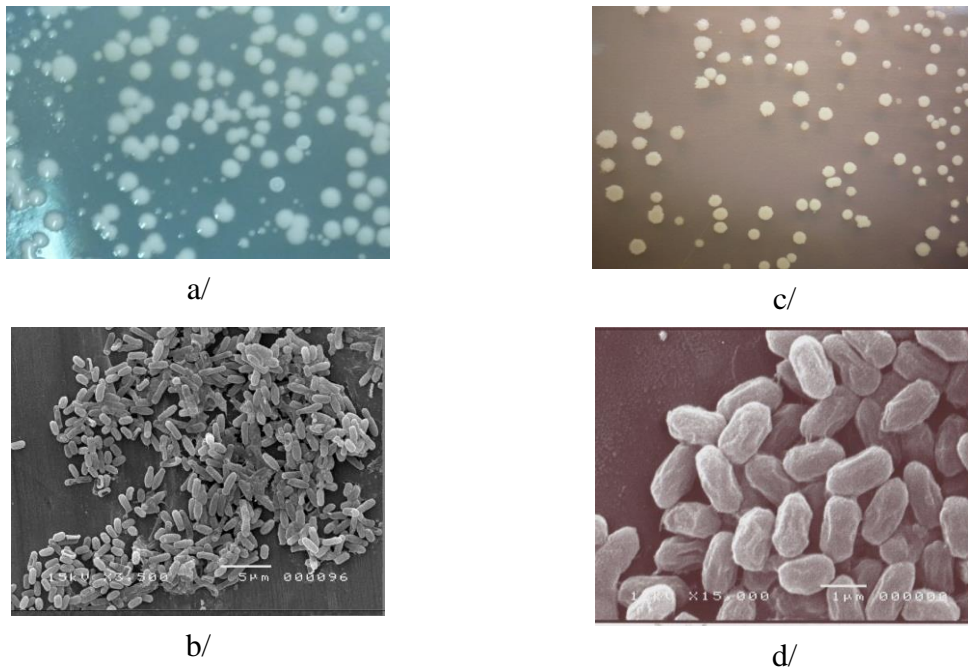


Hình 3.8. Hình ảnh vòng phân giải cellulase của các chủng tuyển chọn:

a/ Vi khuẩn; b/ Xạ khuẩn

Đặc điểm sinh học của hai chủng vi khuẩn nghiên cứu

Kết quả nghiên cứu đặc điểm sinh học của hai chủng vi khuẩn QT03 và QNb05 cho thấy, cả hai loại vi khuẩn lựa chọn đều có tế bào hình que ngắn, kích thước tế bào từ $1,0 \div 2,0 \mu\text{m}$. Hình thái tế bào của hai chủng vi khuẩn QT03 và QNb05 gần như giống nhau nhưng hình thái khuẩn lạc của chúng lại hoàn toàn khác nhau. Khuẩn lạc của chủng QT03 nhẵn trắng đục, còn khuẩn lạc của chủng QNb05 lồi màu trắng kem có viền răng cưa. Kết quả được trình bày ở hình 3.9 và bảng 3.19.



Hình 3.9. Hình ảnh khuẩn lạc và tế bào 2 chủng vi khuẩn nghiên cứu

a, b: Chủng QT03; c, d: Chủng QNb05

Bảng 3.19. Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn

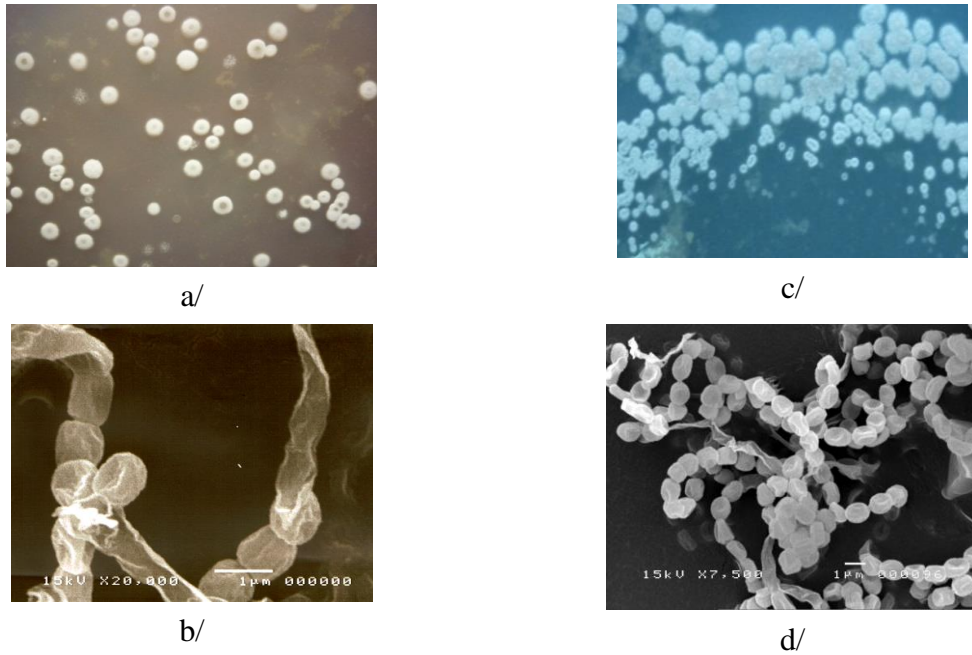
Đặc điểm	Ký hiệu chủng vi khuẩn	
	QT03	QNbk05
Màu sắc khuẩn lạc	Trắng đục	Trắng kem
Bề mặt khuẩn lạc	Lồi	Nhẵn, răng cưa
Kích thước tế bào (μm)	1 ÷ 2	1 ÷ 2
Nhuộm Gram	Gram (+)	Gram (+)
Tạo bào tử	Sinh bào tử	Sinh bào tử
Thủy phân tinh bột	+	++
Thủy phân CMC	++	++
Thủy phân cellulase (D-d)	36 mm	23 mm
Thủy phân xylan	+	+
Loãng gelatin	+	++
Nhiệt độ sinh trưởng	37 ÷ 40°C	37 ÷ 40°C
pH sinh trưởng	5 ÷ 8	5 ÷ 8

Ghi chú: ++ khả năng thủy phân tốt; + khả năng thủy phân trung bình.

Kết quả ở hình 3.9 và bảng 3.19 cho thấy cả hai chủng vi khuẩn QT03 và QNbk05 đều là vi khuẩn Gram dương, sinh bào tử, có khả năng phân giải tốt các nguồn cơ chất hữu cơ khác như tinh bột, CMC, cellulase, xylan tốt. Cả hai chủng vi khuẩn QT03 và QNbk05 đều phát triển tốt ở dải nhiệt độ từ 30°C ÷ 40°C. Điều này chứng tỏ hai chủng vi khuẩn QT03 và QNbk05 đều là những vi sinh vật ưa nhiệt. Các chủng vi khuẩn đều phát triển tốt ở pH từ 5 ÷ 8. Với các đặc điểm sinh lý của hai chủng vi khuẩn QT03 và QNbk05, có thể ứng dụng chúng để bổ sung vào chế phẩm vi sinh vật xử lý chất thải hữu cơ.

Đặc điểm sinh học của các chủng xạ khuẩn nghiên cứu

Các đặc điểm hình thái tế bào, khuẩn lạc, đặc điểm sinh lý sinh hóa và một số đặc điểm sinh học khác của 2 chủng xạ khuẩn QT01 và QNbk03 được trình bày ở hình 3.10 và bảng 3.20.



Hình 3.10. Hình ảnh khuẩn lạc và tế bào 2 chủng xạ khuẩn nghiên cứu
a, b: Chủng QT01; c, d: Chủng QNbk03

Kết quả từ hình 3.10 và bảng 3.20 cho thấy các chủng xạ khuẩn đều có khả năng thủy phân mạnh nguồn hữu cơ là cellulose, CMC, xylan và làm loãng gelatin. Các chủng xạ khuẩn nhiệt độ thích hợp từ $35 \div 60^{\circ}\text{C}$, pH thích hợp trong khoảng $6 \div 7,5$. Như vậy, các chủng xạ khuẩn này phù hợp để bổ sung vào chế phẩm vi sinh vật phân giải cellulose [3]. Dựa vào các đặc điểm hình thái, sinh lý của hai chủng xạ khuẩn, theo khóa phân loại của Shirling có thể sơ bộ xếp các chủng vào giống *Streptomyces*.

Bảng 3.20. Đặc điểm sinh học của ba chủng xạ khuẩn

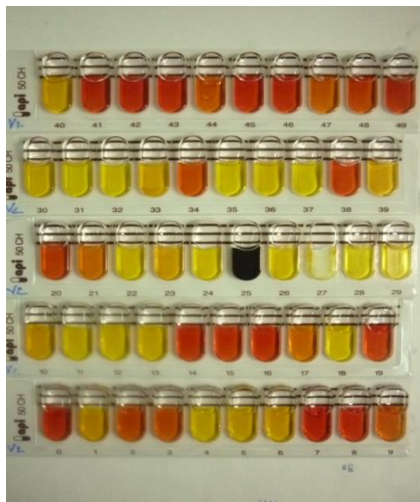
Đặc điểm	Ký hiệu chủng xạ khuẩn	
	QT01	QNbk03
Màu khuẩn ty khí sinh	Trắng xám	Trắng sữa
Màu khuẩn ty cơ chất	Không	Không
Sắc tố tan	Không	Không
Hình thái cuống sinh bào tử	Thẳng hơi lượn, hơi xoắn	Thẳng hơi lượn, hơi xoắn
Bề mặt bào tử	Nhẵn	Nhẵn
Pepton hóa sữa	+	+
Làm loãng gelatin	+	+
Thủy phân CMC	++	++
Thủy phân cellulose (D-d)	30 mm	20 mm
Thủy phân xylan	+	+

Đặc điểm	Ký hiệu chủng xạ khuẩn	
	QT01	QNbk03
Nhiệt độ thích hợp	35 ÷ 60°C	35 ÷ 60°C
pH thích hợp	6 ÷ 7,5	6 ÷ 7,5

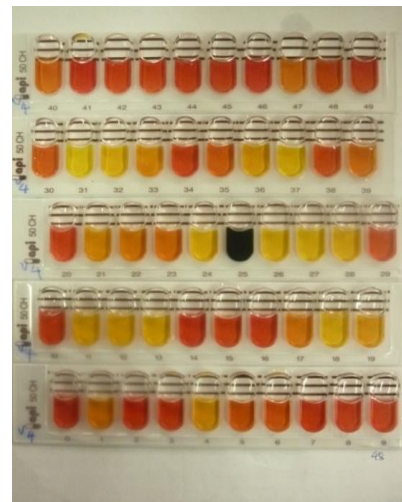
Ghi chú: ++ khả năng thủy phân tốt; + khả năng thủy phân trung bình.

3.5.2. Phân loại theo khả năng sử dụng Kit chuẩn hóa sinh của hai chủng vi khuẩn lựa chọn

Kit chuẩn sinh hóa API 50 CHB dùng để phân loại vi khuẩn Gram (+) thuộc các giống vi khuẩn *Bacillus* tương đối đặc hiệu, Kết quả khả năng sử dụng cơ chất của 2 chủng QT03 và QNbk05 thể hiện ở hình 3.9 và bảng 3.21.



a/



b/

Hình 3.11. Ảnh sử dụng Kit chuẩn CHB của chủng vi khuẩn sau 48 giờ

a/ Chủng QT03; b/ Chủng QNbk05

Bảng 3.21. Khả năng sử dụng cơ chất theo Kit API 50 CHB của chủng QT03 và QNbk05 so sánh với loài trong bảng Index của Kit

STT	Cơ chất	So sánh chủng QT03 với chủng chuẩn			So sánh chủng QNbk05 với chủng chuẩn		
		24 h	48 h	<i>B. megaterium</i>	24 h	48 h	<i>B. subtilis</i>
0	Control	-	-	-	-	-	-
1	Glycerol	+	+	+	+	+	+
2	Erythritol	-	-	-	-	-	-

3	D-Arabinoza	+	+	+	-	-	-
4	L- Arabinoza	+	+	+	+	+	+
5	Riboza	+	+	+	+	+	+
6	D-Xyloza	+	+	+	+	+	+
7	L-Xyloza	-	-	-	-	-	-
8	Adonitol	-	-	-	-	-	-
9	β Methyl-xylosit	-	-	-	-	-	-
10	Galactoza	\pm	+	+	-	-	-
11	D-Glucoza	+	+	+	+	+	+
12	D-Fructoza	+	+	+	+	+	+
13	D-Mannoza	+	+	+	+	+	+
14	L-Sorboza	-	-	-	-	-	-
15	Rhamnoza	-	-	-	-	-	-
16	Dulcitol	-	-	-	-	-	-
17	Inositol	+	+	+	+	+	+
18	Mannitol	+	+	+	+	+	+
19	Sorbitol	+	+	+	+	+	+
20	α Methyl-D-mannosit	-	-	-	-	\pm	\pm
21	α Methyl-D-glucosit	+	+	+	+	+	+
22	N Acetyl glucosamin	+	+	+	+	+	+
23	Amygdalin	+	+	+	+	+	+
24	Arbutin	+	+	+	+	+	+
25	Esculin	+	+	+	+	+	+
26	Salicin	+	+	+	+	+	+
27	Cellobioza	+	+	+	+	+	+
28	Maltoza	+	+	+	+	+	+
29	Lactoza	+	+	+	-	-	-

30	Melibioza	-	±	-	-	-	-
31	Saccaroza	+	+	+	+	+	+
32	Trehaloza	+	+	+	+	+	+
33	Inulin	-	-	-	+	+	+
34	Melezitoza	-	-	-	-	-	-
35	D-Raffinoza	+	+	+	+	+	+
36	Amidon	+	+	+	+	+	+
37	Glycogen	+	+	+	+	+	+
38	Xylitol	-	-	-	-	-	-
39	β Gentiobioza	+	+	+	+	+	+
40	D-Turanoza	-	-	-	+	+	+
41	D-Lyxoza	-	-	-	-	-	-
42	D-Tagatoza	-	-	-	-	-	-
43	D-Fucoza	-	-	-	-	-	-
44	L-Fucoza	-	-	-	-	-	-
45	D-Arabitol	-	-	-	-	-	-
46	L-Arabitol	-	-	-	-	-	-
47	Gluconat	-	-	-	-	±	±
48	2 ceto-gluconat	-	-	-	-	-	-
49	5 ceto-gluconat	-	-	-	-	-	-

Chú thích: -: không có phản ứng; +: có phản ứng; ±: phản ứng yếu

Đối chiếu kết quả này với API profile index, kết hợp với các đặc điểm hình thái theo khoá phân loại vi khuẩn của Bergey's, cho thấy mức độ xác định chủng vi khuẩn QT03 thuộc *Bacillus megaterium* và chủng vi khuẩn QNbk05 thuộc *Bacillus subtilis*. Mặc dù vậy, để khẳng định chính xác đến loài hai chủng vi khuẩn QT03 và QNbk05 được xác định tiếp 16S để khẳng định đến loài.

3.5.3. Phân loại theo phương pháp sinh học phân tử các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn lựa chọn

Hiện nay, bên cạnh những phương pháp định loại vi sinh vật truyền thống, các nhà khoa học còn sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để phân loại dựa trên

trình tự gen. Đối với vi khuẩn và xạ khuẩn xác định trình tự gen 16S rARN là phương pháp đang được dùng phổ biến. Gen này có mặt trong tất cả các tế bào, chứa vùng bảo thủ cao và vùng biến đổi cho phép phân biệt giữa các loài khác nhau.

Trong số 4 chủng được nghiên cứu về khả năng sinh tổng hợp hoạt tính cellulase, qua nghiên cứu sơ bộ một số đặc điểm sinh lý sinh hóa của chủng, hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào, đã xác định được 2 chủng thuộc nhóm vi khuẩn (*Bacillus* sp.) và 2 chủng thuộc nhóm xạ khuẩn (*Streptomyces* sp.). Sử dụng phương pháp phân tích trình tự gene 16S với cặp mồi 27F/1142R đoạn gen 16S ARN đặc hiệu có kích thước khoảng 1500 bp. Trình tự gen của 4 chủng sau khi giải trình tự được so sánh đối chiếu với dữ liệu nguồn gene và phân tích bằng phần mềm BLAST trên Genbank, kết quả trình bày ở hình 3.12.

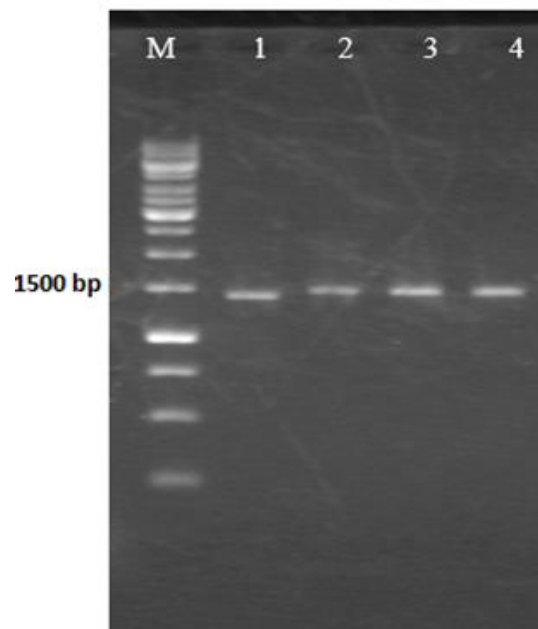
Hình 3.12. Sản phẩm PCR của 2 chủng vi khuẩn và 2 chủng xạ khuẩn
M: Maker,

1: QT03;

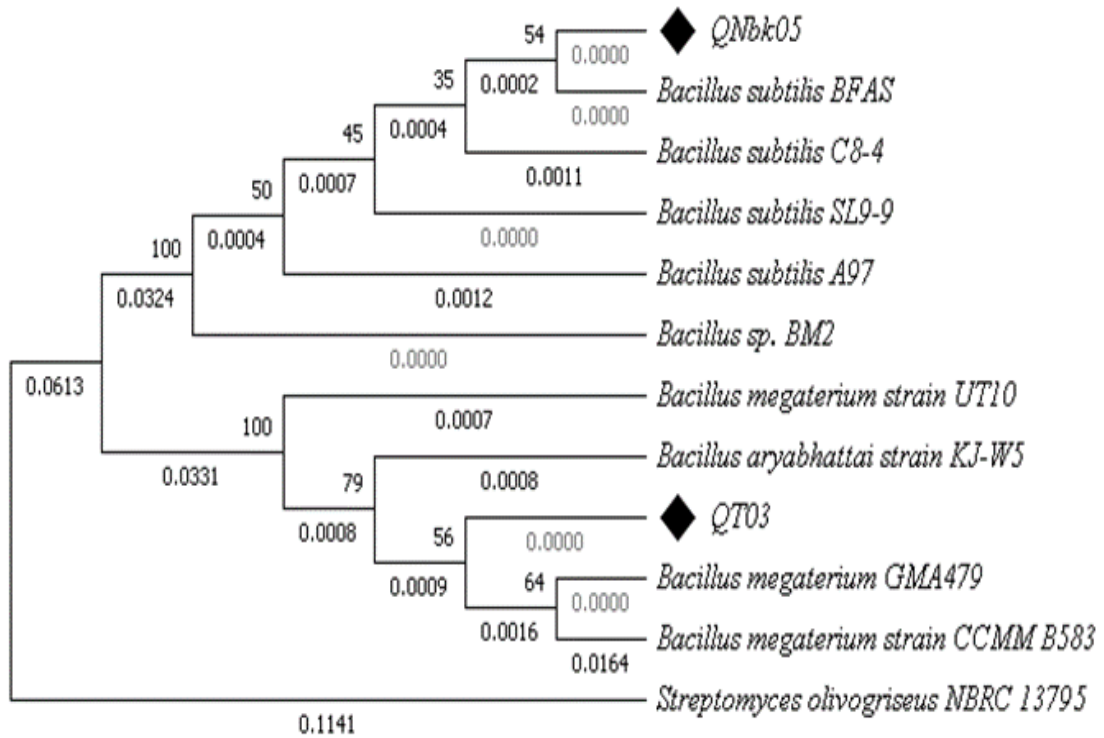
2: QNbk05;

3: QT01;

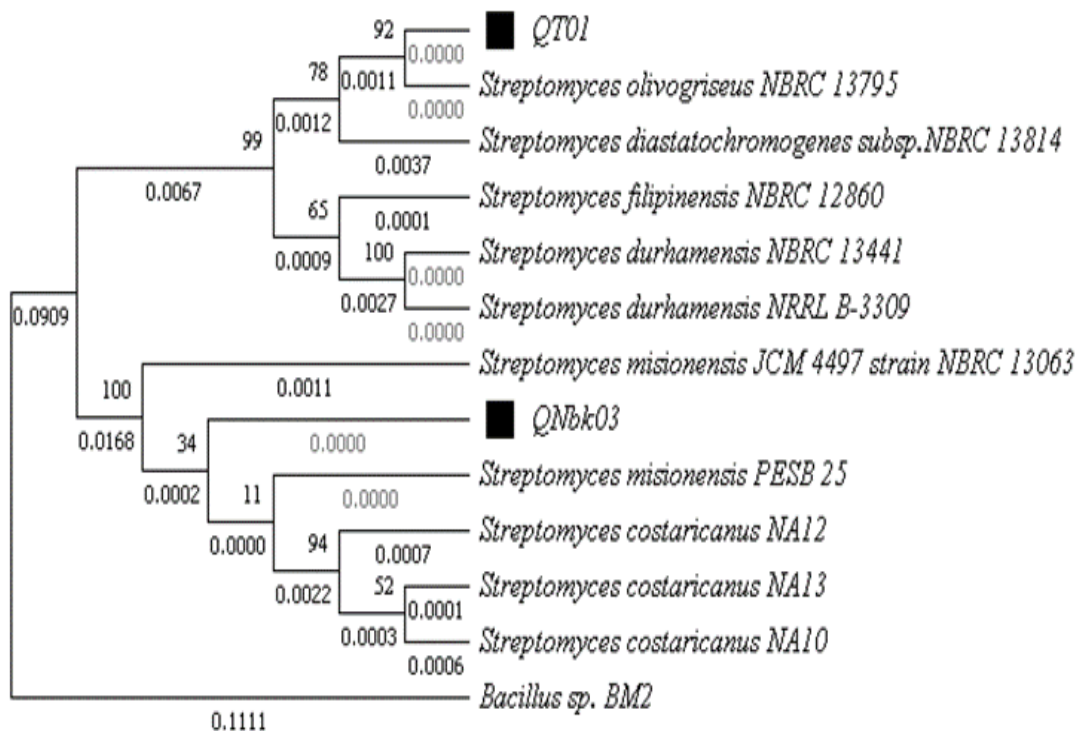
4: QNbk03;



Kết quả 2 chủng vi khuẩn QT03 và QNbk05 có độ tương đồng cao 100% với các loài lần lượt là *Bacillus megaterium* và *Bacillus subtilis*. Hai chủng xạ khuẩn QT01 và QNbk03 cũng có độ tương đồng cao 100% với các loài xạ khuẩn lần lượt là *Streptomyces olivogriseus* và *Streptomyces misionensis*. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng, so sánh và phân tích về trình tự nucleotide các chủng QT03 và QNbk05; QT01 và QNbk03 với các loài tương đồng về thành phần loài trên Genbank, kết quả trình bày ở hình 3.13 và 3.14.



Hình 3.13. Cây phát sinh chủng loại thuộc nhóm vi khuẩn



Hình 3.14. Cây phát sinh chủng loại thuộc nhóm xạ khuẩn

Kết quả chủng vi khuẩn QT03 - thuộc loài *Bacillus megaterium* được ký hiệu là *Bacillus megaterium* QT03. Chủng vi khuẩn QNbk05 thuộc loài *Bacillus subtilis*, được ký hiệu là *Bacillus subtilis* QNbk05. Chủng xạ khuẩn QT01 thuộc loài *Streptomyces olivogriseus*, được ký hiệu là *Streptomyces olivogriseus* QT01. Chủng xạ khuẩn QNbk03 thuộc loài *Streptomyces misionensis*, được ký hiệu là *Streptomyces misionensis* QNbk03. Đáng chú ý, các chủng vi khuẩn và xạ khuẩn này đều được phân lập từ đất nơi phân bố loài lan hài *Paphiopedilum appletonianum* (Gower) Rolfe, một loài lan quý, hiếm ở Việt Nam. Các chủng này có khả năng sinh tổng hợp cellulose, tạo mùn và dinh dưỡng cho Lan sinh trưởng và phát triển. Kết quả này góp phần hữu ích nhằm định hướng ứng dụng chủng trong việc tạo chế phẩm hữu ích cho các giống Lan quý cần được bảo tồn ở Việt Nam, tuy nhiên cần phải có các nghiên cứu thêm trước khi được ứng dụng vào thực tiễn.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

❖ Kết luận:

- Đã đánh giá đặc điểm 53 mẫu đất thu được khu vực có quần thể Lan: với 29 mẫu đất năm 2021 và 24 mẫu đất năm 2022.

- Đã xác định nhóm vi khuẩn hiếu khí, nấm mốc và xạ khuẩn hữu ích trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan cung cấp dữ liệu cho công tác bảo tồn Lan, các mẫu đất rất đa dạng và phong phú về thành phần và số lượng các nhóm vi sinh vật như vi khuẩn hiếu khí tổng số đạt từ $10^5 \div 10^7$ CFU/g, nấm mốc tổng số đạt từ $10^5 \div 10^6$ CFU/g, xạ khuẩn tổng số đạt từ $10^4 \div 10^6$ CFU/g.

- Đã xác định nhóm vi sinh vật có khả năng cố định nitơ tự do, phân giải cellulose, phân giải photphat và sinh tổng hợp Indole - 3 - Acetic Acid trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan: số lượng tế bào vi sinh vật cố định nitơ trong các mẫu đất khá đa dạng và phong phú, đạt trung bình từ $10^2 \div 10^4$ CFU/g, phân giải photpho, phân giải cellulose, sinh tổng hợp Indole - 3 - Acetic Acid trong các mẫu đất cũng khá đa dạng và phong phú đạt trung bình từ $10^1 \div 10^4$ CFU/g.

- Đã phân lập được 18 chủng vi khuẩn và 27 chủng xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp cellulase cao trong mẫu đất khu vực có quần thể Lan.

- Đã định danh đến loài bốn chủng vi sinh vật có khả năng sinh enzym cao bằng khóa phân loại Bergey's và trình tự các gen 16S, trong đó có 2 chủng vi khuẩn QT03 là *Bacillus megaterium* QT03 và chủng vi khuẩn QNbk05 là *Bacillus subtilis* QNbk05. 2 chủng xạ khuẩn QT01 là *Streptomyces olivogriseus* QT01 và chủng xạ khuẩn QNbk03 là *Streptomyces misionensis* QNbk03.

❖ Kiến nghị:

Tiếp tục tiến hành nghiên cứu các hoạt tính chức năng khác trên tất cả các mẫu đất thu thập năm 2021 và 2022 nhằm đưa ra bộ cơ sở dữ liệu đầy đủ và chuyên sâu giúp ích cho công tác bảo tồn loài Lan quý hiếm.

CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN

1. Nguyễn Thế Trang, Hoa Thị Minh Tú, Phan Thị Tuyết Minh, Nguyễn Văn Sinh, Bùi Văn Thanh, Nguyễn Thị Vân Anh, Lê Anh Thư (2022) Xác định các nhóm vi sinh vật trong đất rừng phân bố lan hài đài cuốn (*Paphiopedilum appletonianum* (Gower) Rolfe) và các chủng có hoạt tính cellulase cao. *Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2022*. NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, tr. 1087-1093. ISBN: 978-604-357-052-6.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Viết Cường, Bùi Văn Hật, Lê Thị Bích Lam, Nguyễn Xuân Huy, Phạm Quang Hà, Biền Văn Minh, 2018, *Vi sinh vật học môi trường*. NXB Bách Khoa, Hà Nội.
2. Nghị định số 06/2019/NĐ-CP ngày 22/01/2019 của Chính phủ về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm và thực thi công ước về buôn bán quốc tế các loài động vật, thực vật hoang dã nguy cấp.
3. Lương Đức Phẩm, 2004, Công nghệ vi sinh vật, NXB Nông nghiệp
4. Nguyễn Tiến Bản và những người khác, 2007, *Sách đỏ Việt Nam - Phần II: Thực vật*. NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội, tr. 457-458
5. Biền Văn Minh và những người khác, 2006, *Vi sinh vật học*. NXB Đại học Huế.
6. Anamika Dubey, Muneer Ahmad Malla, Farhat Khan, 2019, Soil microbiome: A key player for conservation of soil health under changing climate, *Biodiversity and Conservation*, pp.123-127
7. Reynaldo Fraga, Hilda Rodríguez, Reynaldo Fraga., 1999, Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17, pp. 319-339.
8. Vermani, M. V., S.M. Kelkar and M.Y.Kamat, 1997, Studies in polysaccharide production and growth of *Azotobacter vinelandii* MTCC 2459, a plant rhizosphere isolate, *Letters in applied Microbiology*, 24, pp. 379-383.
9. Vivek Kuman, Rishi Kumar Behl and Narula, 2001, Establishment of phosphat solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions. *Microbiol. Res.* 156, pp. 87-93.
10. Chan Y.,W.L. Barraquio and R. Knowles, 1994, “N₂-fixing *Pseudomonas spp.* and related soil bacteria”, *FEMS Microbiology Reviews*, 13, pp. 95-118.
11. Elizabeth Pérez. Miguel Sulbarán. Mari´a M. Ball. Luis Andre´s Yarza´bal, 2007, Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biology & Biochemistry*, 39, pp. 2905-2914.

12. F. Gil-Sotres, C. Trasar-Cepeda, M.C. Leiro´s, S. Seoane, 2005, Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties, *Soil Biol. Biochem*, 37, pp. 877-887.
13. Fabricio Cassa´na, Diego Perriga, Verónica Sgroya, Oscar Masciarellia, Claudio Pennab, Virginia Lunaa, 2009, “*Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.)”, *European Journal of Soil Biology*, 45, pp. 28-35.
14. Gorbov S. N. and Bezuglova O.S., 2014, Specific features of organic matter in urban soils of Rostov-on-Don. *Eur. Soil Science*, 47(8), pp. 792-800.
15. Andres D. Naiman, Alejandra Latro´nico, Ine´s E. Garcí’a de Salamone, 2009, “Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact on the production and culturable rhizosphere microflora”, *European Journal of Soil Biology*, 45, pp. 44-51.
16. Baldani .D and Johanna Dobereiner, 1979, “Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp.”, *Soil Biol Biochem*, 26, pp. 433-439.
17. Bashan Y, Holgui G, 1997, “*Azospirillum* - plat relationships: environmental and physiological advances (1990-1996)”, *Can. J. Microbiol*, pp. 103-121.
18. Vũ Thị Hạnh Nguyên, Nguyễn Thị Thu, Đinh Thị Mỹ Linh, Nguyễn Thế Trang, Dam Phavanny, Keo Phommavong, Sonepaseuth Boudsabapaseuh, Trần Đình Mán, Lê Gia Hy, 2018, Xác định các nhóm vi sinh vật và tuyển chọn chủng có hoạt tính kháng nấm gây bệnh thực vật trong đất trồng cao su, lúa tại Lào. *Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2018*. NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội, tr. 1085-1090.
19. Nguyễn Thị Thu, Lê Gia Hy, Trần Đình Mán, Nguyễn Thế Trang, Vũ Thị Hạnh Nguyên, Lê Đồng Tấn, Keo Phommavong, Sonepaseuth Boudsabapaseuh, Dam Phavanny, 2018, Tuyển chọn vi khuẩn cố định đạm, phân giải lân từ đất trồng lúa và cao su tại hai tỉnh Bolikhamsai và Luang Prabang của Lào. *Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2018*. NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội, tr. 872-877.
20. Phạm Bích Hiền và Phạm Văn Toàn, 2003, Nghiên cứu tuyển chọn một số chủng *Azotobacter* đa hoạt tính sinh học sử dụng cho sản xuất phân bón vi sinh

- vật chức năng. *Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*. NXB Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội, tr. 266-270.
21. Phạm Thị Ngọc Lan, Trương Văn Lung, 1999, Bước đầu nghiên cứu vi khuẩn *Azotobacter* trong đất gò đồi tỉnh Thừa Thiên - Huế, *Báo cáo khoa học. Chương trình nghiên cứu Công nghệ Sinh học quốc gia KHCN - 02 - Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường - Hội Công nghệ Sinh học Việt Nam*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 406-411.
 22. Phạm Thị Ngọc Lan, Võ Thị Mai Hương, 2004), “Góp phần nghiên cứu vi khuẩn cố định nitơ sống tự do trong đất hoa màu ở Thừa Thiên - Huế. *Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống. Báo cáo khoa học. Hội nghị toàn quốc*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 803-806.
 23. Nguyễn Thị Phương Chi, Phạm Thanh Hà, 1999, Phối hợp các chủng vi khuẩn cố định nitơ và vi khuẩn hòa tan photphate để nâng cao hiệu quả phân vi sinh vật. *Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 428-433.
 24. Đặng Thị Thùy Dương, Nguyễn Văn Hiếu, Nguyễn Phương Huệ, Lê Như Kiều, Lê Thị Thanh Thủy, Trần Quang Minh, Phí Quyết Tiến, 2013, Tuyển chọn và nghiên cứu đặc điểm các chủng vi khuẩn vùng rễ có khả năng kháng nấm và sinh indole-3-acetic acid cao. *Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2013*, 2. NXB Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội, tr. 138-142.
 25. Nguyễn Ngọc Quỳnh, Vũ Thúy Nga, Lương Hữu Thành, 2019, Nghiên cứu vi sinh vật chuyên hóa hydratcacbon trong đất trồng ngô tại Hà Nội. *Tạp chí Khoa học Công nghệ nông nghiệp Việt Nam*, 9(106), tr. 88.
 26. Hà Đăng Khoa, 2009, *Ảnh hưởng của vi khuẩn cố định đạm và vi khuẩn hòa tan lân lên năng suất lúa (oryza sativa L.) trồng trên đất phèn ở huyện Tam Nông tỉnh Đồng Tháp. Luận văn Thạc sĩ Sinh thái học*, Trường Đại học Cần Thơ.
 27. Lê Tấn Thái Bình, 2011, *Hiệu quả của vi khuẩn cố định đạm và vi khuẩn hòa tan lân lên cây lúa MTL480 trên vùng đất nhiễm phèn và mặn ở Trần Đề, Sóc Trăng. Luận văn Thạc sĩ Sinh thái học*, Trường Đại học Cần Thơ.
 28. Nguyễn Hữu Hiệp, Phạm Thị Khánh Vân, Trần Văn Chiêu, Đào Thanh Hoàng và Nguyễn Khắc Minh Loan, 2005, Phân lập và nhận diện các dòng vi khuẩn *Azospirillum* bằng kỹ thuật PCR. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 4, 119-126.

29. Trương Quốc Anh, 2011, *Hiệu quả vi khuẩn cố định đạm và hòa tan lân trong canh tác lúa trên đất nhiễm phèn mặn tại Kiên Lương, Kiên Giang. Luận văn Thạc sĩ Sinh thái học*, Trường Đại học Cần Thơ.
30. Nguyễn Thị Thúy Nga, Phạm Quang Nam, Lê Xuân Phúc, Phạm Quang Thu, Nguyễn Minh Chi, 2015, Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn phân giải xenlulo sản xuất phân hữu cơ sinh học, *Tạp chí Khoa học lâm nghiệp*. tr.36-42
31. Võ Văn Phước Quê, Cao Ngọc Diệp, 2011, Phân lập và nhận diện vi khuẩn phân giải cellulose, *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, tr. 177-184.
32. Nguyễn Liều Ba, Hoàng Thị Phương Anh, Phạm Thu Hiền, Lê Thị Hồng Hậu, 2020, Phân lập các chủng xạ khuẩn có khả năng phân giải cellulose, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, tr. 65-70.
33. Nguyễn Xuân Thành, Nguyễn Đường, Hoàng Hải, Vũ Thị Hoàn, 2007, *Giáo trình Sinh học đất*, Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội.
34. Võ Đình Quang, 1999, *Trạng thái lân trong đất Việt Nam. Kết quả nghiên cứu khoa học*, 3, Viện Nông hóa. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
35. Phạm Thị Miên, Phan Minh Thụ, 2021, Vi sinh vật chuyển hóa lân khó tan trong đất và tiềm năng áp dụng trong nông nghiệp, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, tr. 1028-1038.
36. Nguyễn Thị Thu Liên và cộng sự, 2020, *Sàng lọc khả năng sinh chất điều hòa sinh trưởng IAA ở một số chủng vi khuẩn lam dạng sợi phân lập ở Thừa Thiên Huế*, Hội nghị Công nghệ sinh học Toàn quốc 2020. NXB Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội, tr. 138-142.
37. Trần Bảo Trâm và cộng sự, 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 ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 33(2S), tr. 219-226.
38. TCVN 7538 – 2: 2005: Chất lượng đất – Lấy mẫu – Phần 2: Hướng dẫn kỹ thuật lấy mẫu.
39. TCVN 6857:2001: Chất lượng đất - Phương pháp đơn giản để mô tả đất.
40. TCVN 4884-1:2015: Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Phương pháp định lượng vi sinh vật – Phần 1: Đếm khuẩn lạc ở 30 độ C bằng kỹ thuật đổ đĩa.

41. TCVN 6507-1:2019: Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật- Phần 1: Các nguyên tắc chung để chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân.
41. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty, 2012, *Vi sinh vật học*, NXB Giáo dục Việt Nam.
42. Nguyễn Lâm Dũng, Đoàn Xuân Mượu, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Trạch, Phạm Văn Ty, 1972-1978, *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật*, 1; 2; 3, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
43. Hoàng Kim Cơ (chủ biên), Trần Hữu Uyển, Lương Đức Phẩm, Lý Kim Bảng, Dương Đức Hồng, 2000, *Kỹ thuật môi trường*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
44. Lê Trần Bình, Phan Văn Chi, Nông Văn Hải, Trương Nam Hải, Lê Quang Huân, 2003, *Áp dụng các kỹ thuật phân tử trong nghiên cứu sinh vật Việt Nam*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
45. TCVN 6168:2002: Chế Phẩm vi sinh vật phân giải xenlulo.
46. TCVN 6167:1996: Phân bón vi sinh vật phân giải hợp chất photpho khó tan.
47. TCVN 6166: 2002: Phân bón vi sinh vật cố định nito.
48. TCVN 10784: 2015: Vi sinh vật – Xác định khả năng sinh tổng hợp Axit 3 – Indol – Acetic (IAA)