

**NGUYỄN THỊ KIM TIÊN**

**NGÀNH SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

**2026**

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

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

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**NGUYỄN THỊ KIM TIÊN**

**PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI KHUẨN TÍA  
QUANG HỢP CÓ KHẢ NĂNG CỐ ĐỊNH NITƠ PHÂN TỬ VÀ  
SẢN SINH CHẤT KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG IAA LÀM  
CƠ SỞ TẠO CHẾ PHẨM PHÂN VI SINH CHO LÚA**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

*Hà Nội - 2026*

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

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

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**NGUYỄN THỊ KIM TIÊN**

**PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI KHUẨN TÍA  
QUANG HỢP CÓ KHẢ NĂNG CỐ ĐỊNH NITƠ PHÂN TỬ VÀ SẢN  
SINH CHẤT KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG IAA LÀM CƠ SỞ TẠO  
CHẾ PHẨM PHÂN VI SINH CHO LÚA**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Ngành: Sinh học thực nghiệm**

**Mã số: 8420114**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:**

1. TS. Đỗ Thị Liên
2. PGS.TS. Lê Thị Nhi Công

***Hà Nội - 2026***

**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 chịu trách nhiệm trước phát luật.*

**Học viên****Nguyễn Thị Kim Tiên**

## LỜI CẢM ƠN

Với đề tài “*Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn tía quang hợp có khả năng cố định nitơ phân tử và sản sinh chất kích thích sinh trưởng IAA làm cơ sở tạo chế phẩm phân vi sinh cho lúa*” để hoàn thành được, không chỉ là sự nỗ lực cá nhân tôi mà là cả các tập thể đã tạo điều kiện, giúp đỡ, hướng dẫn tôi.

Đầu tiên, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc nhất đến TS. Đỗ Thị Liên và PGS.TS. Lê Thị Nhi Công, đã tận tình theo sát, định hướng, chỉ dẫn ngay từ những ngày đầu đến việc góp ý, điều chỉnh và hoàn thiện luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn các cán bộ và các bạn sinh viên tại phòng Công nghệ sinh học môi trường, Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện, hỗ trợ tôi trong quá trình nghiên cứu, đặc biệt là trong việc sử dụng trang thiết bị, thực hiện thí nghiệm và xử lý số liệu phục vụ cho đề tài.

Đặc biệt, tôi trân trọng cảm ơn đến Ban Giám đốc và quý thầy cô giáo giảng dạy tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hết lòng giảng dạy và chia sẻ kiến thức, giúp tôi hoàn thành chương trình học theo đúng tiến độ và yêu cầu đề ra.

Và không thể không kể đến là lời cảm ơn đến gia đình, các đồng nghiệp và ban lãnh đạo công ty nơi tôi đang công tác đã luôn khích lệ tôi trong suốt thời gian học tập.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn đến Ban chủ nhiệm và các thành viên đề tài “Nghiên cứu tạo chế phẩm phân vi sinh cho lúa từ các chủng vi khuẩn tía quang hợp có khả năng cố định nitơ phân tử, phân giải photphat khó tiêu và sản sinh các chất kích thích sinh học IAA, ALA” Mã số: 07/2022/TN do TS. Đỗ Thị Liên làm chủ nhiệm, đã hỗ trợ kinh phí, cung cấp nguyên vật liệu, điều kiện cần thiết và cho phép tôi khai thác kết quả nghiên cứu để phục vụ cho luận văn.

Dù đã nỗ lực hết mình, song vẫn không tránh khỏi những thiếu sót. Kính mong nhận được những đánh giá, chỉ bảo từ quý thầy, cô và các nhà khoa học để tôi không ngừng hoàn thiện nghiên cứu trong thời gian tới.

Hà Nội, ngày 15 tháng 06 năm 2026

**Học viên**

**Nguyễn Thị Kim Tiên**

## MỤC LỤC

<b>LỜI CAM ĐOAN .....</b>	<b>i</b>
<b>LỜI CẢM ƠN .....</b>	<b>ii</b>
<b>MỤC LỤC .....</b>	<b>iii</b>
<b>DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT .....</b>	<b>vii</b>
<b>DANH MỤC CÁC BẢNG .....</b>	<b>viii</b>
<b>MỞ ĐẦU .....</b>	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VÀ SẢN XUẤT PHÂN BÓN VI SINH .....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Tổng quan về phân bón vi sinh .....	3
1.1.2. Phân VSV cố định đạm .....	4
1.1.2.1. Tổng quan quá trình cố định nitơ .....	4
1.1.2.2. Quá trình cố định nitơ phân tử .....	5
1.1.2.3. Các chủng VSV có khả năng cố định nitơ phân tử .....	6
1.1.3. Tổng hợp hoóc-môn thực vật axit indole-3-axetic (IAA) .....	7
1.1.3.1. Tổng quan về hoóc-môn thực vật axit indole-3-axetic (IAA) .....	7
1.1.3.2. Vai trò của axit indole-3-axetic (IAA) có nguồn gốc vi sinh vật đối với sinh trưởng và phát triển của cây trồng .....	8
1.1.3.3. Con đường sinh tổng hợp IAA ở vi sinh vật .....	8
<b>1.2. TỔNG QUAN VỀ VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP .....</b>	<b>11</b>
1.2.1. Giới thiệu về vi khuẩn tía quang hợp .....	11
1.2.2. Đặc điểm hình thái và phân loại vi khuẩn tía quang hợp .....	11
1.2.3. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của VKTQH .....	12
1.2.3.1. Quá trình quang hợp .....	12
1.2.3.2. Trao đổi chất và dinh dưỡng Cacbon .....	12
1.2.3.3. Cố định nitơ phân tử .....	13
1.2.3.4. Khả năng sản sinh chất kích thích sinh trưởng (IAA) .....	14
1.2.4. Ứng dụng của VKTQH làm phân bón sinh học .....	15
1.2.4.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới .....	15
1.2.4.2. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam .....	17
1.2.5. Một số ứng dụng khác của VKTQH .....	17
<b>CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>20</b>
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu .....	20

2.1.2. Hóa chất, môi trường nghiên cứu.....	20
2.1.3. Thiết bị máy móc .....	22
<b>2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>23</b>
2.2.1. Thu thập mẫu chứa các chủng VKTQH.....	23
2.2.2. Phân lập, nuôi cấy VKTQH .....	23
2.2.2.1. Làm giàu VKTQH.....	23
2.2.2.2. Phân lập VKTQH không lưu huỳnh.....	23
2.2.2.3. Nuôi cấy VKTQH .....	24
2.2.3. Đánh giá khả năng sinh trưởng và hình thái tế bào của VKTQH.....	24
2.2.4. Tuyển chọn chủng VKTQH có khả năng cố định nitơ phân tử .....	24
2.2.5. Tuyển chọn chủng VKTQH có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng IAA .....	25
2.2.6. Khảo sát các đặc điểm sinh học của các chủng VKTQH chọn lựa.....	25
2.2.6.1. Xác định mật độ tế bào VKTQH .....	25
2.2.6.2. Phương pháp nghiên cứu hệ sắc tố của VKTQH.....	25
2.2.6.3. Phương pháp đánh giá khả năng sử dụng nguồn cacbon và chất cho điện tử khác nhau của VKTQH.....	26
2.2.6.4. Phương pháp tách chiết DNA genome của VKTQH.....	26
2.2.6.5. Kỹ thuật PCR .....	27
2.2.6.6. Điện di DNA trên gel Agarose.....	27
2.2.6.7. Giải trình tự DNA .....	28
2.2.7. Đánh giá ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng, cố định nitơ phân tử và sản sinh chất kích thích IAA của VKTQH .....	28
2.2.7.1. Ảnh hưởng của pH .....	28
2.2.7.2. Ảnh hưởng của nồng độ muối.....	28
2.2.7.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ .....	28
2.2.8. Phân tích thống kê.....	29
<b>CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1. Làm giàu và phân lập các chủng VKTQH .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2. Tuyển chọn chủng VKTQH có khả năng cố định nitơ phân tử.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3. Tuyển chọn chủng VKTQH có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng IAA.....</b>	<b>35</b>
<b>3.4. Đặc điểm sinh học cơ bản của các chủng VKTQH lựa chọn .....</b>	<b>37</b>
3.4.1. Đặc điểm hình thái .....	37
3.4.2. Thành phần sắc tố quang hợp.....	39
3.4.3. Khả năng sử dụng nguồn cacbon và chất cho điện tử.....	39

3.4.4. Phân tích trình tự gen 16S rDNA.....	41
<b>3.5. Đánh giá ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng cố định nitơ phân tử và khả năng sinh trưởng, sản sinh chất kích thích IAA của VKTQH.</b>	<b>42</b>
3.5.1. Ảnh hưởng của pH đến khả năng cố định nitơ phân tử của VKTQH.....	42
3.5.2. Ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng và sản sinh chất kích thích IAA của VKTQH .....	44
3.5.3. Ảnh hưởng của nồng độ muối đến khả năng cố định nitơ phân tử của VKTQH .....	47
3.5.4. Ảnh hưởng của nồng độ muối đến khả năng sinh trưởng và sản sinh chất kích thích IAA của VKTQH .....	49
3.5.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng cố định nitơ phân tử và sinh trưởng của VKTQH.....	52
3.5.6. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng, sản sinh chất kích thích IAA của VKTQH. ....	55
<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>58</b>
<b>1. KẾT LUẬN .....</b>	<b>58</b>
<b>2. KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>58</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>59</b>
<b>DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ.....</b>	<b>70</b>
<b>PHỤ LỤC .....</b>	<b>I</b>
Phụ lục 1: Hàm lượng $\text{NH}_4^+$ sinh ra trong dịch nuôi (mg/L) ở các pH khác nhau của chủng Y <sub>11</sub> và GT <sub>10</sub> trong điều kiện vi hiếu khí sáng nhaule.....	I
Phụ lục 2: Khả năng sinh trưởng của chủng Y <sub>11</sub> và GT <sub>10</sub> ở các pH khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng.....	I
Phụ lục 3: Hàm lượng IAA sản sinh ra trong dịch nuôi ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ở các pH khác nhau của chủng Y <sub>11</sub> và GT <sub>10</sub> trong điều kiện vi hiếu khí sáng .....	II
Phụ lục 4: Hàm lượng $\text{NH}_4^+$ sinh ra trong dịch nuôi (mg/L) ở các nồng độ muối khác nhau của chủng Y <sub>11</sub> và GT <sub>10</sub> trong điều kiện vi hiếu khí sáng.....	II
Phụ lục 5: Khả năng sinh trưởng của chủng Y <sub>11</sub> và GT <sub>10</sub> ở các nồng độ muối khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng .....	III
Phụ lục 6: Hàm lượng IAA sản sinh ra trong dịch nuôi ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) của chủng Y <sub>11</sub> và GT <sub>10</sub> ở các nồng độ muối khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng .....	III
Phụ lục 7: Hàm lượng $\text{NH}_4^+$ sinh ra trong dịch nuôi (mg/L) ở các nhiệt độ khác nhau của chủng Y <sub>11</sub> và GT <sub>10</sub> trong điều kiện vi hiếu khí sáng .....	III
Phụ lục 8: Khả năng sinh trưởng của chủng Y <sub>11</sub> và GT <sub>10</sub> ở các nhiệt độ khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng .....	IV

Phụ lục 9: Hàm lượng IAA sản sinh ra trong dịch nuôi ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ở các nhiệt độ khác nhau của chủng  $Y_{11}$  và  $GT_{10}$  trong điều kiện vi hiếu khí sáng..... IV

Phụ lục 10: Khả năng sinh trưởng của chủng  $Y_{11}$  và  $GT_{10}$  ở các nhiệt độ khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng (môi trường GA)..... IV

Phụ lục 11: Trình tự gene 16S rDNA của 2 chủng vi khuẩn tía quang hợp tuyển chọn .....V

**DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT**

<b>Chữ viết tắt</b>	<b>Giải nghĩa Tiếng Anh</b>	<b>Giải nghĩa Tiếng Việt</b>
ATP	adenosine triphosphate	
Bchl <sub>a</sub>	bacteriochlorophyll a	
Bchl <sub>b</sub>	bacteriochlorophyll b	
COD	Chemical Oxygen Demand	Nhu cầu oxy hóa học
DNA	Deoxyribonucleic acid	
IAA	axit indole-3-acetic acid	
IAM	indole-3-acetamide	
IAN	indole-3-acetonitrile	
IPyA	indole-3-pyruvic axit	
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi trùng hợp
rpm	Revolutions Per Minute	Số vòng quay trong 1 phút
TAM	Tryptamine	
VKTQH		Vi khuẩn tía quang hợp
VSV		Vi sinh vật

## DANH MỤC CÁC BẢNG

<b>Bảng 2.1.</b> Thành phần môi trường DSMZ-27 (cho 1 lít).....	<b>20</b>
<b>Bảng 2.2.</b> Thành phần môi trường không chứa nguồn nitơ (cho 1 lít).....	<b>21</b>
<b>Bảng 2.3.</b> Thành phần môi trường GA (cho 1 lít) .....	<b>22</b>
<b>Bảng 3.1.</b> Đặc điểm hình thái các chủng VKTQH sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường DSMZ-27 thạch.....	<b>31</b>
<b>Bảng 3.2.</b> Khả năng sản sinh $\text{NH}_4^+$ (mg/L) của 24 chủng VKTQH trong môi trường không chứa nguồn nitơ ở điều kiện vi hiếu khí sáng .....	<b>33</b>
<b>Bảng 3.3.</b> Khả năng sản sinh IAA và sinh trưởng của 24 chủng VKTQH ở điều kiện vi hiếu khí sáng .....	<b>36</b>
<b>Bảng 3.4.</b> So sánh khả năng sử dụng nguồn cacbon và chất cho điện tử của các chủng GT <sub>10</sub> và Y <sub>11</sub> với <i>Rhodobacter capsulatus</i> và <i>Rhodopseudomonas palustris</i> (Girija và cộng sự, 2010; Imhoff và Trüper, 1989) .....	<b>40</b>

## DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

<b>Hình 1.1.</b> Các con đường để tổng hợp IAA trong vi khuẩn .....	<b>9</b>
<b>Hình 1.2.</b> Những lợi ích của VKTQH lên hệ sinh thái lúa khi được bón vào đất hoặc phun lên lá .....	<b>15</b>
<b>Hình 3.1.</b> Hình ảnh một số VKTQH làm giàu từ mẫu đất và nước sau 7 ngày .....	<b>30</b>
<b>Hình 3.2.</b> Hình dạng khuẩn lạc (A), hình dạng tế bào dưới kính hiển vi điện tử SEM (B) của chủng GT <sub>10</sub> .....	<b>38</b>
<b>Hình 3.3.</b> Hình dạng khuẩn lạc (A), hình dạng tế bào dưới kính hiển vi điện tử SEM (B) của chủng Y <sub>11</sub> .....	<b>38</b>
<b>Hình 3.4.</b> Phổ hấp thụ của các chủng GT <sub>10</sub> và Y <sub>11</sub> .....	<b>39</b>
<b>Hình 3.5.</b> Cây phát sinh chủng loại của hai chủng VKTQH GT <sub>10</sub> , Y <sub>11</sub> dựa trên trình tự nucleotide gen 16S rDNA.....	<b>42</b>
<b>Hình 3.6.</b> Thí nghiệm đánh giá khả năng sản sinh NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> bằng thuốc thử Nessler của 2 chủng Y <sub>11</sub> và GT <sub>10</sub> ở các pH khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng .....	<b>43</b>
<b>Hình 3.7.</b> Hàm lượng NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> sinh ra trong dịch nuôi (mg/L) ở các pH khác nhau của chủng Y <sub>11</sub> và GT <sub>10</sub> trong điều kiện vi hiếu khí sáng .....	<b>43</b>
<b>Hình 3.8.</b> Khả năng sinh trưởng của chủng Y <sub>11</sub> và GT <sub>10</sub> ở các pH khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng.....	<b>45</b>
<b>Hình 3.9.</b> Thí nghiệm đánh giá khả năng sản sinh IAA bằng thuốc thử <i>Salkowski</i> của 2 chủng Y <sub>11</sub> và GT <sub>10</sub> ở các pH khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng .....	<b>46</b>
<b>Hình 3.10.</b> Hàm lượng IAA sản sinh ra trong dịch nuôi (µg/mL) ở các pH khác nhau của chủng Y <sub>11</sub> và GT <sub>10</sub> trong điều kiện vi hiếu khí sáng .....	<b>46</b>
<b>Hình 3.11.</b> Thí nghiệm đánh giá khả năng sản sinh NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> bằng thuốc thử Nessler của 2 chủng Y <sub>11</sub> và GT <sub>10</sub> ở các nồng độ muối khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng.....	<b>48</b>
<b>Hình 3.12.</b> Hàm lượng NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> sinh ra trong dịch nuôi (mg/L) ở các nồng độ muối khác nhau của chủng Y <sub>11</sub> và GT <sub>10</sub> trong điều kiện vi hiếu khí sáng .....	<b>48</b>
<b>Hình 3.13.</b> Thí nghiệm đánh giá khả năng sản sinh IAA bằng thuốc thử <i>Salkowski</i> của 2 chủng Y <sub>11</sub> và GT <sub>10</sub> ở các nồng độ muối khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng.....	<b>50</b>
<b>Hình 3.14.</b> Khả năng sinh trưởng của chủng Y <sub>11</sub> và GT <sub>10</sub> ở các nồng độ muối khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng .....	<b>50</b>
<b>Hình 3.15.</b> Hàm lượng IAA sản sinh ra trong dịch nuôi (µg/mL) của chủng Y <sub>11</sub> và GT <sub>10</sub> ở các nồng độ muối khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng .....	<b>51</b>
<b>Hình 3.16.</b> Hàm lượng NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> sinh ra trong dịch nuôi (mg/L) ở các nhiệt độ khác nhau của chủng Y <sub>11</sub> và GT <sub>10</sub> trong điều kiện vi hiếu khí sáng.....	<b>53</b>

<b>Hình 3.17.</b> Khả năng sinh trưởng của chủng Y <sub>11</sub> và GT <sub>10</sub> ở các nhiệt độ khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng .....	<b>54</b>
<b>Hình 3.18.</b> Khả năng sinh trưởng của chủng Y <sub>11</sub> và GT <sub>10</sub> ở các nhiệt độ khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng .....	<b>55</b>
<b>Hình 3.19.</b> Hàm lượng IAA sản sinh ra trong dịch nuôi ( $\mu\text{g/mL}$ ) ở các nhiệt độ khác nhau của chủng Y <sub>11</sub> và GT <sub>10</sub> trong điều kiện vi hiếu khí sáng.....	<b>56</b>

## MỞ ĐẦU

Việt Nam là quốc gia có nền nông nghiệp phát triển và giữ vai trò quan trọng với phần lớn dân cư sinh sống ở nông thôn và làm nông nghiệp. Trong đó, lúa gạo là cây lương thực chủ lực của quốc gia và là mặt hàng xuất khẩu chiến lược, góp phần quan trọng vào phát triển kinh tế, xã hội.

Tuy nhiên, sản xuất lúa hiện nay đang gặp nhiều khó khăn do biến đổi khí hậu. Cây lúa là đối tượng rất nhạy cảm, khi nhiệt độ cao hoặc thấp so với ngưỡng tối ưu có thể ảnh hưởng đến thời gian sinh trưởng của chúng, giảm tỷ lệ trổ bông và giảm năng suất hạt. Hiện tượng mặn hóa và phèn hóa đất làm suy giảm độ phì nhiêu đất, ức chế phát triển bộ rễ và làm giảm tác dụng của phân bón. Ngoài ra, việc ô nhiễm kim loại nặng và tích tụ các hợp chất độc hại trong đất cũng làm suy giảm các chỉ tiêu nông học và chất lượng hạt lúa.

Bên cạnh nguyên nhân do biến đổi khí hậu thì hoạt động canh tác nông nghiệp không bền vững của con người cũng đang gây suy thoái tài nguyên đất nghiêm trọng. Việc lạm dụng phân bón hóa học và thuốc bảo vệ thực vật để tăng năng suất cây trồng trong ngắn hạn đã gây ra những hệ lụy đối với hệ sinh thái nông nghiệp như gây ra axit hóa đất, ô nhiễm nước, đất và làm suy giảm đa dạng vi sinh vật sống trong đó. Đặc biệt, các ruộng lúa ngập nước là một trong những nguồn phát thải khí mê-tan ( $\text{CH}_4$ ) đáng kể gây ra sự nóng lên của toàn cầu.

Những thách thức trên cho thấy việc phát triển các giải pháp canh tác nông nghiệp bền vững là hết sức cấp thiết. Trong đó, nhóm vi khuẩn có lợi trong đất ngày càng được quan tâm do vai trò quan trọng trong kích thích sinh trưởng và nâng cao khả năng chống chịu của cây trồng, cải thiện độ phì nhiêu đất, tái cân bằng hệ sinh thái vùng rễ, giảm phụ thuộc vào phân bón hóa học, thuốc trừ sâu, giúp bảo vệ môi trường.

Dù vậy, các nhóm vi sinh vật như vi khuẩn tia quang hợp (VKTQH) vốn có khả năng cải tạo đất và hỗ trợ sinh trưởng cây trồng lại chưa được khai thác và ứng dụng rộng rãi, đặc biệt tại các vùng đất nhiễm mặn, nhiễm phèn.

Nitơ là dưỡng chất thiết yếu cho cây trồng nhưng phần lớn tồn tại dưới dạng khí  $\text{N}_2$  mà thực vật không hấp thụ trực tiếp. Việc sử dụng phân đạm hóa học giúp cây phát triển nhanh nhưng để lại nhiều hệ lụy môi trường. Giải pháp thay thế bền vững là ứng dụng vi sinh vật cố định nitơ sinh học, chuyển  $\text{N}_2$  thành  $\text{NH}_4^+$  dễ hấp thụ, đồng thời góp phần cải thiện đất và cân bằng hệ sinh thái vùng rễ.

Ngoài ra, nhiều chủng VKTQH còn có khả năng sản sinh axit indole-3-axetic (IAA), là auxin tự nhiên quan trọng trong việc kích thích phát triển rễ. Quá trình

này chủ yếu diễn ra thông qua con đường phụ thuộc L-tryptophan, trong đó amino axit này được chuyển hóa thành IAA nhờ hệ enzyme nội sinh của vi khuẩn. Khả năng sinh IAA không chỉ giúp cây trồng có thể hấp thu dinh dưỡng tốt hơn mà còn góp phần giúp góp phần nâng cao hiệu quả phân bón và năng suất cây trồng ở điều kiện nhiễm mặn, nhiễm phèn, nghèo dinh dưỡng.

Tại Việt Nam, các nghiên cứu về phân lập, tuyển chọn và ứng dụng các chủng VKTQH bản địa vẫn còn hạn chế. Phần lớn các chủng đang được sử dụng hiện nay có nguồn gốc từ nước ngoài hoặc được phân lập trong điều kiện phòng thí nghiệm nên chưa thích nghi cao được với môi trường tự nhiên ngoài đồng ruộng. Vì vậy, việc xây dựng một bộ tập hợp các chủng VKTQH bản địa có khả năng cố định nitơ và tổng hợp IAA, đồng thời thích nghi tốt với khí hậu, thổ nhưỡng tại Việt Nam là hết sức cấp thiết.

Do đó, chúng tôi đã tiến hành thực hiện đề tài ***“Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn tía quang hợp có khả năng cố định nitơ phân tử và sản sinh chất kích thích sinh trưởng IAA làm cơ sở tạo chế phẩm phân vi sinh cho lúa”***.

#### **Mục đích nghiên cứu :**

Có được 2–3 chủng VKTQH có khả năng cố định nitơ phân tử và sản sinh IAA tốt nhất để ứng dụng làm chế phẩm phân bón ở ruộng lúa nước, ruộng lúa nhiễm mặn, nhiễm phèn.

#### **Nội dung nghiên cứu:**

- Phân lập các chủng VKTQH
- Tuyển chọn chủng VKTQH có khả năng cố định nitơ phân tử
- Tuyển chọn chủng VKTQH có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng IAA
- Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học và phân loại các chủng VKTQH tuyển chọn được
- Đánh giá ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng cố định nitơ phân tử; sinh trưởng và sản sinh chất kích thích IAA của VKTQH lựa chọn

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1.1. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VÀ SẢN XUẤT PHÂN BÓN VI SINH

#### 1.1.1. Tổng quan về phân bón vi sinh

Trong ngành nông nghiệp hiện đại, việc sử dụng quá mức phân bón hóa học và thuốc bảo vệ thực vật đã làm cây trồng suy giảm khả năng chống chịu tự nhiên. Hệ quả là chất lượng nông sản bị ảnh hưởng tiêu cực, đồng thời đất canh tác dần bị thoái hóa. Các hóa chất tồn dư tích tụ lâu dài trong đất gây ra những nguy cơ tiềm ẩn đối với sức khỏe con người cũng như cho môi trường. Vì vậy, việc ứng dụng phân bón vi sinh là một hướng tiếp cận bền vững giúp thay thế phân bón hóa học đang được rất nhiều nhà khoa học quan tâm [1].

Tác động của phân bón vi sinh chủ yếu qua các hoạt động sinh học của vi sinh vật đất, bao gồm quá trình tiết enzyme, axit hữu cơ và các hợp chất sinh học khác. Những hoạt động này không chỉ thúc đẩy quá trình khoáng hóa và chuyển hóa dinh dưỡng trong đất mà còn làm thay đổi thành phần và cấu trúc quần xã vi sinh vật vùng rễ cũng như hệ vi sinh vật nội sinh của cây trồng theo hướng gia tăng các nhóm vi sinh vật có lợi [2]. Phân bón vi sinh còn bổ sung nguồn chất hữu cơ làm cơ chất cho hệ vi sinh đất và các nguyên tố dinh dưỡng cần thiết như N, P, K. Thông qua hoạt động phân giải của vi sinh vật, các hợp chất hữu cơ phức tạp chuyển thành dạng đơn giản hơn giúp cây dễ hấp thu. Chúng còn góp phần cải thiện khả năng cung cấp vi lượng và trung lượng, tăng hiệu quả sử dụng dinh dưỡng và khả năng thích nghi của cây trồng [3].

Phân bón vi sinh có thể chứa một hoặc phối trộn nhiều chủng với chất mang và sử dụng trực tiếp hoặc sau khi qua các bước xử lý bổ sung. Ngoài ra, còn có dạng phân bón vi sinh hỗn hợp được kết hợp thêm dinh dưỡng và phân bón hữu cơ vi sinh chứa nguồn hữu cơ từ tàn dư sinh học. Các vi sinh vật thường được sử dụng gồm *Rhizobium*, vi khuẩn hòa tan silicat, vi sinh vật hòa tan photphat và một số nhóm khác [3]. Theo báo cáo năm 2023, phân bón vi sinh có nguồn gốc từ vi khuẩn đang chiếm ưu thế trên thị trường với tỷ trọng 42,9%, các chế phẩm chứa vi khuẩn cố định nitơ được sử dụng rộng rãi nhất, chiếm 27,45% thị phần [4].

Ngày nay, việc nghiên cứu và phát triển phân bón vi sinh đã chuyển từ việc sử dụng đơn chủng sang phối hợp nhiều chủng nhằm giúp các chủng tăng khả năng thích nghi và hiệu quả hoạt động trong môi trường đất [5]. Sự kết hợp giữa vi khuẩn nốt sần (*Rhizobium*) và nấm cộng sinh rễ dạng túi (arbuscular mycorrhizal fungi) là một ví dụ điển hình, trong đó nhiều nghiên cứu đã chứng minh tác động rõ rệt đối

với sự sinh trưởng và phát triển của cây trồng [6]. Cùng với đó, việc phân lập và khai thác các vi sinh vật có chức năng đặc hiệu là hướng nghiên cứu trọng tâm.

Ngoài yếu tố chủng thì các cải tiến về vật liệu mang cũng đóng vai trò không nhỏ giúp nâng cao hiệu quả của phân bón vi sinh. Các vật liệu mang hiện nay chủ yếu có nguồn gốc hữu cơ hoặc khoáng như than bùn nghiền, đất sét, gạo, cám, hạt giống và các nền hữu cơ phức hợp khác [7]. Trong số đó, than hoạt tính thu hút nhiều sự quan tâm nhờ cấu trúc xốp và diện tích bề mặt lớn, giúp vi sinh vật bám dính và sinh trưởng tốt hơn, góp phần nâng cao hiệu quả sinh trưởng cây trồng [8]. Ngoài ra, việc ứng dụng công nghệ nano cũng đang mở ra những triển vọng mới. Các chế phẩm vi sinh được bao vi nang bằng chitosan [9] hoặc phủ các nguyên tố vi lượng như silic, kẽm, đồng, sắt và bạc [10], tăng khả năng bảo vệ vi sinh vật, thuận tiện trong vận chuyển và sử dụng, đồng thời kéo dài thời gian tác động và nâng cao hiệu quả. Đây có thể được xem là một bước tiến quan trọng trong việc phát triển phân bón thông minh trong nông nghiệp hiện đại.

### **1.1.2. Phân VSV cố định đạm**

#### ***1.1.2.1. Tổng quan quá trình cố định nitơ***

Nitơ là nguyên tố trợ khó tham gia phản ứng hóa học với các nguyên tố khác. Tuy nhiên, nitơ lại giữ vai trò thiết yếu trong cơ thể sinh vật, thành phần cấu tạo diệp lục, các axit amin, protein, cũng như nhiều hợp chất quan trọng khác như adenosine triphosphate (ATP) và các axit nucleic [11]. Trong tự nhiên, nitơ luôn được luân chuyển liên tục trong một chu trình khép kín dưới tác động của các quá trình hóa học và sinh học khác nhau. Thông qua các hoạt động này, nitơ phân tử được chuyển đổi thành các dạng nitơ vô cơ, sau đó được sinh vật đồng hóa và tích lũy dưới dạng nitơ hữu cơ trong cơ thể thực vật và động vật.

Nitơ rất quan trọng đối với sự sinh trưởng và phát triển của thực vật. Tuy nhiên, dạng nitơ phân tử ( $N_2$ ) trong khí quyển cây trồng không hấp thu trực tiếp được. Nhờ quá trình cố định nitơ sinh học mà các vi sinh vật chuyên hóa chuyển hóa  $N_2$  thành các dạng nitơ khử, chủ yếu là ammoniac ( $NH_3$ ) mà thực vật có thể sử dụng [12]. Quá trình này được xúc tác bởi hệ enzyme nitrogenase do vi sinh vật cố định nitơ tổng hợp, cho phép khử  $N_2$  thành  $NH_3$  dưới các điều kiện sinh học đặc thù [13].

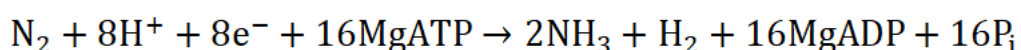
Trong đất, các nhóm vi sinh vật cố định nitơ gồm cả vi khuẩn cộng sinh như *Rhizobium* và *Frankia*, và các vi khuẩn sống tự do hoặc không cộng sinh như *Azotobacter* cùng một số nhóm vi khuẩn cố định nitơ khác. Các vi sinh vật này sử dụng nguồn cơ chất và dinh dưỡng từ phân bón vi sinh để duy trì hoạt động trao đổi

chất, qua đó thực hiện quá trình chuyển hóa nitơ khí quyển thành amoniac, góp phần bổ sung nguồn nitơ dễ hấp thu cho cây trồng [1].

### 1.1.2.2. Quá trình cố định nitơ phân tử

Đây là quá trình chỉ được thực hiện bởi một số sinh vật nhân sơ chuyên hóa, nitơ phân tử ( $N_2$ ) trong khí quyển được chuyển hóa thành dạng nitơ khử, chủ yếu là amoniac ( $NH_3$ ). Cơ chế này được Beijerinck ghi nhận lần đầu vào năm 1901, đặt nền móng cho hiểu biết về vai trò của vi sinh vật trong chu trình nitơ tự nhiên. Cuối thế kỷ XIX, Jodin đã đưa ra giả thuyết vi khuẩn có thể chuyển hóa nitơ khí quyển thành dạng có thể sử dụng được cho sinh vật. Khoảng năm 1900, các vi khuẩn cố định  $N_2$  đầu tiên đã được phân lập thành công. Năm 1934, Burk đưa ra thuật ngữ “nitrogenase” để chỉ hệ enzyme xúc tác phản ứng khử nitơ phân tử, mở đầu cho các nghiên cứu về hoạt động của enzyme này trong tế bào sống. Đến năm 1960, việc phát triển phương pháp tách chiết nitrogenase ở trạng thái hoạt động đã tạo tiền nghiên cứu chuyên sâu về cơ chế xúc tác và cấu trúc của enzyme cho các giai đoạn tiếp theo.

Phương trình tổng quát:



Phản ứng trên cho thấy quá trình cố định nitơ khí quyển tiêu tốn nhiều năng lượng, cần 16 phân tử ATP cho mỗi phân tử  $N_2$  được khử. Nguyên nhân là do phân tử nitơ có cấu trúc rất bền, liên kết cộng hóa trị ba ( $N \equiv N$ ), khiến  $N_2$  có tính trơ hóa học cao. Nitrogenase có khả năng phá vỡ liên kết này và xúc tác quá trình gắn hydro để tạo thành amoniac. Về cấu trúc, phức hợp nitrogenase gồm: Mo-Fe protein và Fe protein. Mo-Fe protein là trung tâm gắn cơ chất và trực tiếp xúc tác quá trình khử  $H^+$  và  $N_2$  để tạo  $H_2$  và  $NH_3$ . Fe protein có vai trò tiếp nhận electron từ ferredoxin, thủy phân ATP và truyền electron tới protein FeMo. Sự tương tác giữa hai protein này tạo thành một phức hợp chức năng, cấu trúc của chúng đã được nghiên cứu và kết tinh thành công [14].

Các vi sinh vật cố định nitơ rất đa dạng gồm: sinh vật sống tự do trong đất như *Azotobacte*, các sinh vật sống trong môi trường nước và quang hợp như vi khuẩn lam, các vi khuẩn liên kết với rễ cây như *Azospirillum* và đặc biệt là các vi khuẩn cộng sinh, tiêu biểu là *Rhizobium* và *Bradyrhizobium* hình thành nốt sần ở cây họ Đậu [15]. Nguồn năng lượng có được nhờ quá trình oxy hóa các hợp chất hữu cơ, trong đó, vi sinh vật sống tự do phải phụ thuộc vào nguồn cacbon hữu cơ từ môi trường, còn các vi sinh vật quang hợp sử dụng sản phẩm quang hợp. Vi khuẩn cộng sinh nhận trực tiếp chất dinh dưỡng từ cây thông qua nốt sần rễ [16].

### 1.1.2.3. Các chủng VSV có khả năng cố định nitơ phân tử

Vi sinh vật có khả năng cố định phân tử  $N_2$  chiếm khoảng 78,16% thể tích khí quyển, thành các dạng nitơ khử, cung cấp dinh dưỡng cho sinh vật trong hệ sinh thái [17]. Hoạt động này đóng vai trò then chốt trong chu trình nitơ toàn cầu, với lượng cố định nitơ trong tự nhiên khoảng  $2,4 \times 10^8$  tấn, cao gấp nhiều lần so với tổng lượng nitơ được sản xuất thông qua con đường công nghiệp [18].

Dựa vào mối quan hệ sinh thái với thực vật, chúng được chia thành hai nhóm chính gồm: nhóm sống tự do, hội sinh và nhóm cộng sinh. Vi sinh vật cố định nitơ sống tự do và hội sinh rất đa dạng về số loài, phân bố trong đất, nước và vùng rễ cây trồng. Một số chi vi khuẩn trong nhóm này đã được nghiên cứu tương đối sâu và có tiềm năng trong ứng dụng sản xuất phân bón vi sinh. Vi khuẩn dị dưỡng trong đất có thể cố định nitơ mà không cần sự tương tác trực tiếp với các sinh vật khác, điển hình như các chi *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium* và *Klebsiella*. Chúng chủ yếu thu nhận năng lượng từ việc oxy hóa các hợp chất hữu cơ từ môi trường. Bên cạnh đó, một số loài sống tự do còn có thể sống kiểu hóa dưỡng vô cơ, nguồn năng lượng từ các hợp chất vô cơ [11].

Enzyme nitrogenase nhạy cảm với oxy, nên các vi sinh vật sống này hoạt động tốt nhất trong điều kiện kỵ khí hoặc vi hiếu khí. Do khan hiếm về nguồn cacbon và năng lượng nên đóng góp của chúng vào tổng lượng nitơ cố định toàn cầu không lớn. Tuy nhiên, tại Úc có một số nghiên cứu trên hệ thống canh tác luân canh lúa mì thâm canh cho thấy các vi sinh vật sống tự do có thể cung cấp khoảng 20 kg N/ha/năm, tương đương 30 – 50% tổng nhu cầu nitơ của cây trồng [19]. Việc duy trì tàn dư rơm rạ lúa mì trên đồng ruộng kết hợp với giảm cường độ làm đất đã tạo ra môi trường giàu cacbon nhưng nghèo nitơ, qua đó thúc đẩy các vi sinh vật này hoạt động mạnh mẽ hơn [11]. Ngoài ra, nhiều vi khuẩn vùng rễ như *Azospirillum* thường liên kết với các cây thuộc họ *Poaceae* như ngô, lúa, lúa mì và yến mạch. Chúng cố định đáng kể lượng nitơ trong vùng rễ (*rhizosphere*) của cây chủ với hiệu suất đã được ghi nhận đạt tới 52 mg  $N_2$ /g malate.

Mức độ cố định nitơ phụ thuộc nhiều yếu tố như điều kiện môi trường, khả năng cung cấp chất hữu cơ từ cây chủ, mức oxy hóa trong vùng rễ, năng lực cạnh tranh của vi khuẩn, cũng như hiệu quả xúc tác của enzyme nitrogenase. Nhiều vi sinh vật cố định nitơ thông qua mối quan hệ cộng sinh với cây chủ, trong đó cây cung cấp các hợp chất cacbon từ quang hợp làm nguồn năng lượng cho vi sinh vật, còn vi sinh vật cung cấp nitơ đã được cố định phục vụ sinh trưởng của cây.

Một ví về quan hệ cộng sinh giữa dương xỉ nước *Azolla* và vi khuẩn lam *Anabaena azollae* cư trú trong các khoang ở gốc lá *Azolla* và cố định nitơ trong các

tế bào chuyên hóa gọi là dị bào (*heterocyst*). Hệ cộng sinh này đã được sử dụng hơn 1.000 năm trong ruộng lúa nước ở Đông Nam Á như một dạng phân bón sinh học với khả năng cố định tới 600 kg N/ha/năm [15], [20]. Một ví dụ khác là cộng sinh giữa cây thân gỗ và cây bụi có rễ giả như cây tràm *Alnus sp* với vi khuẩn *Frankia*. Loài cây thường sinh trưởng ở nơi nghèo nitơ, là loài tiên phong trong các quần xã thực vật. Chúng phân bố rộng rãi từ vùng núi cao, rừng, ven sông, ven biển và lãnh nguyên Bắc Cực [21]. Tuy nhiên, mối quan hệ cộng sinh quan trọng nhất trong cố định nitơ là giữa cây họ Đậu và vi khuẩn *Rhizobium* và *Bradyrhizobium*. Nhiều cây có giá trị kinh tế như linh lăng, đậu, cỏ ba lá, đậu đũa, lạc, đậu tương và đậu tằm. Trong đó, đậu tương chiếm tỉ trọng lớn nhất về diện tích trồng và sản lượng trên thế giới [22].

Các nghiên cứu ở Việt Nam tập trung vào việc phân lập, tuyển chọn và đánh giá tính ứng dụng của các chủng vi sinh vật cố định nitơ trong nông nghiệp. Nguyễn Thị Thu Hằng và cộng sự (2015) đã phân lập và tuyển chọn được một số chủng *Azotobacter* có khả năng cố định nitơ và tổng hợp IAA, trong đó các chủng AZT<sub>1</sub>, AZT<sub>4</sub>, AZT<sub>6</sub> và AZT<sub>7</sub> cho hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cao, có thể ứng dụng làm chế phẩm phân vi sinh [17]. Năm 2020, Phạm Thị Ngọc Lan và cộng sự đã phân lập các vi khuẩn cố định nitơ từ đất trồng rau tại Pleiku (Gia Lai) và tuyển chọn được hai chủng có khả năng tạo NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cao, cung cấp thêm nguồn vi sinh vật bản địa cải thiện nguồn dinh dưỡng nitơ cho cây trồng [23].

Đặc biệt, VKTQH ngày càng được chú ý nhờ việc đem lại nhiều lợi ích cho cây trồng. Một số chủng không chứa lưu huỳnh có khả năng cố định nitơ phân tử, sản sinh IAA, đồng thời tham gia phân giải phosphate khó tan và cải thiện hoạt tính sinh học của đất. Chúng còn thích nghi tốt với môi trường bất lợi như đất nhiễm mặn, nhiễm phèn và yếm khí trong ruộng lúa nước. Nhờ vậy, VKTQH được xem là đối tượng tiềm năng để nghiên cứu và làm chế phẩm phân vi sinh đa chức năng phục vụ canh tác lúa theo hướng bền vững.

### **1.1.3. Tổng hợp hoóc-môn thực vật axit indole-3-axetic (IAA)**

#### **1.1.3.1. Tổng quan về hoóc-môn thực vật axit indole-3-axetic (IAA)**

Hoóc-môn thực vật có khối lượng phân tử nhỏ, được tổng hợp với hàm lượng rất thấp nhưng có vai trò điều hòa các quá trình sinh lý và sinh hóa của cây, góp phần thúc đẩy quá trình sinh trưởng cây trồng trong môi trường khác nhau [1].

Auxin là hoóc-môn được phát hiện đầu tiên và cũng được nghiên cứu sâu rộng nhất trong sinh lý học thực vật. Chúng là trung tâm trong việc điều hòa nhiều quá trình sinh trưởng và phát triển của cây như: kéo dài và phân chia tế bào, biệt hóa mô, hình thành mô mạch, phát sinh rễ bên. Sự phân bố auxin theo cả không

gian và thời gian ở các mô thực vật đều được kiểm soát chặt chẽ nên chúng ảnh hưởng trực tiếp đến hình thái và chức năng của cây.

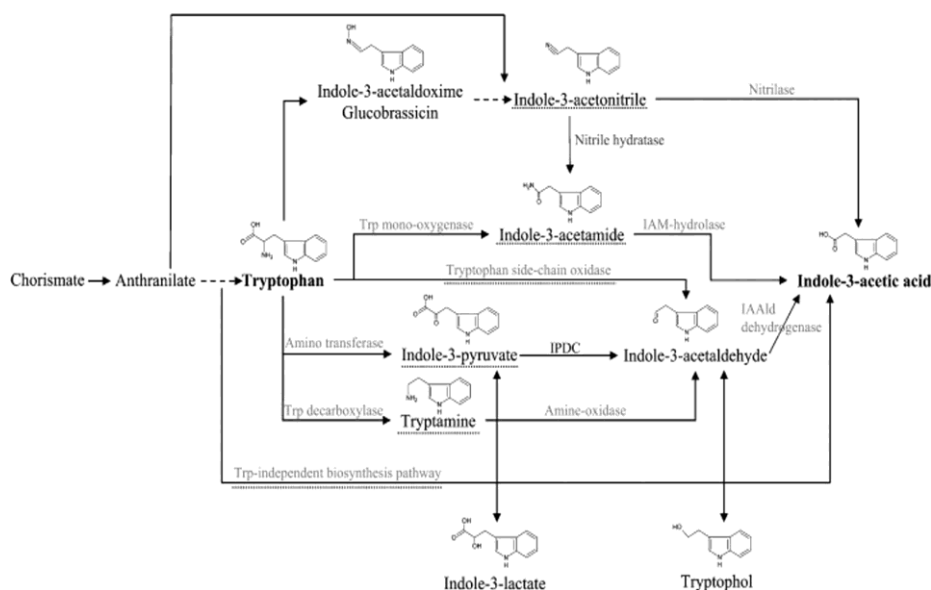
Axit indole-3-axetic (IAA) phổ biến ở thực vật, là một axit cacboxylic và tổng hợp chủ yếu thông qua các con đường phụ thuộc tryptophan. IAA tham gia vào việc điều hòa các quá trình sinh trưởng cơ bản của cây như: phân chia, kéo dài tế bào và biệt hóa mô, ảnh hưởng đến sự phát triển của hệ mạch dẫn và hệ rễ, giúp tăng cường khả năng hấp thu nước và các chất dinh dưỡng khoáng, thúc đẩy sinh trưởng của cây trồng [24].

### ***1.1.3.2. Vai trò của axit indole-3-axetic (IAA) có nguồn gốc vi sinh vật đối với sinh trưởng và phát triển của cây trồng***

Ngoài nguồn axit indole-3-axetic (IAA) được cây trồng tự tổng hợp, IAA do vi sinh vật cung cấp đặc biệt là các vi khuẩn vùng rễ, cũng có vai trò quan trọng điều hòa quá trình sinh trưởng của cây. Nguồn IAA tác động chủ yếu thông qua việc điều chỉnh cấu trúc và chức năng của hệ rễ. IAA kích thích phân chia và kéo dài tế bào, đồng thời thúc đẩy hình thành rễ bên và lông hút, làm gia tăng đáng kể chiều dài rễ, mật độ rễ bên và diện tích bề mặt hấp thu, giúp nâng cao hiệu sử dụng dinh dưỡng của cây [25]. Ngoài ra, IAA còn giúp cây tăng khả năng thích nghi trước các điều kiện bất lợi hay thiếu dinh dưỡng thông qua việc điều hòa cân bằng hoóc-môn nội sinh và kích hoạt các đáp ứng sinh lý thích hợp [24].

### ***1.1.3.3. Con đường sinh tổng hợp IAA ở vi sinh vật***

Vi sinh vật, đặc biệt là vi khuẩn tổng hợp IAA thông qua nhiều con đường sinh hóa khác nhau, phần lớn phụ thuộc vào tiền chất tryptophan là một amino axit phổ biến được tiết ra từ rễ cây vào vùng rễ (rhizosphere), tạo nguồn cơ chất cho vi sinh vật sử dụng để tổng hợp hoóc-môn [26].



**Hình 1.1. Các con đường để tổng hợp IAA trong vi khuẩn [27].**

- **Con đường indole-3-pyruvic axit (IPyA)**

Quá trình tổng hợp IAA thông qua con đường IPyA đã được ghi nhận ở nhiều nhóm vi khuẩn như *Pantoea agglomerans* gây bệnh nấm ở thực vật, các vi khuẩn có lợi như *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Enterobacter cloacae* và cả vi khuẩn lam.

Bước đầu, tryptophan được chuyển hóa thành indole-3-pyruvate nhờ enzyme aminotransferase. Tiếp theo, IPyA bị khử carboxyl tạo thành indole-3-acetaldehyde (IAAld) dưới tác động của enzyme indole-3-pyruvate decarboxylase (IPDC). Cuối cùng, IAAld bị oxy hóa để hình thành IAA. Ở *Azospirillum lipoferum*, gen *ipdC* được xác định nằm trên nhiễm sắc thể [28] trong khi vị trí của gen này ở phần lớn các loài khác vẫn chưa được làm rõ. Các nghiên cứu bất hoạt gen cho thấy việc ức chế con đường IPyA tới khoảng 90% lượng IAA tổng hợp ở *Az. Brasilense*, cho thấy vai trò quan trọng của con đường IPyA trong sinh tổng hợp auxin ở vi khuẩn. Tuy nhiên, việc không thể làm mất hoàn toàn khả năng sinh IAA cũng cho thấy sự tồn tại của nhiều con đường sinh tổng hợp khác, phản ánh tính linh hoạt của hệ thống sinh tổng hợp auxin ở vi sinh vật [27].

- **Con đường indole-3-acetamide (IAM)**

Con đường indole-3-acetamide (IAM) là con đường sinh tổng hợp IAA được nghiên cứu và mô tả đầy đủ nhất ở vi khuẩn, gồm hai bước phản ứng liên tiếp. Bước đầu, tryptophan được oxy hóa thành IAM nhờ enzyme tryptophan-2-monooxygenase, do gen *iaaM* mã hóa. Tiếp theo, IAM tiếp tục bị thủy phân để tạo thành IAA nhờ enzyme IAM hydrolase, được mã hóa bởi gen *iaaH*. Các gen liên quan đến con đường này tồn tại trên nhiễm sắc thể của một số loài *Pseudomonas*, đồng thời cũng được xác định trên plasmid pPATH ở *P. agglomerans* [29], [30].

Trước đây, con đường IAM được cho là đặc trưng riêng của vi khuẩn nhưng gần đây IAM đã được xác định là một hợp chất nội sinh trong cây *Arabidopsis thaliana* cho thấy con đường này cũng tồn tại và hoạt động ở thực vật [31].

- **Con đường tryptamine (TAM)**

Ở vi khuẩn, con đường tryptamine (TAM) đã được ghi nhận ở *Bacillus cereus* nhờ hoạt tính của enzyme tryptophan decarboxylase, ở *Azospirillum* thông qua khả năng chuyển hóa tryptamine ngoại sinh thành IAA. Ở thực vật, tryptamine là một hợp chất nội sinh, nhiều gen mã hóa enzyme tryptophan decarboxylase đã được nghiên cứu đặc điểm ở nhiều loài cho thấy sự tồn tại con đường TAM ở thực vật [27].

Bước giới hạn tốc độ của con đường này ở thực vật có thể do protein tương tự flavin monooxygenase, thuộc họ YUCCA, xúc tác chuyển hóa tryptamine thành N-hydroxyl-tryptamine. Tuy nhiên, sự hiện diện của các chất trung gian nằm phía sau đang được giả định là indole-3-acetaldoxime và indole-3-acetaldehyde vẫn cần phải nghiên cứu thêm [32], [33]. Bước cuối cùng của con đường này ở vi khuẩn, tryptamine được chuyển trực tiếp thành indole-3-acetaldehyde (IAAld) dưới xúc tác của enzyme amine oxidase [34].

- **Con đường indole-3-acetonitrile (IAN)**

Con đường sinh tổng hợp IAA thông qua indole-3-acetonitrile (IAN) được nghiên cứu khá phổ biến ở thực vật. Bước cuối cùng trong con đường này, enzyme nitrilase xúc tác chuyển hóa IAN thành IAA nhưng các cơ chế hình thành IAN từ tryptophan vẫn rõ ràng. Có 2 nghiên cứu được đề xuất là: IAN được tạo thành thông qua các chất trung gian như indole glucosinolate hoặc indole-3-acetaldoxime [32], [33]. Ở vi khuẩn, IAN có thể được chuyển hóa trực tiếp thành IAA nhờ nitrilase hoặc gián tiếp thông qua trung gian indole-3-acetamide (IAM) [35].

- **Con đường oxy hóa mạch bên của tryptophan**

Hoạt tính tryptophan side-chain oxidase (TSO) chỉ được ghi nhận ở *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Trong con đường này, tryptophan chuyển hóa trực tiếp thành IAAld mà không thông qua chất trung gian IPyA, hợp chất này sau đó có thể bị oxy hóa để tạo thành IAA [36].

- **Con đường không phụ thuộc tryptophan**

Các nghiên cứu trên *Arabidopsis thaliana* gợi ý sự tồn tại của con đường sinh tổng hợp IAA không phụ thuộc tryptophan, xuất phát từ indole-3-glycerolphosphate hoặc indole, nhưng enzyme xúc tác đặc hiệu vẫn chưa xác định được [37]. Vì vậy, vai trò và sự tồn tại của con đường này vẫn còn nhiều tranh luận. Ở vi khuẩn, con đường không phụ thuộc tryptophan đã được ghi nhận ở

*Azospirillum brasilense*, IAA vẫn được tổng hợp khi không bổ sung tryptophan [38]. Tuy nhiên, bằng chứng về enzyme tham gia vẫn còn thiếu, một số vi khuẩn có khả năng sở hữu đồng thời nhiều con đường sinh tổng hợp IAA. Tóm lại, hiểu biết hiện nay về sinh tổng hợp IAA ở vi khuẩn vẫn còn hạn chế và cần được làm rõ thêm nhờ các kỹ thuật phân tích và nghiên cứu hệ gen hiện đại [27].

## 1.2. TỔNG QUAN VỀ VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP

### 1.2.1. Giới thiệu về vi khuẩn tía quang hợp

Vi khuẩn tía quang hợp (VKTQH) là nhóm vi sinh vật thủy sinh quang hợp nhưng không tạo oxy, gồm các chi điển hình như *Rhodospseudomonas*, *Rhodobacter* và *Rhodospirillum* [39]. Chúng chứa các sắc tố quang hợp như bacteriochlorophyll và carotenoid dùng ánh sáng để tạo năng lượng [40]. Màu sắc và sự phân loại các chủng dựa vào thành phần và tỉ lệ Bchl và carotenoids trong tế bào. Chúng không dùng nước làm nguồn điện tử mà sử dụng lưu huỳnh, hợp chất lưu huỳnh khử, hidro hay hợp chất hữu cơ đơn giản nên quá trình quang hợp này không tạo ra oxy [41].

Khi có ánh sáng, chúng quang tự dưỡng hoặc quang dị dưỡng. Vì vậy, chúng sống đa dạng ở bùn đáy, ao hồ, đầm nước mặn hoặc lợ, đất bùn và các cánh đồng lúa. Trong đó, thủy vực nước ngọt, mặn hoặc lợ là điều kiện thuận lợi nhất cho chúng phát triển [42]. VKTQH cố định CO<sub>2</sub> chủ yếu theo chu trình Calvin (C<sub>3</sub>), tạo các hợp chất như đường, axit béo, axit amin và axit cacboxylic. VKTQH không lưu huỳnh sử dụng được nhiều nguồn cacbon hữu cơ như acetate, pyruvate, axit béo mạch thẳng C<sub>5</sub>-C<sub>18</sub>, axit hữu cơ, axit amin, rượu và cacbohydrat [43] và cũng có khả năng điều chỉnh trao đổi chất linh hoạt. Đặc biệt, nhiều chủng VKTQH có khả năng cố định nitơ phân tử trong điều kiện kỵ khí [44]. Một số chủng như KK415, TN110, TN217 và TN414 cũng có khả năng tổng hợp IAA, góp phần thúc đẩy sinh trưởng và phát triển của cây trồng [45].

### 1.2.2. Đặc điểm hình thái và phân loại vi khuẩn tía quang hợp

- **Đặc điểm hình thái**

VKTQH thuộc nhóm vi khuẩn gram âm, đơn bào, có hình thái đa dạng như dạng cầu, dạng xoắn, dạng trực khuẩn và dạng phẩy. Trong một số điều kiện môi trường, các tế bào có thể liên kết với nhau tạo thành các chuỗi ngắn, kích thước dao động khoảng 0,3 – 6 μm. Phần lớn chúng sinh sản bằng phân đôi hay sinh sản thông qua nảy chồi [46]. Trong điều kiện quang hợp, dịch nuôi cấy của VKTQH có màu sắc đặc trưng như tím tía, đỏ, nâu, nâu vàng, phản ánh sự khác biệt về thành phần sắc tố quang hợp và phổ hấp thụ ánh sáng, cho phép các loài hấp thụ hiệu quả ở các bước sóng ánh sáng khác nhau [47].

- **Phân loại của VKTQH**

Năm 1907, Molisch phát hiện ra loại vi khuẩn mang sắc tố đỏ có thể quang hợp đặt tên là *Rhodobacteria*. Chúng được chia thành hai họ là: *Thiorhodaceae* gồm các loài có chứa giọt lưu huỳnh nội bào và *Athiorhodaceae* gồm các loài không hình thành giọt lưu huỳnh trong tế bào [48]. Năm 1989, Bergey phân loại vi khuẩn tía quang hợp làm ba họ gồm: *Chrpmatiaceae*, *Ectothiorhodospiraceae* và *Rhodospirilaceae* [47]. Năm 2001, Bergey phân vi khuẩn tía quang hợp thành ba phân lớp [48]:

- *Alphaproteobacteria*: gồm VKTQH không lưu huỳnh và VKTQH hiếu khí.
- *Betaproteobacteria*: gồm VKTQH không lưu huỳnh.
- *Gammaproteobacteria*: gồm hai họ *Chrpmatiaceae* và *Ectothiorhodospiraceae*.

Trong những năm gần đây, việc phân loại VKTQH không chỉ dựa trên đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh thái mà còn dựa vào các dữ liệu di truyền, đặc biệt gen 16S rDNA là chỉ thị di truyền quan trọng do có mức độ bảo thủ cao trong tiến hóa và kích thước đủ lớn để xác định quan hệ di truyền. Trên cơ sở phân tích trình tự gen 16S rDNA, các hệ thống phân loại của Bergey năm 1994 và 2001 đã thiết lập và hoàn thành việc chứng minh mối quan hệ di truyền giữa các nhóm vi khuẩn, hoàn chỉnh hơn hệ thống phân loại VKTQH.

### 1.2.3. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của VKTQH

#### 1.2.3.1. Quá trình quang hợp

Các sắc tố quang hợp chính ở vi VKTQH là bacteriochlorophyll (Bchla hoặc Bchlb) và carotenoid, được liên kết không cộng hóa trị với hai loại protein màng tích hợp, hình thành nên các trung tâm hoặc các phức hợp ăng-ten thu nhận ánh sáng. Tất cả các loài VKTQH đều chứa phức hợp ăng-ten “lõi” (light-harvesting complex 1, LH1), có cấu trúc bao quanh trung tâm phản ứng. Các phức hợp LH1 thường thể hiện một dải hấp thụ mạnh duy nhất trong vùng cận hồng ngoại, nằm trong khoảng 870-890 nm đối với Bchla hoặc khoảng 1020 nm đối với Bchlb. Nhiều loài còn sở hữu phức hợp ăng-ten ngoại vi LH2 có khả năng hấp thụ ở các bước sóng 800, 820 hoặc 850 nm, giúp tăng cường khả năng thu ánh sáng [49], [50].

#### 1.2.3.2. Trao đổi chất và dinh dưỡng Cacbon

VKTQH trao đổi chất đa dạng và linh hoạt gồm: quang tự dưỡng, quang dị dưỡng, hóa tự dưỡng, hóa dị dưỡng. Trong đó, hai hình thức dinh dưỡng cacbon chủ yếu là quang tự dưỡng (cố định CO<sub>2</sub>) và quang dị dưỡng (sử dụng hợp chất hữu cơ).

- **Cố định CO<sub>2</sub> (quang tự dưỡng)**

VKTQH dùng ánh sáng để cấp năng lượng còn CO<sub>2</sub> là nguồn cacbon và các chất vô cơ làm nguồn electron. Chúng có chu trình Calvin hoàn chỉnh, đóng vai trò trung tâm trong việc cố định CO<sub>2</sub> và hình thành các hợp chất hữu cơ phục vụ cho sinh trưởng, phát triển tế bào đồng thời được giúp duy trì cân bằng oxy hóa - khử nội bào trong điều kiện quang hợp không sinh oxy. Các chất vô cơ là nguồn cung cấp electron bao gồm các kim loại ở dạng khử như Fe<sup>2+</sup>, phân tử H<sub>2</sub>, các hợp chất lưu huỳnh, nitrit cũng như các hệ thống điện sinh học, trong đó catot cung cấp electron trực tiếp cho tế bào [51].

- **Sử dụng hợp chất hữu cơ (quang dị dưỡng)**

VKTQH dùng ánh sáng làm nguồn năng lượng và nguồn cacbon được cung cấp bởi các hợp chất hữu cơ, gồm axit hữu cơ (malate hoặc succinate), axit béo, amino axit, cacbohydrat, alcohol và một số hợp chất thơm [52]. Chu trình axit citric tiếp nhận trực tiếp nhiều hợp chất trung gian như malate, acetate, succinate, fumarate và pyruvate. Nhờ đó vi khuẩn ưu tiên sử dụng các nguồn này mà không cần trải qua các con đường phân giải bổ sung tiêu tốn nhiều năng lượng [53]. Đối với các axit hữu cơ có mức độ khử cao hơn so với sinh khối tế bào, cần một chất nhận electron như CO<sub>2</sub> hoặc dimethyl sulfoxide (DMSO) để duy trì sự sinh trưởng của chúng [54], [55]. Bên cạnh đó, VKTQH cũng có khả năng sử dụng các chất vô cơ để làm nguồn electron cho quá trình trao đổi chất [51].

### 1.2.3.3. Cố định nitơ phân tử

Đa số các loài VKTQH đều có khả năng cố định nitơ phân tử, trong đó các loài không lưu huỳnh có khả năng cố định nitơ với tốc độ cao như: *Rb. Sphaeroides*, *Rb. Capsulatus*, *Rps. Blastica*, *Rps. Gelatinosus*, các loài thuộc chi *Rhodospirillum* hoạt động ở mức độ thấp hơn. Oxy là tác nhân ức chế mạnh cả hoạt tính lẫn sự tổng hợp enzyme nitrogenase ở VKTQH nên quá trình cố định N<sub>2</sub> đạt hiệu quả cao nhất trong điều kiện kỵ khí nghiêm ngặt. Tuy nhiên, một số loài thuộc các chi *Rhodopseudomonas* và *Rhodobacter* chịu được oxy và vẫn duy trì hoạt tính cố định nitơ trong điều kiện vi hiếu khí, mở rộng tiềm năng ứng dụng trong môi trường không hoàn toàn kỵ khí như ruộng lúa nước [56], [57].

VKTQH sử dụng hệ enzyme nitrogenase, là các phức hợp metalloprotein chứa molybden (Mo), sắt (Fe) hoặc vanadi (V), xúc tác phản ứng khử N<sub>2</sub> thành NH<sub>4</sub><sup>+</sup> khi nguồn nitơ vô cơ hạn chế. Mo-nitrogenase là dạng phổ biến và có hiệu suất xúc tác cao nhất [58]. Quá trình này tiêu tốn năng lượng lớn, với tối thiểu 16 mol ATP để khử 1 mol N<sub>2</sub> thành 2 mol NH<sub>4</sub><sup>+</sup> [59].

Hoạt tính nitrogenase của VKTQH chịu ảnh hưởng pH, hàm lượng amoni và nguồn cacbon. Các hợp chất như carbonate, bicarbonate, alcohol hoặc CO<sub>2</sub> có thể

làm tăng cường hoạt tính enzyme bằng cách cung cấp nguồn cacbon và electron cho quá trình quang dưỡng kỵ khí. Khi môi trường nuôi cấy cạn kiệt amoni, hoạt tính cố định nitơ có thể được phục hồi trở lại [60].

#### **1.2.3.4. Khả năng sản sinh chất kích thích sinh trưởng (IAA)**

IAA là dạng auxin tự nhiên phổ biến, giữ vai trò là tín hiệu trung tâm điều khiển nhiều quá trình sinh trưởng và phát triển của cây trồng. Hợp chất này kích thích bơm  $H^+$  tại màng sinh chất, làm giãn thành tế bào và thúc đẩy sự kéo dài của rễ cũng như chồi non, đồng thời tạo điều kiện hình thành rễ bên và rễ tơ, làm tăng diện tích bề mặt hấp thu nước và dinh dưỡng. Bên cạnh đó, IAA còn điều hòa hoạt động của mô phân sinh và phối hợp với các hoóc-môn khác như cytokinin và ethylene nhằm cân bằng giữa quá trình phân chia và biệt hóa tế bào, kiểm soát hình thái thân và phát triển của hoa, quả [61], [62].

Sakpirom và cộng sự (2017) chứng minh 4 chủng VKTQH được phân lập từ ruộng lúa, trầm tích sông gồm K415, TN110, TN217 và TN414 có khả năng tổng hợp IAA. Khi bổ sung 1 mM tryptophan vào môi trường, các chủng từ ruộng lúa sản sinh IAA trong khoảng 0,65 – 3,6 mg IAA  $L^{-1}$  [45]. Tuy nhiên, nồng độ IAA quá cao có thể kìm hãm sự phát triển của hệ rễ nên các chủng sinh IAA ở mức độ phù hợp thường được ưu tiên trong ứng dụng trong nông nghiệp. Nghiên cứu của Su Ping và cộng sự (2017) chứng minh *Rhodopseudomonas palustris* GJ-22 tổng hợp IAA đạt 30 mg  $L^{-1}$  khi môi trường bổ sung 3 mM tryptophan, trong khi mức IAA chỉ đạt 15 mg  $L^{-1}$  khi không bổ sung tryptophan [63]. Chủng *Rhodopseudomonas* KL9 phân lập từ trầm tích sông tạo ra nồng độ IAA cao nhất đạt 52 mg  $L^{-1}$  khi bổ sung 3 mM tryptophan [40].

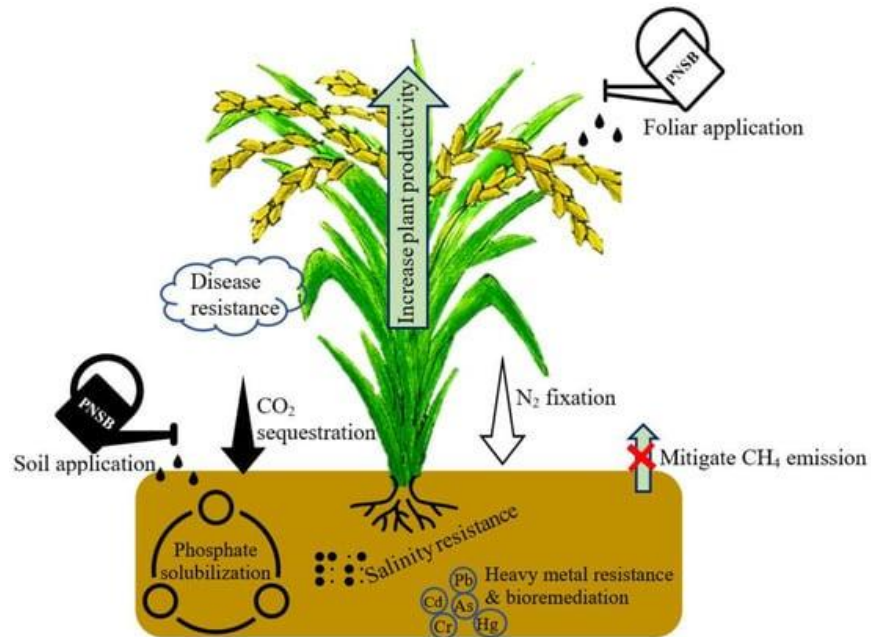
Theo Honglian Ge và Fuli Zhang (2018), chủng *Rhodopseudomonas palustris* G5 sinh tổng hợp IAA và thể hiện đặc tính kích thích sinh trưởng thực vật, góp phần làm tăng chiều cao thân, chiều dài rễ và sinh khối cây dưa chuột trong điều kiện stress mặn [64]. Nghiên cứu của Cheng-Chieh Hung và cộng sự (2012) chứng minh chủng *Rhodopseudomonas palustris* PS3 có khả năng sản sinh IAA, giúp kích thích nảy mầm, tăng sức sống cây con và thúc đẩy sinh trưởng của cải bắp. Khi bổ sung PS3, cây đạt sinh trưởng gần tương đương với bón đầy đủ phân khi chỉ sử dụng khoảng một nửa lượng phân bón, bên cạnh đó cũng sử dụng nitơ tốt hơn, cho thấy tiềm năng ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp bền vững [65].

Một nghiên cứu ghi nhận rằng *R. palustris* KKSSR91 sản sinh ra IAA đạt 29,58 mg/L khi bổ sung 3 mM tryptophan, giúp giảm tác động gây độc thực vật của axit đối với cây đậu thận [66]. *Rhodobacter capsulatus* PS-2 được phân lập từ ruộng lúa, có khả năng sản xuất một lượng đáng kể IAA trong điều kiện tối ưu bổ sung

tryptophan [67]. Nghiên cứu của Kang và cộng sự cũng báo cáo rằng *R. sphaeroides* KE149 có thể sản xuất 4,6 – 5,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  IAA khi có D-tryptophan trong môi trường và đồng thời giảm các tác động do hạn hán đối với cây đậu đỏ [68].

#### 1.2.4. Ứng dụng của VKTQH làm phân bón sinh học

##### 1.2.4.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới



**Hình 1.2. Những lợi ích của VKTQH lên hệ sinh thái lúa khi được bón vào đất hoặc phun lên lá [69]**

Các nghiên cứu quốc tế đã ghi nhận vai trò của VKTQH trong canh tác lúa. Elbadry và cộng sự (1999a, 1999b) chứng minh VKTQH là nhóm vi sinh vật chiếm ưu thế trên ruộng lúa và có khả năng cải thiện độ phì nhiêu của đất thông qua cố định nitơ sinh học [70]. Kundu và Ladha (1997) ước tính hoạt động của nhóm VKTQH có thể đóng góp 2,0 – 3,5 tấn nitơ/ha từ nguồn hữu cơ trong ruộng lúa [71].

Bên cạnh khả năng cố định nitơ, một số loài VKTQH còn hỗ trợ cây lúa hấp thu dinh dưỡng khoáng. *Rhodospirillum rubrum* có khả năng hòa tan các phosphate khó tan như  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  và  $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ , qua đó giúp cung cấp nguyên tố vi lượng nhưng rất cần thiết cho cây trồng [72]. Các chủng *Rhodopseudomonas palustris* như TK103, PP803 và P1 được xác định có khả năng tổng hợp axit 5-aminolevulinic (ALA) với hàm lượng 1,4 – 1,7 mg/L, giúp cây lúa chịu mặn tốt và cải thiện năng suất [73]. *Rhodopseudomonas* KL9 có thể tổng hợp tới 52 mg/L indole-3-acetic axit (IAA), cho thấy tiềm năng mạnh mẽ đối với sinh trưởng cây

trồng [40].

Cũng có nhiều nghiên cứu ở thực nghiệm đã cho thấy hiệu quả của VKTQH đối với sinh trưởng và năng suất cây trồng. *Rhodobacter capsulatus* kết hợp với phân bón vô cơ giúp nâng cao hiệu quả sử dụng nitơ và tăng năng suất lúa [74]. Việc bổ sung *R. capsulatus* vào đất kết hợp với N, P và K trong giai đoạn sinh sản làm tăng năng suất hạt lúa, đồng thời góp phần khử độc đất và cải thiện độ phì nhiêu. Bên cạnh đó, VKTQH có khả năng tổng hợp nhiều hợp chất hoạt tính sinh học như chất diệt cỏ, chất kháng vi rút và kháng khuẩn, giúp ức chế tác nhân gây bệnh trên cây trồng [73]. *Rhodopseudomonas palustris* có khả năng sản sinh nhiều hợp chất quan trọng như riboflavin, các chất mang sắt, 5-aminolevulinic axit (ALA), exopolysaccharide (EPS) và các phân tử tín hiệu acyl-homoserine lactone, có vai trò kích hoạt cơ chế kháng bệnh cảm ứng ở thực vật [75]. Từ những đặc điểm này, VKTQH được đánh giá là nhóm vi sinh vật có thể ứng dụng để làm phân bón sinh học trong nông nghiệp.

Nghiên cứu khi cho *R. capsulatus* kết hợp với *Azotobacter vinelandii* trong môi trường thủy canh, với lượng protein lần lượt là 600 mg và 60 mg, kết quả thời gian ra hoa và hình thành bông được rút ngắn xuống còn 100 ngày sau gieo, đồng thời kích thước và thể tích lông hút rễ tăng đáng kể. Việc sử dụng VKTQH theo hình thức phun qua lá cũng cho thấy nhiều triển vọng. Khi nghiên cứu đánh giá trên đồng ruộng ở vùng khí hậu nhiệt đới cho thấy phun VKTQH lên lá giúp cây cải thiện đáng kể sinh trưởng cũng như năng suất lúa ngay cả khi nhiệt độ thấp và cường độ ánh sáng yếu [76]. Khi xử lý *Rhodopseudomonas palustris* qua lá giúp cây lúa đẻ nhánh nhiều hơn, lá xanh hơn, thân cây chắc khỏe, giảm đổ ngã và hệ rễ phát triển tốt, từ đó làm tăng số danh hữu hiệu, số hạt trên cây, năng suất hạt và chỉ số thu hoạch [69].

Việc kết hợp *R. capsulatus* với phân đạm hóa học giúp nâng cao hiệu suất sử dụng phân đạm tổng hợp. Tương tự, sự kết hợp giữa *Rhodopseudomonas palustris* và *Bacillus subtilis* có thể làm tăng năng suất lúa [77], trong đó *R. palustris* là chủng VKTQH để làm phân bón sinh học [78], còn *B. subtilis* có vai trò kiểm soát sinh học, bảo vệ cây trồng khỏi các tác nhân gây bệnh [79]. Ngoài ra, Sakarika và cộng sự (2019) đánh giá VKTQH có thể cải thiện các chỉ số đánh giá hiệu quả đầu vào và đầu ra trong sản xuất nông nghiệp [39]. Su và cộng sự (2017) còn chỉ ra tiềm năng sử dụng VKTQH như một chế phẩm phun lá giúp tăng sức đề kháng cho cây, kiểm soát virus khảm thuốc lá [80].

#### 1.2.4.2. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam

Một số nghiên cứu trong nước cũng chứng minh thấy tiềm năng ứng dụng của VKTQH trong các điều kiện canh tác khó khăn. Võ Quang Minh và Phạm Thành Vũ (2015) nhận định rằng môi trường đất phèn, đất mặn dù khắc nghiệt đối với đa số vi sinh vật nhưng lại phù hợp cho nhiều loài VKTQH nhờ khả năng thích nghi cao [81]. Nguyễn Thị Mỹ Linh và cộng sự (2019) đã thử nghiệm các chủng *Rhodopseudomonas palustris* phân lập từ đất mặn tại Sóc Trăng cho thấy khả năng sinh trưởng tốt ở nồng độ muối lên đến 2,5%, đồng thời cải thiện rõ rệt sinh trưởng cây lúa so với đối chứng không xử lý [82]. Lê Văn Hùng và cộng sự (2020) cũng ghi nhận chủng *Rhodobacter sphaeroides* có khả năng tăng năng suất lúa từ 12-18% trong điều kiện đất nhiễm phèn nặng [83].

Nguyễn Quốc Khương và cộng sự (2024) đã nghiên cứu trong điều kiện nhà lưới và thấy việc bổ sung các chủng VKTQH sinh exopolysaccharide (EPS) thuộc loài *Luteovulum sphaeroides* trên đất chua nhiễm mặn cải thiện đáng kể đặc tính đất và sinh trưởng cây lúa. Chúng giúp đất tăng độ pH, cải thiện hàm lượng N và P, đồng thời giảm tích lũy  $\text{Na}^+$  trong đất. Vì vậy đã giúp cây hấp thu dinh dưỡng hiệu quả hơn, dẫn đến năng suất lúa tăng 27,7% so với đối chứng [84]. Nguyễn Quốc Khương và cộng sự (2025) cho thấy việc bổ sung VKTQH hòa tan kali dạng lỏng đã cải thiện rõ rệt dinh dưỡng kali trong đất và hiệu quả sử dụng của cây trồng. Chế phẩm này giúp cây hấp thu kali tốt hơn, đồng thời tăng năng suất ngô so với việc chỉ sử dụng phân NPK theo khuyến cáo. Đáng chú ý, việc áp dụng vi khuẩn này còn có thể giảm hoặc thay thế hoàn toàn lượng phân kali mà vẫn duy trì, thậm chí nâng cao năng suất khi kết hợp với lượng kali khuyến cáo [85].

Những kết quả này chứng tỏ nguồn VKTQH nội địa phong phú, chúng không chỉ có thể thích nghi tốt với điều kiện thực địa nhiều khắc nghiệt mà còn đóng góp không nhỏ vào việc nâng cao năng suất và giảm tối đa việc sử dụng phân bón hóa học, là cơ sở quan trọng cho các nghiên cứu nhằm phát triển chế phẩm sinh học cho sản xuất lúa bền vững tại Việt Nam.

#### 1.2.5. Một số ứng dụng khác của VKTQH

- **Xử lý nước thải và bảo tồn tài nguyên**

VKTQH có khả năng loại bỏ các chất hữu cơ khỏi nhiều loại nước thải khác nhau. Chúng có thể thích nghi được trong các môi trường nước thải mặn như: nước thải các công nghiệp, nước thải bồn cầu có nồng độ muối và sunfat cao. Hülsen và cộng sự (2019) đã chứng minh rằng quần thể vi sinh vật có nguồn gốc từ nước thải bao gồm VKTQH đã được làm giàu có thể tồn tại ở nơi chứa nước thải mặn và

chuyển hóa hiệu quả COD thành sinh khối vi khuẩn [86]. Nghiên cứu khác đã chứng minh VKTQH có thể phát triển trong nước thải của quá trình Fischer-Tropsch, một quy trình công nghiệp nhằm sản xuất nhiên liệu lỏng. Tuy vậy, do đặc điểm nghèo nguồn nitơ dinh dưỡng của loại nước thải này nên việc ứng dụng các biện pháp xử lý sinh học còn gặp nhiều khó khăn [87].

Trong hệ thống xử lý nước thải sinh hoạt, VKTQH chiếm tỉ lệ ưu thế trong quần xã sinh vật. Khi bổ sung một nguồn cacbon như ethanol, chúng có thể loại bỏ hiệu quả các chất dinh dưỡng, giúp nước thải đạt tiêu chuẩn xả thải [88]. Bên cạnh đó, Cerruti và cộng sự cho thấy VKTQH được làm giàu từ bùn hoạt tính của nhà máy xử lý nước thải có thể đạt hiệu suất loại bỏ COD lên tới 96%, đặc biệt trong các hệ phản ứng khuấy trộn [89].

Nghiên cứu của Bunraksa và cộng sự (2020) chứng minh VKTQH cũng cho hiệu quả cao trong xử lý nước thải nông nghiệp thường có hàm lượng chất hữu cơ cao nên cần yêu cầu hiệu quả loại bỏ COD lớn hơn. Khi nuôi cấy trên nước thải từ lò giết mổ gia cầm, *Rhodopseudomonas faecalis* và *R. palustris* có thể loại bỏ tới 88% COD hòa tan [90]. Hülsen và cộng sự (2018) nghiên cứu trên nước thải chế biến gia cầm và thịt đỏ ghi nhận sinh khối VKTQH đạt hiệu suất cao, đồng thời đồng hóa hiệu quả nitơ và photpho [91].

- **Phòng bệnh trong nuôi trồng thủy sản**

Sang-Seob Lee và cộng sự (2009) cho thấy chủng VKTQH *Rhodobacter capsulatus* khi nuôi cấy ở môi trường Lascelles trong điều kiện hiếu khí tối có thể sinh chất kháng khuẩn mạnh nhất trong khoảng pH từ 6,8 – 8,0 [92]. Có nhiều nghiên cứu bổ sung một lượng nhỏ VKTQH vào thức ăn các loài thủy sản đem lại giá trị kinh tế cao như cá rô phi sông Nile, cá bống đá, cá chêm và cá mahseer (*Tor tambroides*) sử dụng các chủng nuôi thuần như *Rhodovulum*, *Marichromatium* hoặc *Rhodopseudomonas* được nuôi trên môi trường nhân tạo. Kết quả giúp tăng đáng kể tỷ lệ sống cũng như tốc độ tăng trưởng ở giai đoạn phát triển sớm của vật nuôi, mặc dù một số công thức thức ăn chưa cân đối về lipid hoặc protein [93], [94], [95], [96].

Theo Shapawi và cộng sự (2012) khi bổ sung 0,3% sinh khối vi khuẩn vào khẩu phần ăn đã mang lại hiệu quả thể hiện qua sự gia tăng tốc độ sinh trưởng, nâng cao tỉ lệ sống và cải thiện hệ số chuyển hóa thức ăn [96]. Loo và cộng sự (2015) bổ sung VKTQH trực tiếp cho cá bống đá giai đoạn ấu trùng thông qua trộn với nước nuôi hoặc thông qua chuỗi thức ăn trung gian đều giúp cải thiện tỷ lệ sống [95]. Tác động tích cực này cũng được ghi nhận trên cá diếc khi bổ sung VKTQH ở mức

0,1% khẩu phần [97], cũng như trên cá chạch, cá vàng, cá chép, sò ark và cá ayu, là những loài có khả năng tiêu thụ vi khuẩn quang dưỡng ngay sau khi nở [35].

Nhìn chung, các nghiên cứu cho thấy VKTQH mang lại hiệu quả tích cực khi được sử dụng nồng độ thấp, chủ yếu thể hiện vai trò như một probiotic. Nhờ những đặc tính sinh học có lợi, VKTQH đang được quan tâm ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản, chúng vừa làm nguồn thức ăn tự nhiên, vừa sinh tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn có thể góp phần kiểm soát mầm bệnh trong ao nuôi. Điều này không chỉ giúp giảm chi phí đầu vào mà còn hạn chế sử dụng kháng sinh, từ đó nâng cao chất lượng và mức độ an toàn của sản phẩm thủy sản [98].

## CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

#### 2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Các chủng VKTQH được phân lập từ mẫu đất và nước được thu tại các ruộng lúa nước, ruộng lúa nhiễm mặn và nhiễm phèn sau gieo sạ và cấy từ 1,5 đến 2 tháng tại Nam Định, Việt Nam.

#### 2.1.2. Hóa chất, môi trường nghiên cứu

- **Hóa chất:**

Hóa chất được dùng cho mục đích nghiên cứu bao gồm các hóa chất phổ biến dùng để pha môi trường nuôi cấy vi sinh vật, chúng được sản xuất ở Việt Nam và Trung Quốc. Các hóa chất có yêu cầu độ tinh khiết cao hơn được sử dụng có nguồn gốc từ hãng Merck (Đức).

- **Môi trường nghiên cứu:**

- Môi trường phân lập và nuôi cấy VKTQH trong phòng thí nghiệm là môi trường DSMZ-27 bao gồm các thành phần:

**Bảng 2.1. Thành phần môi trường DSMZ-27 (cho 1 lít)**

Thành phần	Hàm lượng
Cao nấm men	0,3 g
NH <sub>4</sub> Cl	0,4 g
NaCl	15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,4 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,05 g
Dung dịch nguyên tố vi lượng	1 mL
Dung dịch vitamin	1 mL
Natri axetat	1 g
Axit succinic	0,5 g
Nước cất	Bổ sung vừa đủ đến 1000 mL

*Dung dịch nguyên tố vi lượng (cho 1 lít) gồm: 6,5 mL HCl (25%); 1,5 g FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O; 0,3 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,03g MnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,2 g CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 0,1 g ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 17 mg CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 24 mg NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 36 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O.*

*Dung dịch vitamin (cho 1 lít) gồm:* Thiamine: 500 µg; Niacin: 500 µg; Biotin: 15 µg.

Tất cả môi trường và dụng cụ khử trùng ở 121 °C, 30 phút trước khi sử dụng.

Đối với môi trường DSMZ-27 thạch chứa 2% agar.

- Môi trường không chứa nguồn nitơ dùng để đánh giá VKTQH có khả năng cố định N<sub>2</sub>, được điều chỉnh nhẹ từ công thức của Vatsala và cộng sự (2011) [99] gồm các thành phần sau:

**Bảng 2.2. Thành phần môi trường không chứa nguồn nitơ (cho 1 lít)**

Thành phần	Hàm lượng
Natri axetat	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,9 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6 g
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
FeSO <sub>4</sub>	0,0122 g
EDTA	0,075 g
CaCl <sub>2</sub>	0,01 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01 g
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	2,8 mg
ZnSO <sub>4</sub>	0,75 mg
CuSO <sub>4</sub>	0,24 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,016 mg
Biotin	0,001 mg
Nước cất	Bổ sung vừa đủ đến 1000 mL

Độ pH được điều chỉnh ở mức 6,8 – 7,0.

- Môi trường nuôi cấy glutamate-acetate (GA) trong đó L-sodium glutamate được thay thế bởi 1 mM L-tryptophan để đánh giá khả năng sản sinh IAA.

**Bảng 2.3. Thành phần môi trường GA (cho 1 lít)**

<b>Thành phần</b>	<b>Hàm lượng</b>
L-glutamate	3,8 g
Natri acetate monohydrate	5,44 g
Cao nấm men	2,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	53 mg
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,2 mg
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,2 mg
Biotin	0,01 mg
Sắt citrate	2,5 mg
Niacin	1,0 mg
Nước cất	Bổ sung vừa đủ đến 1000 mL

- *Thuốc thử Nessler*: Kali iodua (KI): 10 g, HgCl<sub>2</sub> bão hòa: 20 mL, KOH: 30 g, nước cất: bổ sung vừa đủ đến 200 mL, bảo quản trong chai sẫm màu, tránh sáng.
- *Thuốc thử Salkowski*: lấy 2 mL dung dịch FeCl<sub>3</sub> 0,5 M cho vào 98 mL dung dịch HClO<sub>4</sub> 35%, sau đó lắc đều để thu được 100 mL thuốc thử. Dung dịch sau khi pha được bảo quản trong chai thủy tinh có màu sẫm để tránh ánh sáng. Các thao tác được thực hiện trong tủ hút, sử dụng đầy đủ phương tiện bảo hộ do HClO<sub>4</sub> là axit có tính oxy hóa mạnh và nguy hiểm.

### 2.1.3. Thiết bị máy móc

Các thiết bị máy móc được sử dụng trong nghiên cứu thuộc Phòng Công nghệ sinh học môi trường và Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Gen - Viện Sinh học. Các thiết bị gồm: Tủ nuôi cấy vi sinh (Binder, infors, Đức); Bình khí nitơ

(Nga); Bóng đèn sợi đốt Rạng Đông (40W, 60W); Nồi khử trùng ướt (Trung Quốc); Tủ sấy khô (Trung Quốc); Máy quang phổ NOVASPEC II (Anh); UV-1650PC (Shimadzu, Nhật Bản); cân phân tích Mettler toledo (Thụy Sĩ) máy đo pH (Thommas Scientific, Mỹ), tủ lạnh thường GR-K22EA (Toshiba) và tủ lạnh sâu -20 (Alaska), box cấy Biocyt ESI Flufrance (Pháp), máy ảnh kỹ thuật số Canon (Nhật Bản).

## **2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.2.1. Thu thập mẫu chứa các chủng VKTQH**

Mẫu đất và mẫu nước được thu thập ngẫu nhiên ở các ruộng lúa nước, ruộng lúa nhiễm phèn tại xã Yên Trung, Ý Yên, Nam Định (20°24'04"N; 105°58'31"E), nhiễm mặn tại ven biển xã Giao Xuân, Giao Thủy, Nam Định (20°14'30"N; 106°28'31"E). Các mẫu đất được thu thập từ 0 – 20 cm tính từ bề mặt của đất, mẫu nước thu thập từ 0 – 50 cm tính từ bề mặt cột nước theo tiêu chuẩn TTCVN 7538-2:2007 cho đất và TCVN 6663-6:2018 cho nước. Mẫu thu được bảo quản trong thùng đựng mẫu trong vòng 24 giờ và đưa về phòng thí nghiệm.

### **2.2.2. Phân lập, nuôi cấy VKTQH**

#### **2.2.2.1. Làm giàu VKTQH**

Mẫu nước và đất thu từ ruộng lúa được đưa vào chai với tỷ lệ 1:1 (đối với mẫu nước) hoặc 9:1 (đối với mẫu đất), làm giàu trong các cột Winogradsky cải tiến là các chai nhựa trong, dạng hình trụ có đường kính 5 cm, chiều cao 35 cm. Sau đó làm đầy các chai bằng môi trường lỏng DSMZ-27, đậy kín và nuôi dưới điều kiện vi hiếu khí sáng (3000 lux) [100].

Sau khi xuất hiện các vệt màu đặc trưng của VKTQH có màu từ màu nâu vàng đến đỏ tím xuất hiện trên thành bình thì có thể sử dụng để phân lập VKTQH.

#### **2.2.2.2. Phân lập VKTQH không lưu huỳnh**

Sau khoảng một tuần, các vạch màu từ nâu vàng đến đỏ tím xuất hiện trên thành bình, đây là biểu hiện về sự có mặt sắc tố đặc trưng của VKTQH. Sử dụng que gạt tiến hành lấy mẫu từ vạch màu, phân lập trên đĩa petri có chứa môi trường thạch DSMZ-27 cải tiến, ủ ở điều kiện vi hiếu khí sáng với cường độ sáng ~3000 lux từ đèn sợi đốt. Sau khoảng thời gian từ 3 – 5 ngày thấy xuất hiện các khuẩn lạc tròn có màu nâu, hồng đến đỏ tím, làm sạch theo phương pháp cấy ria trên đĩa thạch để thu được đơn chủng và tiến hành ủ mẫu dưới điều kiện vi hiếu khí sáng [101].

### 2.2.2.3. Nuôi cấy VKTQH

Khuẩn lạc đơn của VKTQH được nuôi cấy trong các ống thủy tinh  $V=12$  mL chứa môi trường DSMZ-27 lỏng, khí được sục vào môi trường khoảng 17 – 20 mg/L qua màng lọc vô trùng, đậy kín và ủ ở nhiệt độ phòng (25 – 28 °C), chiếu ánh sáng liên tục (3000 lux). Khi sinh trưởng của chúng ở pha log đạt mật độ tế bào khoảng  $10^9$  CFU/mL thì đem cấy vào bình thí nghiệm khoảng với thể tích từ 5 – 10% (v/v) để đạt mật độ ban đầu  $OD_{800}$  khoảng 0,1 của các chủng VKTQH [101].

### 2.2.3. Đánh giá khả năng sinh trưởng và hình thái tế bào của VKTQH

Sau 7 ngày nuôi cấy, khả năng sinh trưởng của các chủng VKTQH đã phân lập được, sẽ được đánh giá bằng cách quan sát độ lớn khuẩn lạc của chúng khi mọc trên đĩa thạch hoặc xác định độ hấp thụ của dịch huyền phù tế bào tại bước sóng 800 nm vì trong tế bào của VKTQH Bchl có cực đại hấp thụ ở 800 nm và độ hấp thụ này tỷ lệ thuận với hàm lượng Bchl, do vậy cũng sẽ tỷ lệ thuận với sinh khối của tế bào. Sử dụng máy quang phổ Novaspec II hoặc máy quang phổ UV-1650PC (Shimadzu, Nhật Bản) để đo các chỉ số này.

Hình thái tế bào của VKTQH được soi dưới kính hiển vi quang học OLYMPUS (Nhật Bản).

### 2.2.4. Tuyển chọn chủng VKTQH có khả năng cố định nitơ phân tử

Các chủng VKTQH được nuôi trong bình thủy tinh có chứa môi trường DSMZ-27 không chứa nguồn nitơ với tỉ lệ thể tích giống ban đầu là 10% (v/v) (mật độ tế bào giống đạt khoảng  $10^9$  CFU/mL, khí nitơ được sục vào môi trường khoảng 17 – 20 mg/L qua màng lọc vô trùng, điều kiện vi hiếu khí sáng (3000 lux), tại nhiệt độ phòng, trong 48 giờ. Sau đó thu dịch nuôi cấy và ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 15 phút. Lấy 0,5mL dịch nổi cho phản ứng với vài giọt thuốc thử Nessler để đánh giá khả năng sản sinh  $NH_4^+$  theo phương pháp của Sakpicom và cộng sự (2016) [45]. Thuốc thử này chứa muối kiềm của thủy ngân ( $HgI_4^{2-}$ ) trong môi trường kiềm, khi phản ứng với  $NH_4^+$  sẽ tạo thành phức chất có màu từ vàng nhạt đến nâu. Mức độ đổi màu phản ánh hàm lượng  $NH_4^+$ : không xuất hiện màu cho thấy mẫu không có  $NH_4^+$ ; màu vàng nhạt biểu thị hàm lượng thấp; màu vàng đậm cho hàm lượng trung bình; và màu nâu cho hàm lượng cao. Sự hình thành màu được đo quang ở bước sóng 420 nm với cường độ hấp thụ sẽ tỉ lệ thuận với nồng độ  $NH_4^+$  trong dung dịch.

### 2.2.5. Tuyển chọn chủng VKTQH có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng IAA

Việc đánh giá khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng IAA của VKTQH sử dụng theo phương pháp của Ahmad và cộng sự (2005) [102].

VKTQH được nuôi cấy trong môi trường GA cải tiến, trong đó glutamate-Na được thay thế bằng tryptophan 1mM để kích thích tổng hợp IAA. Quá trình nuôi được tiến hành trong điều kiện vi hiếu khí chiếu sáng (3000 lux), ở điều kiện nhiệt độ phòng. Sau 5 ngày nuôi cấy, tiến hành thu dịch nuôi và ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 15 phút. Lấy 1 mL dịch nổi cho phản ứng với 2 mL thuốc thử Salkowski (gồm 2% FeCl<sub>3</sub> 0,5M trong dung dịch HClO<sub>4</sub> 35%), ủ trong tối ở nhiệt độ phòng trong 25 phút. Tiến hành đo tại bước sóng 530 nm bằng máy quang phổ để xác định độ hấp thụ của dung dịch, nồng độ IAA được tính dựa trên đường chuẩn xây dựng bằng IAA tinh khiết.

### 2.2.6. Khảo sát các đặc điểm sinh học của các chủng VKTQH chọn lựa

#### 2.2.6.1. Xác định mật độ tế bào VKTQH

Mật độ của VKTQH được đánh giá bằng việc đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 800 nm (OD<sub>800</sub>) sử dụng máy quang phổ Novaspec II hoặc UV-1650PC, dựa trên đặc tính hấp thụ cực đại của Bchl tại 800 nm. Mật độ VKTQH còn được xác định bằng phương pháp pha loãng thập phân (10<sup>-1</sup> – 10<sup>-10</sup>), nhỏ 50 µL mẫu lên môi trường DSMZ-27, dàn đều và ủ trong điều kiện vi hiếu khí sáng. Số khuẩn lạc được đếm sau 5 – 7 ngày [101] và tính theo công thức:

$$\frac{\text{CFU}}{\text{mL}} = \frac{a \times 1}{v \times n}$$

Trong đó: n là hệ số pha loãng của mẫu,

a là số khuẩn lạc đếm được trên đĩa môi trường thạch,

v tương ứng với thể tích mẫu đem cấy,

1/v được dùng để quy đổi thể tích mẫu về đơn vị 1 mL.

#### 2.2.6.2. Phương pháp nghiên cứu hệ sắc tố của VKTQH

Các chủng được nuôi trong môi trường DSMZ-27 lỏng dưới điều kiện vi hiếu khí sáng. Sau 4 ngày, dịch nuôi được thu để đo phổ hấp thụ từ 400 – 900 nm [103] bằng máy quang phổ NavaspecII (Anh) và UV-1650PC (Shimadzu, Nhật Bản) để xác định sự hiện diện của bacteriochlorophyll.

Nhuộm Gram theo phương pháp của Hans Christian Gram (1884) [104], *Escherichia coli* và *Bacillus subtilis* được dùng làm đối chứng.

### **2.2.6.3. Phương pháp đánh giá khả năng sử dụng nguồn cacbon và chất cho điện tử khác nhau của VKTQH**

Các chủng VKTQH đã lựa chọn được nuôi trong môi trường DSMZ-27 với nguồn cacbon gốc natri acetate được thay thế bằng một số nguồn khác (với cùng hàm lượng 1g/L) như: Acetate, Succinate, Formate, Tartate, Citrate, Glycerol, Glucose, Methanol, Ethanol, Manitol, Sorbitol, Propionate, Sulfide, Glutamate, Isopropanol. Thí nghiệm ở hai điều kiện vi hiếu khí sáng và hiếu khí tối. Khả năng sinh trưởng của các chủng thí nghiệm được đánh giá sau 7 ngày ủ mẫu bằng cách xác định độ hấp thụ của dịch huyền phù tế bào tại bước sóng 800 nm. Sử dụng máy quang phổ Novaspec II hoặc máy quang phổ UV-1650PC (Shimadzu, Nhật Bản) để đo các chỉ số này.

### **2.2.6.4. Phương pháp tách chiết DNA genome của VKTQH**

VKTQH được nuôi cấy trong môi trường DSMZ-27, kỵ khí sáng khoảng 3–5 ngày đến khi  $OD_{800} \approx 0,8 - 1$  tiến hành tách chiết DNA.

1. Hút khoảng 1000 – 1200  $\mu$ L dịch nuôi cấy vào các ống 1,5 mL, ly tâm 10.000 rpm, 5 phút.
2. Thu cặn tế bào ở đáy ống và chuyển sang ống mới, Trong mỗi ống, trình tự các bước tiếp theo được mô tả trong các công bố của (Lê Trần Bình và cộng sự, 2003; Sambrook J and Russell, 2001) [105], [106], thêm 576  $\mu$ L TE, để trên khay lạnh và lắc đều để tan hết tế bào.
3. Thêm 30  $\mu$ L SDS 10%, lắc nhẹ tại nhiệt độ phòng.
4. Thêm 3  $\mu$ L proteinase K (10 mg/mL), rồi ủ mẫu ở 37 °C, 1 giờ.
5. Thêm 180  $\mu$ L NaCl 5M, lắc nhẹ, mẫu ở 65 °C, 10 phút.
6. Loại bỏ protein bằng hỗn hợp chloroform/isoamylalcohol 24:1 (v/v), ly tâm 12.000 rpm, 10 phút, thu dịch nổi và chuyển sang ống 1,5 mL mới.
7. Tiếp tục loại protein bằng phenol/chloroform/isoamylalcohol tỷ lệ 25:24:1 (v/v), ly tâm 12000 rpm, 10 phút, thu dịch nổi và chuyển sang 1,5 mL mới.
8. DNA được rửa bằng ethanol tuyệt đối (gấp 2 lần thể tích) ở 4 °C, 15 phút, ly tâm 12000 rpm, 10 phút, dùng máy hút chân không Mi-vac 110V làm khô hết cồn.
9. Hòa tan rửa DNA bằng nước sinh học phân tử và bảo quản mẫu ở -20°C.

### 2.2.6.5. Kỹ thuật PCR

- Trên cơ sở đoạn DNA khuôn và cặp mồi đã được thiết kế, quá trình tổng hợp DNA được tiến hành như sau:
  - Trình tự mồi: 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') và 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'), khuếch đại gen 16S rDNA
  - Thành phần 1 phản ứng (tổng thể tích 25  $\mu$ L):

Thành phần	Thể tích
10X PCR buffer	2,5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,5 $\mu$ L
dNTP (2.5 mM)	2 $\mu$ L
Taq DNA polymerase (5 U/ $\mu$ L)	0,25 $\mu$ L
Forward primer (10 ng)	1 $\mu$ L
Reverse primer (10 ng)	1 $\mu$ L
Nước sinh học phân tử	13,75 $\mu$ L
DNA khuôn (100 ng)	2 $\mu$ L

- Chu trình nhiệt :

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
95°C	5 phút	1
95°C	50 giây	30
55°C	30 giây	
72°C	2 phút	
72°C	10 phút	1
4°C	$\infty$	-

### 2.2.6.6. Điện di DNA trên gel Agarose

Chuẩn bị gel agarose 0,8%, đặt tạo giếng và để đông. Trộn 5 $\mu$ L mẫu DNA với 2  $\mu$ L loading dye, rồi tra mẫu vào các giếng cùng với một giếng là ladder. Điện di ở 100 V trong 35 phút trong đệm TE. Sau khi điện di, gel được nhuộm Ethidium Bromide trong khoảng 5 phút, rửa bằng nước sạch và quan sát dưới tia UV 254 nm và chụp ảnh ghi nhận kết quả [105], [106].

### **2.2.6.7. Giải trình tự DNA**

Trình tự DNA được xác định theo phương pháp Sanger [107] bằng máy ABI Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) tại Phòng Thí nghiệm Công nghệ Gene, Viện Sinh học.

Các trình tự thu được được phân tích bằng phần mềm BLAST (NCBI) và DNASTAR để xác định các loài có quan hệ gần. Phân tích đa trình tự và xây dựng cây phát sinh loài bằng phần mềm MEGA, ClustalX, và PHYLIP.

### **2.2.7. Đánh giá ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng, cố định nitơ phân tử và sản sinh chất kích thích IAA của VKTQH**

#### **2.2.7.1. Ảnh hưởng của pH**

Để đánh giá sự ảnh hưởng của pH môi trường đến khả năng cố định nitơ của các chủng đã chọn, tiến hành nuôi cấy các chủng này trong môi trường không chứa nguồn nitơ, có các độ pH 4, 5, 6, 7, 8, 9. Sau đó tiến hành sục khí N<sub>2</sub> vào môi trường khoảng 17 – 20 mg/L, nuôi ở điều kiện chiếu sáng (3000 lux), tại nhiệt độ phòng. Sau 48 giờ, dịch nuôi cấy được ly tâm 8000 rpm, 15 phút và đánh giá hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> bằng thuốc thử Nessler [45].

Khả năng sinh trưởng và sản sinh IAA của VKTQH được nuôi cấy trong môi trường GA cải tiến với pH tương tự theo phương pháp của Ahmad và cộng sự (2005) [102]. Tiến hành đánh giá như mục 2.2.5.

#### **2.2.7.2. Ảnh hưởng của nồng độ muối**

Nuôi cấy các chủng đã lựa chọn trên môi trường không chứa nguồn nitơ, có các nồng độ muối: 0%; 0,5%; 1%; 1,5%; 2%; 2,5%; 3%. Sau đó tiến hành sục khí N<sub>2</sub> vào môi trường khoảng 17 – 20 mg/L, nuôi ở điều kiện chiếu sáng (3000 lux), tại nhiệt độ phòng, trong 48 giờ. Dịch nuôi cấy được ly tâm 8000 rpm, 15 phút và đánh giá khả năng sản sinh ra NH<sub>4</sub><sup>+</sup> bằng thuốc thử Nessler [45].

Đánh giá khả năng sinh trưởng và sản sinh IAA của VKTQH được nuôi cấy trong môi trường GA cải tiến với các độ nồng độ muối tương tự [102].

#### **2.2.7.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ**

Để đánh giá sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng cố định nitơ của các chủng đã lựa chọn, nuôi cấy các chủng này trên môi trường không chứa nguồn nitơ có các khoảng nhiệt độ: 15 – 17 °C, 25 – 30 °C, 40 – 45 °C. Sau đó tiến hành sục khí N<sub>2</sub> vào môi trường khoảng 17 – 20 mg/L, nuôi ở điều kiện chiếu sáng trong 48 giờ. Dịch nuôi cấy được ly tâm 8000 rpm, 15 phút và ghi nhận hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> [45].

Đánh giá khả năng sinh trưởng và sản sinh IAA của VKTQH được nuôi cấy trong môi trường GA cải tiến với các khoảng nhiệt độ tương tự [102].

### **2.2.8. Phân tích thống kê**

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Giá trị trung bình và độ lệch chuẩn được trình bày dưới dạng Mean  $\pm$  SD. Phân tích phương sai một yếu tố (One-way ANOVA) được thực hiện bằng Microsoft Excel 2016. Khi ANOVA cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, các nghiệm thức được so sánh bằng phép thử hậu nghiệm Duncan trên phần mềm IBM SPSS Statistics 16.0 ở mức ý nghĩa  $p < 0,05$ .

## CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Làm giàu và phân lập các chủng VKTQH

Các mẫu đất và nước sau khi lấy từ các ruộng lúa cây được từ 1,5 đến 2 tháng được đóng chai và bảo quản lạnh, rồi được đưa về phòng thí nghiệm để làm giàu theo phương pháp 2.2.2.1. Sau 7 ngày quan sát trên thành chai nhựa thấy xuất hiện những vệt từ màu nâu vàng đến đỏ tía, những vệt màu đặc trưng cho sự xuất hiện VKTQH, từ các chai làm giàu này tiến hành phân lập các chủng VKTQH.



**Hình 3.1. Hình ảnh một số VKTQH làm giàu từ mẫu đất và nước sau 7 ngày**

Kết quả ở Hình 3.1 cho thấy trên thành các chai nuôi cấy xuất hiện các vệt màu từ nâu vàng đến đỏ tía. Sự xuất hiện của các vệt màu đặc trưng này cho thấy trong môi trường làm giàu đã có sự phát triển của VKTQH.

Lấy mẫu từ vạch màu hoặc dịch nuôi, rồi phân lập trên đĩa thạch DSMZ 27 cải tiến, ở điều kiện vi hiếu khí sáng có sục khí nitơ (3000 lux), sau khoảng 3 – 5 ngày thấy sự xuất hiện các khuẩn lạc có màu nâu, nâu vàng hồng đến đỏ tía. Từ các mẫu đất và mẫu nước thu thập từ các ruộng lúa nước, ruộng lúa nước nhiễm mặn và nhiễm phèn tại Nam Định, chúng tôi đã phân lập được 24 chủng VKTQH. Hình thái, màu sắc khuẩn lạc và kích thước của chúng được trình bày ở Bảng 3.1.

**Bảng 3.1. Đặc điểm hình thái các chủng VKTQH sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường DSMZ-27 thạch**

STT	Ký hiệu chủng	Đặc điểm khuẩn lạc	Hình thái và hình thức sinh sản của tế bào
1	GT <sub>1</sub>	Hình tròn, lồi, bóng, rìa phẳng, nâu vàng, d = 0,5 – 1 mm	Hình cầu, sinh sản nhân đôi
2	GT <sub>2</sub>	Hình tròn, lồi, bóng, rìa trong, vàng xanh, d = 1,2 – 1,9 mm	Hình que ngắn, sinh sản nảy chồi
3	GT <sub>3</sub>	Mọc loang, nhót, đỏ nâu d = 0,8 – 1,0 mm	Hình que ngắn, sinh sản nhân đôi
4	GT <sub>4</sub>	Hình tròn, lồi, rìa phẳng, nâu vàng, d = 1,1 – 1,3 mm	Hình que ngắn, sinh sản nảy chồi
5	GT <sub>5</sub>	Hình tròn, lồi, nhót, rìa loang, đỏ nâu, d = 0,8 – 1 mm	Hình trứng, sinh sản nhân đôi
6	GT <sub>6</sub>	Hình tròn, bề mặt lồi, tròn, bóng, rìa phẳng, nâu đỏ, d = 1 – 1,5 mm	Hình que, sinh sản nảy chồi
7	GT <sub>7</sub>	Không tròn, rìa răng cưa, loang, nhót, vàng nâu, d = 0,5 – 1 mm	Hình que, không quan sát thấy hình thức sinh sản
8	GT <sub>8</sub>	Không lồi, có nhân, rìa răng cưa, vàng xanh, d = 0,7 – 1,3 mm	Hình cầu, sinh sản nhân đôi
9	GT <sub>9</sub>	Bề mặt lồi, khô, rìa răng cưa, không nhân, đỏ tía, d = 0,3 – 0,6mm	Hình trứng, sinh sản nhân đôi
10	GT <sub>10</sub>	Hình tròn, bề mặt lồi, rìa trong, đỏ nâu, d = 0,9 – 1,2 mm	Hình trứng, sinh sản nhân đôi
11	GT <sub>11</sub>	Không tròn, loang viền vàng, hồng nhạt, d = 0,8 – 1,0 mm	Hình ovan, sinh sản nhân đôi
12	GT <sub>21</sub>	Mọc loang, mép viền răng cưa, hồng nhạt, d = 0,8 – 1,0 mm	Hình cầu, sinh sản nhân đôi
13	GT <sub>31</sub>	Hình tròn, bề mặt nhẵn bóng, rìa trong đỏ tía, d = 0,2 – 0,8 mm	Hình ovan, sinh sản nhân đôi
14	Y <sub>1</sub>	Hình tròn, bề mặt lồi, khô, rìa phẳng đỏ đậm, d = 1,0 – 1,5 mm	Hình cầu, sinh sản nhân đôi
15	Y <sub>2</sub>	Hình tròn, bề mặt lồi, khô, rìa phẳng đỏ tía, d = 0,1 – 0,2 mm	Hình que, sinh sản nảy chồi

16	Y <sub>3</sub>	Hình tròn, bề mặt lồi, rìa trong, đỏ tía, d = 0,5 – 0,8 mm	Hình que, sinh sản nảy chồi
17	Y <sub>4</sub>	Mọc loang, nhót nâu vàng	Hình cầu, sinh sản nhân đôi
18	Y <sub>5</sub>	Hình tròn, rìa trong, nâu vàng d = 0,3 – 0,8 mm	Hình ovan, sinh sản nhân đôi
19	Y <sub>6</sub>	Hình tròn, bề mặt nhẵn bóng, rìa trong, hồng đậm, d = 0,3 – 0,8 mm	Hình que, sinh sản nảy chồi
20	Y <sub>7</sub>	Không tròn, bề mặt lồi, nhót, mép răng cưa, nâu đỏ, d = 0,3 – 0,5 mm	Hình ovan, sinh sản nhân đôi
21	Y <sub>8</sub>	Hình tròn, mép tròn, trong, đỏ tía, d = 1,2 – 1,5 mm	Hình que, sinh sản nảy chồi
22	Y <sub>9</sub>	Hình tròn, rìa trong, hồng nhạt, d = 1,8 – 2,2 mm	Hình cầu, sinh sản nhân đôi
23	Y <sub>11</sub>	Mọc loang, nhót, nâu đỏ, d = 1,8 – 2,2 mm	Hình que, sinh sản nhân đôi
24	Y <sub>12</sub>	Hình tròn, rìa trong, nâu vàng, d = 1,8 – 2,2 mm	Hình cầu, sinh sản nhân đôi

Bảng 3.1 cho thấy các chủng VKTQH phân lập được có sự đa dạng về màu sắc, kích thước, hình dáng. Khuẩn lạc chủ yếu có dạng tròn hoặc mọc loang, bề mặt lồi hoặc nhẵn bóng, rìa phẳng, rìa trong hoặc răng cưa, với kích thước dao động từ khoảng 0,1 đến 2,2 mm. Màu sắc khuẩn lạc khá phong phú, bao gồm nâu, nâu vàng, nâu đỏ, hồng.

Hình thái tế bào cũng tương đối đa dạng, gồm dạng hình que, cầu và ovan. Hình thức sinh sản chủ yếu bằng cách phân đôi, một số chủng là nảy chồi.

Không quan sát thấy sự xuất hiện của các giọt lưu huỳnh bên trong tế bào. Đặc điểm này cho thấy các chủng VKQTH phân lập được đều gần với họ *Rhodospirillaceae*.

### 3.2. Tuyển chọn chủng VKTQH có khả năng cố định nitơ phân tử

Tuyển chọn các chủng VKTQH có khả năng cố định nitơ phân tử bằng cách đánh giá khả năng sinh NH<sub>4</sub><sup>+</sup> trong môi trường không chứa nguồn nitơ (pH 6,8 – 7) ở điều kiện vi hiếu khí sáng (3000 lux) sau 48 giờ.

Quá trình cố định nitơ của VKTQH không lưu huỳnh diễn ra hiệu quả trong điều kiện kỵ khí nghiêm ngặt, do hoạt tính của enzyme nitrogenase rất nhạy cảm với oxy [108]. Tuy nhiên, điều kiện thực địa các ruộng lúa không phải là môi trường hoàn toàn kỵ khí, ngay cả đối với các ruộng lúa nước. Vì vào ban ngày, oxy sinh ra từ quá trình quang hợp của cây lúa có thể được vận chuyển xuống rễ, khuếch tán vào vùng rễ và trầm tích xung quanh. Mặc dù một phần oxy bị tiêu thụ trong các quá trình oxy hóa nhưng vẫn còn lượng oxy dư làm ngăn cản việc hình thành môi trường kỵ khí tuyệt đối [109]. Nhằm phản ánh chính xác hơn điều kiện thực địa, nghiên cứu này đã khảo sát khả năng cố định nitơ của các chủng VKTQH trong điều kiện vi hiếu khí có ánh sáng.

Kết quả khả năng sản sinh  $\text{NH}_4^+$  được thể hiện trong Bảng 3.2:

**Bảng 3.2. Khả năng sản sinh  $\text{NH}_4^+$  (mg/L) của 24 chủng VKTQH trong môi trường không chứa nguồn nitơ ở điều kiện vi hiếu khí sáng**

STT	Chủng	Nồng độ $\text{NH}_4^+$ (mg/L)
1	GT <sub>1</sub>	2,63±0,92 <sup>cd</sup>
2	GT <sub>2</sub>	3,05±0,60 <sup>cd</sup>
3	GT <sub>3</sub>	3,97±1,03 <sup>def</sup>
4	<b>GT<sub>4</sub></b>	<b>4,19±0,73<sup>def</sup></b>
5	GT <sub>5</sub>	00±0,00 <sup>a</sup>
6	GT <sub>6</sub>	0,33±0,10 <sup>a</sup>
7	GT <sub>7</sub>	2,70±1,05 <sup>cd</sup>
8	GT <sub>8</sub>	3,07±1,01 <sup>cde</sup>
9	GT <sub>9</sub>	3,80±0,90 <sup>def</sup>
10	<b>GT<sub>10</sub></b>	<b>4,34±0,85<sup>ef</sup></b>
11	GT <sub>11</sub>	3,02 ± 1,04 <sup>cde</sup>
12	GT <sub>21</sub>	0,40± 0,01 <sup>a</sup>
13	GT <sub>31</sub>	3,67±0,99 <sup>def</sup>
14	Y <sub>1</sub>	0,85±0,18 <sup>ab</sup>
15	Y <sub>2</sub>	1,29±0,77 <sup>ab</sup>
16	<b>Y<sub>3</sub></b>	<b>4,15±0,64<sup>def</sup></b>
17	Y <sub>4</sub>	3,77±0,85 <sup>cdef</sup>
18	Y <sub>5</sub>	3,54±0,71 <sup>def</sup>
19	Y <sub>6</sub>	3,55±0,95 <sup>def</sup>
20	Y <sub>7</sub>	3,72± 0,67 <sup>cdef</sup>
21	Y <sub>8</sub>	2,40±0,89 <sup>cd</sup>

22	Y <sub>9</sub>	3,94±0,94 <sup>def</sup>
23	Y <sub>11</sub>	<b>4,63±0,71<sup>f</sup></b>
24	Y <sub>12</sub>	2,12±0,78 <sup>bc</sup>

*Chú thích: Trong cùng một cột, các giá trị mang các chữ cái thường khác nhau (a, b, c, d, e, f) biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê (phân tích phương sai một nhân tố – ANOVA và phân tích hậu nghiệm bằng phép thử Duncan,  $p < 0,05$ ).*

Kết quả thu được ở Bảng 3.2 cho thấy 23/24 chủng VKTQH có khả năng cố định nitơ ở điều kiện vi hiếu khí sáng được thể hiện qua sự tích lũy NH<sub>4</sub><sup>+</sup> trong môi trường nuôi cấy. Tuy nhiên, mức độ cố định nitơ khác nhau giữa các chủng.

Trong số 24 chủng, môi trường nuôi cấy của chủng GT<sub>5</sub> không phát hiện NH<sub>4</sub><sup>+</sup> chứng tỏ không có khả năng cố định nitơ phân tử. 20 chủng có khả năng sản sinh NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ở mức trung bình (từ 1,29±0,77 đến 4,63±0,71 mg/L NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), ba chủng sản sinh ở mức thấp là: GT<sub>6</sub>, GT<sub>21</sub>, Y<sub>1</sub>. Đặc biệt, 4 chủng thể hiện khả năng cố định nitơ cao khác biệt rõ rệt so với các chủng còn lại đạt trên 4 mg/L: GT<sub>4</sub> (4,19±0,73), GT<sub>10</sub> (4,34±0,85), Y<sub>3</sub> (4,15±0,64), Y<sub>11</sub> (4,63±0,71). Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại ( $p \leq 0,05$ ).

Kết quả này phù hợp với những nghiên cứu của Nookongbut và cộng sự (2019) khi phân lập VKTQH từ vùng bùn than ở Thái Lan [110]. Các chủng phân lập được trong nghiên cứu hiện tại đã thể hiện khả năng cố định nitơ cao hơn sau 48 giờ trong điều kiện vi hiếu khí sáng. Tương tự, so với nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Hằng và cộng sự (2015), trong đó các chủng *Azotobacter* AZT1 và AZT7 được nuôi cấy trong môi trường lỏng Ashby bổ sung 2% glucose (pH 7,0) ở 30 °C trong 72 giờ, cho khả năng cố định nitơ lần lượt là 3,36 và 3,32 mg/L [111]. So với các nghiên cứu trước đây được thực hiện trong điều kiện tương tự, bốn chủng được tuyển chọn trong nghiên cứu này đều cho khả năng cố định nitơ cao hơn với hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> đều đạt trên 4 mg/L.

Theo nghiên cứu của Nguyễn Hữu Hiệp (2022), khi sàng lọc 25 chủng vi khuẩn môi trường lỏng Nfb không chứa nguồn nitơ trong thời gian 48 giờ, tất cả các chủng vi khuẩn cố định nitơ được phân lập từ rễ ngô đều có khả năng tổng hợp NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, với hàm lượng dao động từ 0,35 – 4,33 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L [112]. Khả năng sản sinh NH<sub>4</sub><sup>+</sup> này tương đương với các chủng VKQTH được phân lập trong nghiên cứu của chúng tôi.

Theo kết quả nghiên cứu của Phạm Thị Ngọc Lan và cộng sự (2020), hai chủng N55 và N96 thể hiện khả năng sinh trưởng và cố định nitơ mạnh trên môi trường lỏng Ashby. Hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> do hai chủng này tạo ra lần lượt đạt 21,14

mg/mL và 59,60 mg/mL [113]. Khả năng cố định nitơ phân tử của hai chủng này cao hơn hẳn so với các chủng VKTQH chúng tôi phân lập được.

Tại thời điểm 48 giờ sau nuôi cấy, khả năng cố định nitơ của các chủng đạt mức cao, thể hiện qua sự tích lũy  $\text{NH}_4^+$  trong môi trường. Tuy nhiên, sinh khối tế bào vẫn ở mức thấp do trong môi trường không chứa nguồn nitơ vô cơ, vi khuẩn buộc phải kích hoạt quá trình cố định  $\text{N}_2$  để đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng. Quá trình này do hệ enzyme nitrogenase xúc tác, tiêu tốn một lượng lớn ATP và chất khử, dẫn đến việc nguồn năng lượng nội bào được ưu tiên cho chuyển hóa  $\text{N}_2$  thành  $\text{NH}_4^+$  thay vì cho các quá trình sinh tổng hợp sinh khối.

Do đó, mặc dù hoạt động cố định nitơ diễn ra mạnh mẽ, tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn vẫn còn hạn chế, dẫn đến sự tích lũy sinh khối thấp. Bên cạnh đó,  $\text{NH}_4^+$  được tạo thành trước hết được sử dụng cho các nhu cầu chuyển hóa cơ bản của tế bào. Vì vậy, tại thời điểm 48 giờ, mặc dù khả năng cố định  $\text{N}_2$  đạt hiệu quả cao, sinh khối tế bào chưa phản ánh đầy đủ mức độ sinh trưởng, do đó không phù hợp để đánh giá sinh trưởng thông qua mật độ quang học ( $\text{OD}_{800}$ ).

### **3.3. Tuyển chọn chủng VKTQH có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng IAA**

Sau khi phân lập, 24 chủng VKTQH được nuôi cấy trong môi trường lỏng nhằm đánh giá khả năng sinh tổng hợp IAA. Mỗi chủng được cấy trong môi trường GA cải tiến, trong đó glutamate-Na được thay thế bằng tryptophan 1 mM để kích thích tổng hợp IAA với tỉ lệ thể tích mỗi mẫu và môi trường nuôi cấy là 1 : 9 (v/v). Mật độ tế bào ban đầu trong các bình thí nghiệm đạt khoảng  $10^9$  CFU/mL.

Các bình nuôi được đậy kín bằng nút cao su để duy trì điều kiện vi hiếu khí, đồng thời bố trí các bình đối chứng chỉ chứa môi trường vô trùng. Tất cả các mẫu được ủ dưới điều kiện chiếu sáng liên tục ở nhiệt độ phòng (25 – 30 °C) trong 5 ngày.

Hàm lượng IAA trong dịch nổi sau nuôi cấy được định lượng bằng thuốc thử Salkowski. Kết quả về khả năng sinh IAA của các chủng VKTQH sau 5 ngày nuôi trong điều kiện vi hiếu khí sáng được trình bày ở Bảng 3.3.

**Bảng 3.3. Khả năng sản sinh IAA và sinh trưởng của 24 chủng VKTQH ở điều kiện vi hiếu khí sáng**

STT	Chủng	OD <sub>800</sub>	Khả năng sản sinh IAA (µg/ml)
1	GT <sub>1</sub>	1,88±0,19	78,0±4,92 <sup>def</sup>
2	GT <sub>2</sub>	2,63±0,60	58,24±5,60 <sup>b</sup>
3	GT <sub>3</sub>	2,45±0,23	87,15±7,03 <sup>fg</sup>
4	GT <sub>4</sub>	2,48±0,35	188,96±6,73 <sup>k</sup>
5	GT <sub>5</sub>	1,65±0,24	73,05±4,05 <sup>cd</sup>
6	GT <sub>6</sub>	1,99±0,22	54,33±3,10 <sup>b</sup>
7	GT <sub>7</sub>	1,97±0,30	82,70±5,05 <sup>egh</sup>
8	GT <sub>8</sub>	2,07±0,30	90,07±6,01 <sup>g</sup>
9	GT <sub>9</sub>	2,31±0,25	83,80±4,90 <sup>egh</sup>
10	<b>GT<sub>10</sub></b>	<b>2,53±0,50</b>	<b>205,4±5,85<sup>l</sup></b>
11	GT <sub>11</sub>	2,04±0,27	67,98±5,04 <sup>c</sup>
12	GT <sub>21</sub>	1,98±0,19	0,00± 0,00 <sup>a</sup>
13	GT <sub>31</sub>	2,23±0,29	118,87±5,90 <sup>h</sup>
14	Y <sub>1</sub>	2,81±0,41	59,22±5,88 <sup>b</sup>
15	Y <sub>2</sub>	1,95±0,27	58,63±3,77 <sup>b</sup>
16	Y <sub>3</sub>	2,93±0,35	146,15±5,64 <sup>i</sup>
17	Y <sub>4</sub>	1,85±0,38	79,67±4,85 <sup>def</sup>
18	Y <sub>5</sub>	2,71±0,36	76,54±5,71 <sup>cde</sup>
19	Y <sub>6</sub>	2,55±0,29	0,00±0,00 <sup>a</sup>
20	Y <sub>7</sub>	2,05±0,31	0,00± 0,00 <sup>a</sup>
21	Y <sub>8</sub>	2,90±0,42	79,48±4,85 <sup>def</sup>
22	Y <sub>9</sub>	2,23±0,35	68,18±2,97 <sup>c</sup>
23	<b>Y<sub>11</sub></b>	<b>2,73±0,24</b>	<b>191,63±7,41<sup>k</sup></b>
24	Y <sub>12</sub>	2,81±0,34	81,81±3,78 <sup>def</sup>

*Chú thích: Trong cùng một cột, các giá trị mang các chữ cái thường khác nhau (a, b, c, d, e, f) biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê (phân tích phương sai một nhân tố – ANOVA và phân tích hậu nghiệm bằng phép thử Duncan,  $p < 0,05$ ).*

Kết quả ở Bảng 3.3 cho thấy cả 24 chủng VKTQH đều sinh trưởng tốt trong môi trường GA bổ sung L-tryptophan với giá trị OD<sub>800</sub> dao động từ 1,65±0,24 đến 2,93±0,35 chứng tỏ điều kiện nuôi cấy vi hiếu khí sáng phù hợp. Tuy nhiên, khả năng sinh IAA khác biệt rõ rệt giữa các chủng. Trong số các chủng khảo sát, có 21

chúng có khả năng sản sinh IAA với hàm lượng dao động từ  $54,34 \pm 3,13$  đến  $205,4 \pm 5,85$   $\mu\text{g/mL}$ , 3 chủng GT<sub>21</sub>, Y<sub>6</sub> và Y<sub>7</sub> không có khả năng sản sinh IAA.

Không có sự tương quan hoàn toàn giữa mật độ sinh trưởng và sinh IAA. Điều này cho thấy khả năng sản sinh IAA là đặc điểm sinh lý khác nhau ở từng chủng vi khuẩn.

Nổi bật, hai chủng GT<sub>10</sub> và Y<sub>11</sub> vừa sinh trưởng tốt vừa sản sinh IAA ở mức cao nhất, lần lượt đạt  $205,4 \pm 5,85$  và  $191,63 \pm 7,41$   $\mu\text{g/mL}$ . Sự khác biệt về hàm lượng IAA giữa các chủng là có ý nghĩa thống kê (ANOVA một nhân tố, phép thử Duncan,  $p < 0,05$ ).

Khả năng sản sinh IAA của các chủng trong nghiên cứu này cũng rất đáng kể, vượt mức  $63,11 - 73,87$  ppm mà Hoàng Kim Chi và cộng sự (2019) ghi nhận trên các dòng vi khuẩn vùng rễ nghệ [114] So với khả năng sản sinh IAA của nhóm VKQTH được phân lập từ một cánh đồng bị ô nhiễm Cd và Zn ở Thái Lan của Sakpirom và các cộng sự (2017), hàm lượng sản sinh IAA mà các chủng chúng tôi phân lập được cao hơn từ 25 đến 60 lần [45]. So với các loài vi khuẩn *Enterobacteria*, *Azotobacteria* và *Pseudomonas* được phân lập từ vùng đất rễ lúa ở Colombia bởi nhóm nghiên cứu Torres và cộng sự (2000) có mức IAA cao nhất là  $32,2$   $\mu\text{g/mL}$  [115], thì 21/24 chủng VKQTH của chúng tôi có khả năng sản sinh IAA cao hơn.

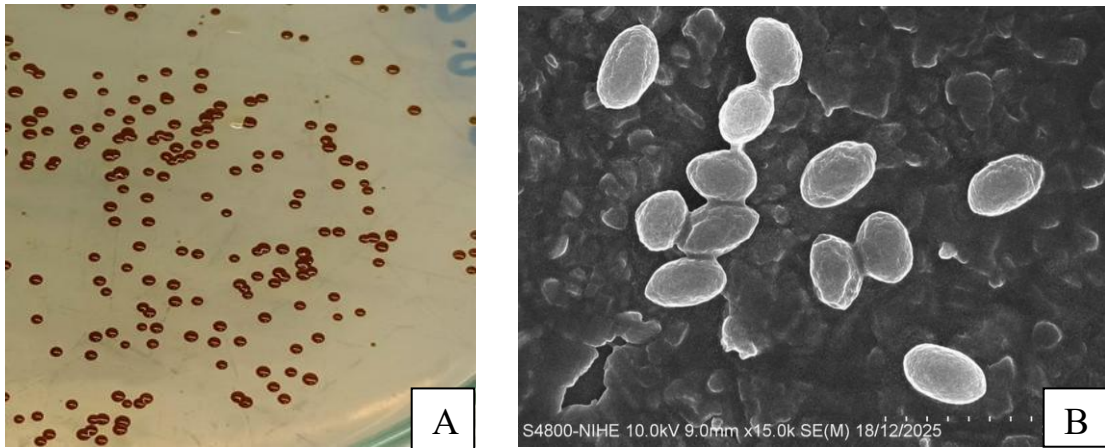
Kết hợp với kết quả đánh giá khả năng cố định nitơ phân tử, hai chủng GT<sub>10</sub> và Y<sub>11</sub> được lựa chọn là các chủng VKTQH có khả năng cố định N<sub>2</sub> và sản sinh IAA cao nhất được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu sâu hơn.

### **3.4. Đặc điểm sinh học cơ bản của các chủng VKTQH lựa chọn**

#### **3.4.1. Đặc điểm hình thái**

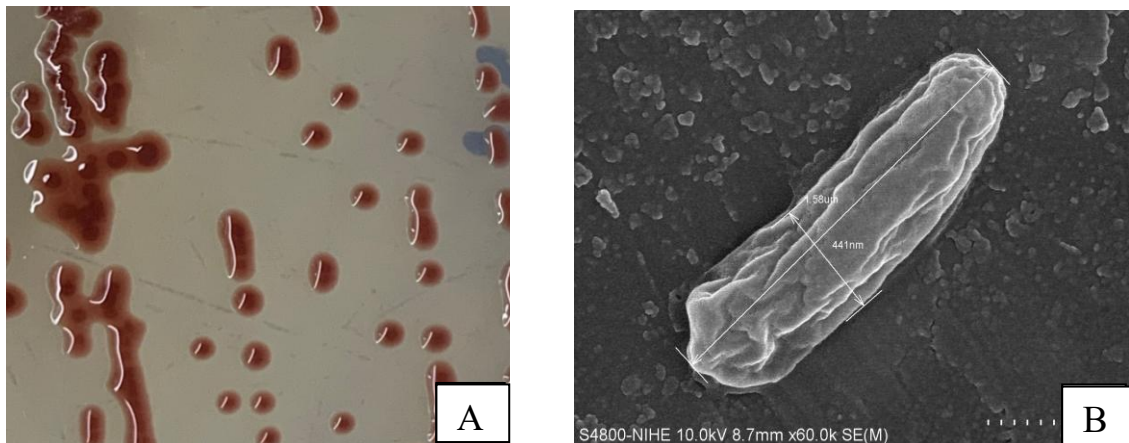
Để định danh các chủng VKTQH tiềm năng, bước đầu tiến hành nghiên cứu đặc điểm sinh học gồm hình thái khuẩn lạc, tế bào và khả năng tổng hợp bacteriochlorophylls (BChls).

Khuẩn lạc của chủng GT<sub>10</sub> có hình tròn, lồi, bề mặt lồi, rìa trong, màu nâu đỏ, với đường kính dao động từ  $0,9 - 1,2$  mm, dịch nuôi cấy có màu tương tự. Tế bào hình trứng, đơn bào, với kích thước chiều dài  $0,9 - 1,25$   $\mu\text{m}$  và chiều rộng  $0,6 - 0,7$   $\mu\text{m}$ . Các tế bào sinh sản bằng cách nhân đôi, không phát hiện thấy hạt lưu huỳnh nội bào.



**Hình 3.2. Hình dạng khuẩn lạc (A), hình dạng tế bào dưới kính hiển vi điện tử SEM (B) của chủng GT<sub>10</sub>**

Khuẩn lạc của chủng Y<sub>11</sub> mọc loang rộng, màu nâu đỏ, nhớt, đường kính 1,8 – 2,2 mm. Dịch nuôi cấy có màu đỏ tía. Tế bào hình que, chiều dài khoảng 1,4–1,58  $\mu\text{m}$ , chiều rộng khoảng 0,36 – 0,44  $\mu\text{m}$ , tồn tại ở dạng đơn bào hoặc liên kết thành chuỗi, sinh sản nhân đôi, không thấy hạt lưu huỳnh nội bào.



**Hình 3.3. Hình dạng khuẩn lạc (A), hình dạng tế bào dưới kính hiển vi điện tử SEM (B) của chủng Y<sub>11</sub>**

Hình thái tế bào, kích thước, kiểu phân chia tế bào và sự hiện diện của hạt lưu huỳnh được quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM; Model S-4800, Hitachi, Nhật Bản).

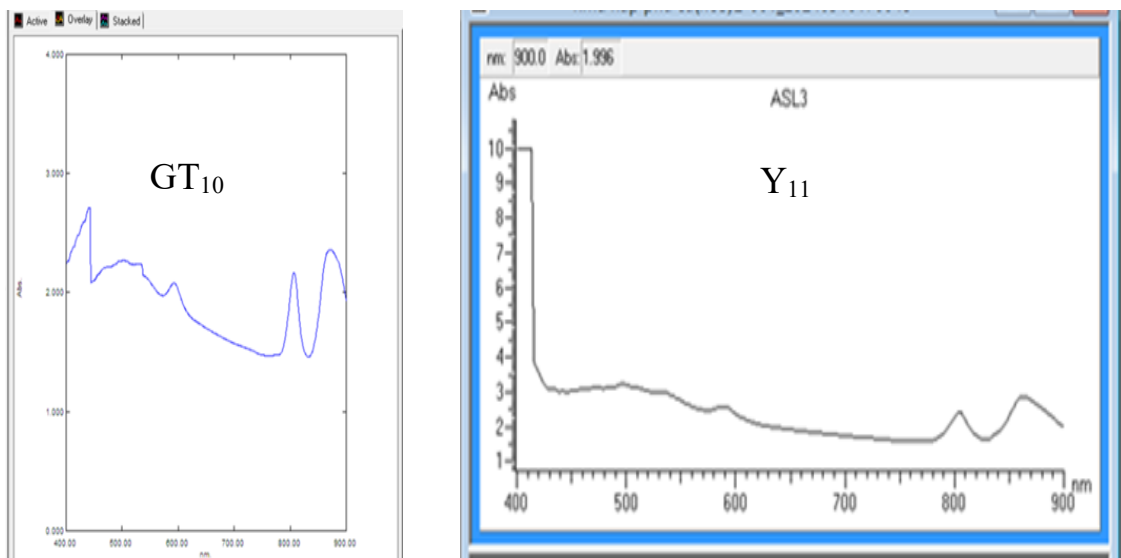
Cả 2 chủng GT<sub>10</sub> và Y<sub>11</sub> đều được xác định là vi khuẩn Gram âm.

Dựa trên hình thái khuẩn lạc, màu sắc dịch huyền phù tế bào và cấu trúc tế bào, chủng GT<sub>10</sub> giống chi *Rhodobacter*, chủng Y<sub>11</sub> giống chi *Rhodopseudomonas*.

### 3.4.2. Thành phần sắc tố quang hợp

Một đặc điểm tiêu biểu của VKTQH là khả năng tổng hợp BChl khi có ánh sáng. Do đó, hai chủng GT<sub>10</sub> và Y<sub>11</sub> được nuôi trong môi trường DSMZ-27 lỏng điều kiện vi hiếu khí chiếu sáng nhằm đánh giá đặc điểm sắc tố quang hợp. Sau 4 ngày nuôi cấy, tương ứng với giai đoạn giữa của pha sinh trưởng lũy thừa, hàm lượng BChl trong dịch huyền phù tế bào được đo quang phổ hấp thụ trong khoảng bước sóng từ 400 đến 900 nm bằng máy quang phổ Navaspec II (Anh) và UV-1650PC (Shimadzu, Nhật Bản).

Kết quả cho thấy phổ hấp thụ của chủng GT<sub>10</sub> xuất hiện các đỉnh đặc trưng tại 807 nm và 872 nm, trong khi chủng Y<sub>11</sub> có các đỉnh hấp thụ cực đại tại 804 nm và 862 nm. Sự xuất hiện các đỉnh hấp thụ trong vùng 800-900 nm là đặc trưng của bacteriochlorophyll a hiện diện trong màng tế bào chất của VKQTH.



Hình 3.4. Phổ hấp thụ của các chủng GT<sub>10</sub> và Y<sub>11</sub>

### 3.4.3. Khả năng sử dụng nguồn cacbon và chất cho điện tử

VKTQH có thể sử dụng được nhiều nguồn cacbon và chất cho điện tử khác nhau, một số nguồn cacbon đặc trưng có giá trị phân loại vi khuẩn. Chủng GT<sub>10</sub> và Y<sub>11</sub> được khảo sát khả năng sử dụng các nguồn cacbon và chất cho điện tử thay thế ở cùng nồng độ 1g/L.

Sự gia tăng mật độ tế bào được đánh giá dựa trên độ hấp thụ quang tại bước sóng 800 nm sau 7 ngày nuôi cấy ở điều kiện vi hiếu khí sáng và hiếu khí tối. Mỗi mẫu thí nghiệm lặp lại 3 lần với từng loại nguồn cacbon khảo sát.

Khả năng sử dụng các nguồn cacbon và chất cho điện tử của hai chủng GT<sub>10</sub> và Y<sub>11</sub> được phân tích dựa trên các đặc điểm sinh lý đã được công bố đối với *Rhodobacter capsulatus* và *Rhodopseudomonas palustris* trong các nghiên cứu trước đây của Girija và cộng sự (2010); Imhoff và Trüper (1989) [46], [116]. Kết quả phân tích được tổng hợp trong Bảng 3.4.

**Bảng 3.4. So sánh khả năng sử dụng nguồn cacbon và chất cho điện tử của các chủng GT<sub>10</sub> và Y<sub>11</sub> với *Rhodobacter capsulatus* và *Rhodopseudomonas palustris* (Girija và cộng sự, 2010; Imhoff và Trüper, 1989)**

Nguồn cơ chất	GT <sub>10</sub>	<i>Rba. capsulatus</i>	Y <sub>11</sub>	<i>Rps. palustris</i>
Acetate	++++	+	++++	+
Succinate	++++	+	++++	+
Formate	+	+	+	+
Tartate	-	-	-	-
Citrate	++	±	++	±
Glycerol	-	-	+++	+
Glucose	+++	+	++++	+
Methanol	-	-	-	±
Ethanol	-	-	-	±
Manitol	+++	±	++	±
Sorbitol	++	±	+++	+
Propionate	+	+	+	+
Sulfide	+++	+	+++	+
Glutamate	++++	+	++++	+
Isopropanol	+	+	-	+

*Chú thích:* (++++):  $\Delta OD > 1,5$ ; (+++):  $\Delta OD$  từ 1,0–1,5; (++):  $\Delta OD$  từ 0,5–1,0; (+):  $\Delta OD$  từ 0,1–0,5; (-):  $\Delta OD < 0,1$  (không ghi nhận sinh trưởng).

Bảng 3.4 cho thấy chủng GT<sub>10</sub> có khả năng sử dụng các nguồn cacbon và chất cho điện tử: acetate, succinate, formate, citrate, glucose, mannitol, sorbitol, propionat, glutamate, sulfide, glutamate, isopropanol. Chúng không có khả năng sử dụng nguồn cacbon: tartate, methanol, ethanol. Thông tin dữ liệu sử dụng các nguồn cacbon này rất giống với chi *Rhodobacter*, đặc biệt là *Rhodobacter capsulatus*, và khác với các thành viên khác trong chi như *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter*

*veldkampii* và *Rhodobacter adriaticus*, những loài có khả năng chuyển hóa cả formate và isopropanol [46].

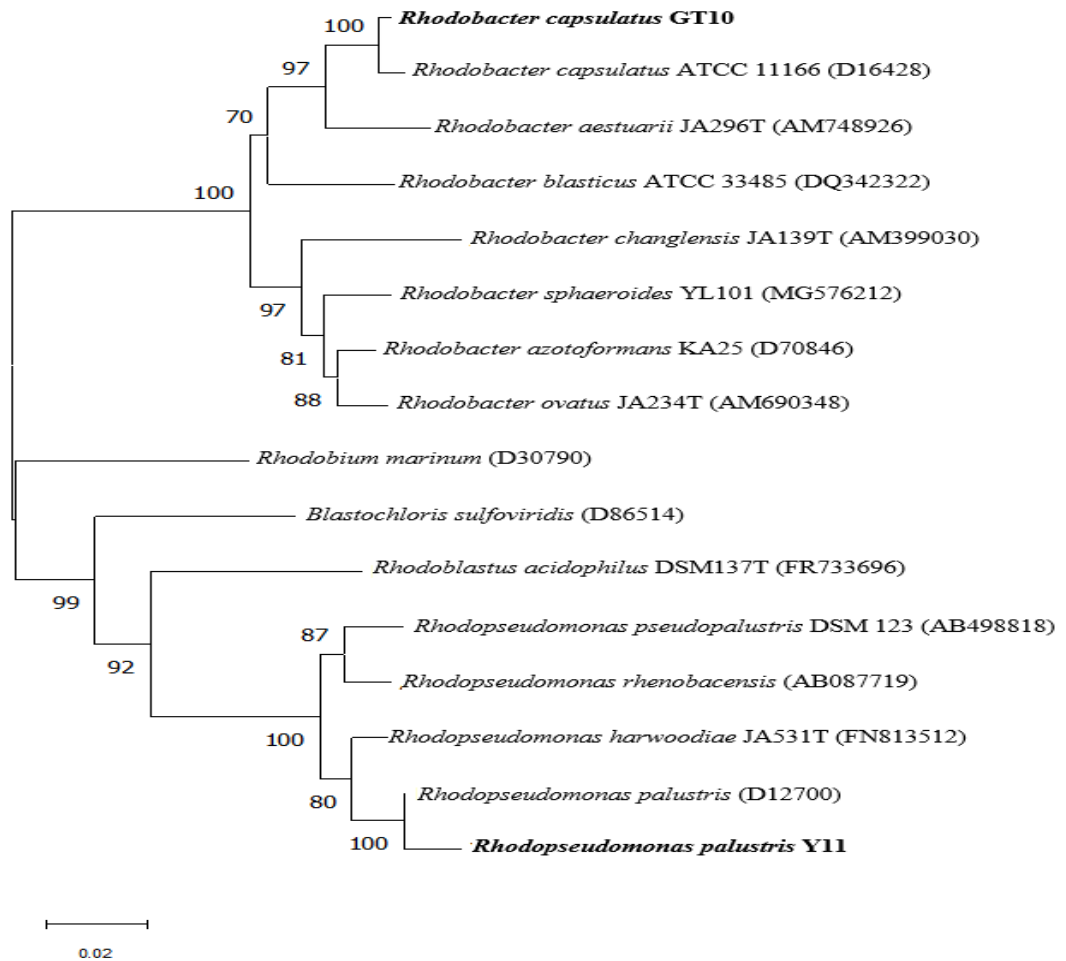
Chủng Y<sub>11</sub> có khả năng sử dụng các nguồn cacbon và chất cho điện tử là: acetate, succinate, formate, citrate, glycerol, glucose, mannitol, sorbitol, propionate, glutamate, sulfide. Chúng không có khả năng sử dụng nguồn cacbon: Tartate, Methanol, Ethanol. Thông tin này phù hợp với chi *Rhodopseudomonas*, gần giống nhất với *Rhodopseudomonas palustris*.

Dựa trên các đặc điểm sinh lý này, có khả năng chủng GT<sub>10</sub> giống loài *Rhodobacter capsulatus*, trong khi chủng Y<sub>11</sub> giống loài *Rhodopseudomonas palustris*. Tiếp theo, tiến hành giải trình tự gen 16S rDNA nhằm định danh và xây dựng cây phân loại chính xác đối với hai chủng VKTQH tiềm năng đã được tuyển chọn.

#### 3.4.4. Phân tích trình tự gen 16S rDNA

DNA của GT<sub>10</sub> và Y<sub>11</sub> được tách chiết khuếch đại gen 16S rDNA bằng cặp mồi 27F/1492R. Kết quả điện di cho thấy có duy nhất 1 băng khoảng 1500 bp, phù hợp với kích thước gen 16S rDNA ở vi khuẩn. Sản phẩm PCR được tinh sạch rồi giải trình tự Sanger hai chiều.

Phân tích so sánh với GenBank cho kết quả chủng GT<sub>10</sub> có mức độ tương đồng về trình tự cao nhất với *Rhodobacter capsulatus*, tương đồng trên 99%. Cụ thể, GT<sub>10</sub> thể hiện mức độ đồng nhất trình tự 99,12% với *Rba. capsulatus* ATCC 11166 (số truy cập GenBank: D16428.1). Tương tự, chủng Y<sub>11</sub> cho thấy mức độ tương đồng trình tự cao với *Rhodopseudomonas palustris*, tương đồng trên 99% so với các trình tự tham chiếu, như *R. palustris* chủng D12700 (số truy cập GenBank: D12700). Kết quả định danh cho thấy sự phù hợp với các đặc điểm hình thái và sinh lý trước đó, qua đó củng cố việc phân loại chủng GT<sub>10</sub> thuộc loài *Rhodobacter capsulatus* và chủng Y<sub>11</sub> thuộc loài *Rhodopseudomonas palustris*. Phân tích phát sinh chủng loại được thực hiện bằng phương pháp neighbor-joining với 1000 lần lặp bootstrap nhằm đánh giá độ tin cậy của cấu trúc cây phát sinh.

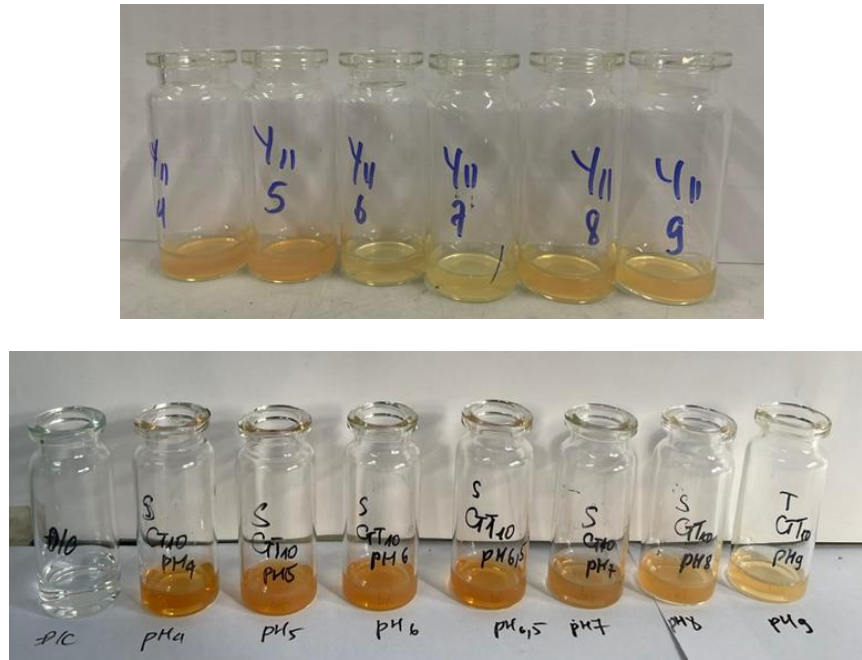


**Hình 3.5. Cây phát sinh chủng loại của hai chủng VKTQH GT<sub>10</sub>, Y<sub>11</sub> dựa trên trình tự nucleotide gen 16S rDNA**

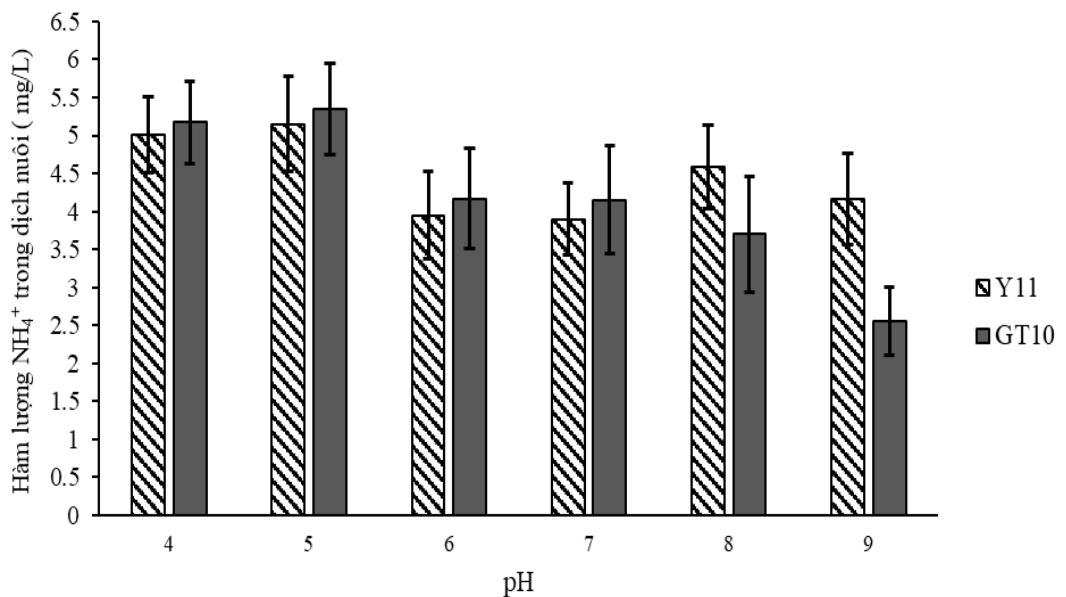
### **3.5. Đánh giá ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng cố định nitơ phân tử và khả năng sinh trưởng, sản sinh chất kích thích IAA của VKTQH**

#### **3.5.1. Ảnh hưởng của pH đến khả năng cố định nitơ phân tử của VKTQH**

Nhằm đánh giá ảnh hưởng pH đến khả năng cố định nitơ của các chủng VKTQH, chúng được đánh giá khả năng cố định N<sub>2</sub> ở các pH khác nhau. Kết quả hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mg/L) tạo ra trong môi trường ở các pH khác nhau thể hiện trên Hình 3.6 và 3.7.



**Hình 3.6.** Thí nghiệm đánh giá khả năng sản sinh  $\text{NH}_4^+$  bằng thuốc thử Nessler của 2 chủng  $\text{Y}_{11}$  và  $\text{GT}_{10}$  ở các pH khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng



**Hình 3.7.** Hàm lượng  $\text{NH}_4^+$  sinh ra trong dịch nuôi (mg/L) ở các pH khác nhau của chủng  $\text{Y}_{11}$  và  $\text{GT}_{10}$  trong điều kiện vi hiếu khí sáng

Hình 3.7 cho kết quả cả chủng  $\text{Y}_{11}$  và  $\text{GT}_{10}$  đều có thể cố định nitơ trong khoảng pH tương đối rộng từ pH 4 đến pH 9, tuy nhiên mức độ cố định nitơ thay đổi tùy theo pH của môi trường nuôi cấy.

Đối với chủng  $\text{Y}_{11}$ , hàm lượng  $\text{NH}_4^+$  sinh ra đạt giá trị cao ở pH 4 – 5, lần lượt đạt khoảng  $5,01 \pm 0,50$  mg/L và  $5,15 \pm 0,63$  mg/L. Khi pH tăng lên 6 – 7, lượng

$\text{NH}_4^+$  giảm xuống còn khoảng  $3,95 \pm 0,58$  và  $3,90 \pm 0,47$ . Ở pH 8, khả năng cố định nitơ của chúng tăng lên đạt  $4,58 \pm 0,55$  mg/L, tuy nhiên khi pH tiếp tục tăng lên 9, lượng  $\text{NH}_4^+$  sinh ra giảm xuống còn  $4,17 \pm 0,60$  mg/L.

Đối với chủng GT<sub>10</sub>, hàm lượng  $\text{NH}_4^+$  sinh ra cũng đạt giá trị cao nhất ở pH 5 với khoảng  $5,35 \pm 0,60$  mg/L và pH 4 khoảng  $5,17 \pm 0,55$  mg/L. Khi pH tăng từ 6 đến 7, lượng  $\text{NH}_4^+$  sinh ra giảm xuống còn khoảng 4,15 – 4,17 mg/L. Ở điều kiện kiềm hơn pH 8 – 9, khả năng cố định nitơ của chúng tiếp tục giảm, đặc biệt tại pH 9 chỉ còn  $2,55 \pm 0,45$  mg/L.

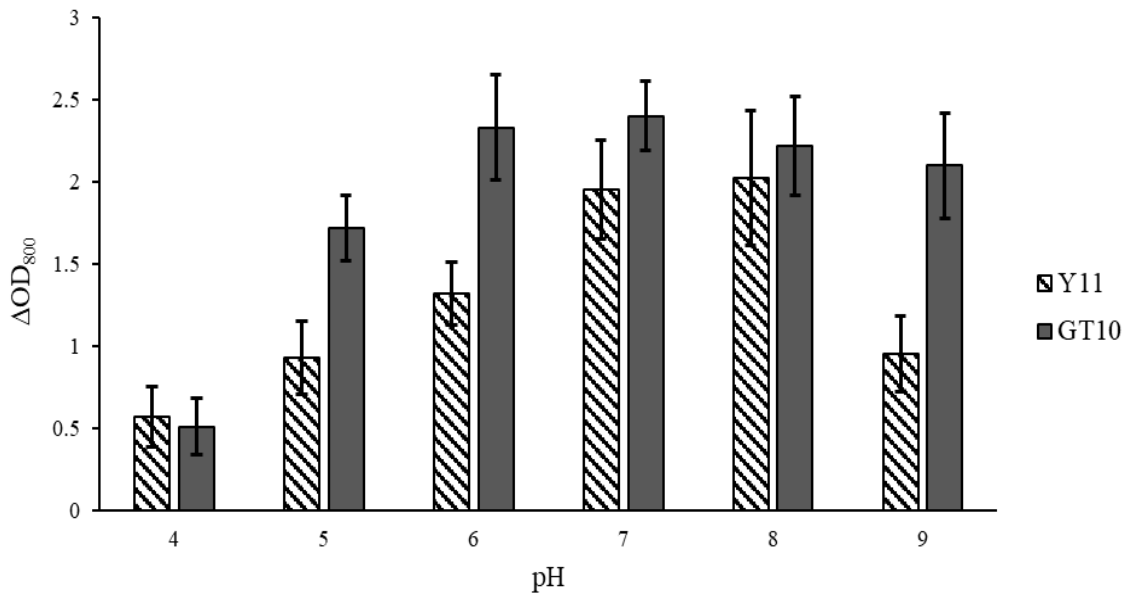
Nhìn chung, hàm lượng  $\text{NH}_4^+$  có xu hướng đạt giá trị cao ở pH axit nhẹ (pH 4 – 5). Chủng Y<sub>11</sub> có xu hướng duy trì khả năng cố định nitơ ổn định hơn trong khoảng pH rộng.

Việc các chủng VKQTH vẫn duy trì khả năng cố định nitơ tốt trong điều kiện môi trường axit cho thấy chúng thích nghi tốt với điều kiện đất chua, qua đó thể hiện tiềm năng ứng dụng trong sản xuất phân bón vi sinh cho vùng đất nhiễm phèn.

Kết quả phân tích ANOVA cho thấy pH có ảnh hưởng đến khả năng cố định nitơ của các chủng VKQTH ( $p < 0,05$ ).

### **3.5.2. Ảnh hưởng của pH đến khả năng sinh trưởng và sản sinh chất kích thích IAA của VKTQH**

Chủng GT<sub>10</sub> và Y<sub>11</sub> được đánh giá khả năng sinh trưởng và sản sinh IAA trong điều kiện nuôi cấy vi hiếu khí sáng (3000 lux) với pH khác nhau theo phương pháp của Ahmad và cộng sự (2005) với độ pH từ 4 đến 9. Kết quả về khả năng sinh trưởng và hàm lượng IAA sản sinh ra trong môi trường ở các pH khác nhau trên hình 3.8, 3.9 và 3.10.



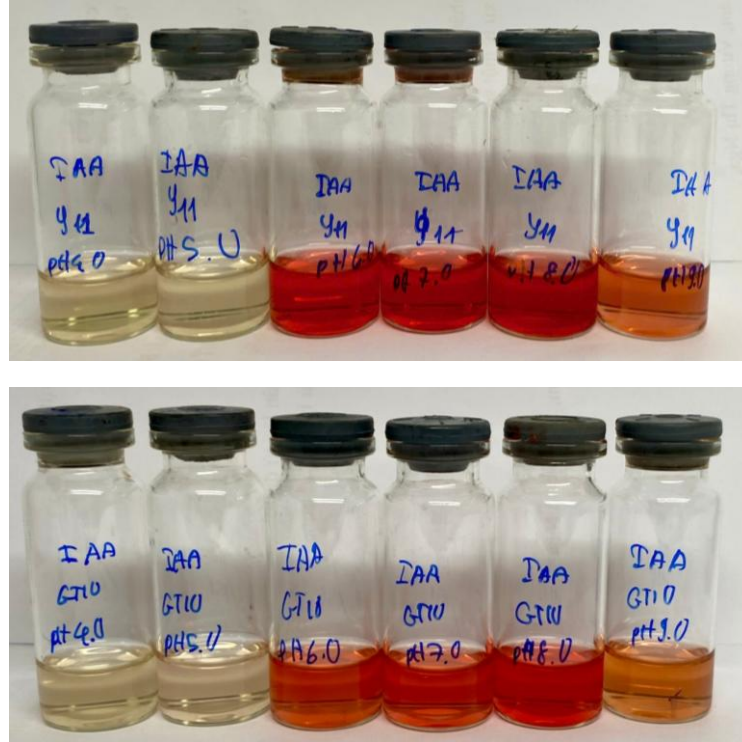
**Hình 3.8. Khả năng sinh trưởng của chủng Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> ở các pH khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng**

Kết quả thể hiện trên đồ thị cho thấy cả hai chủng VKTQH Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> đều sinh trưởng trong khoảng pH từ 4 – 9 trong điều kiện vi hiếu khí sáng. Tuy nhiên, mức độ sinh trưởng của các chủng thay đổi rõ rệt tùy theo độ pH.

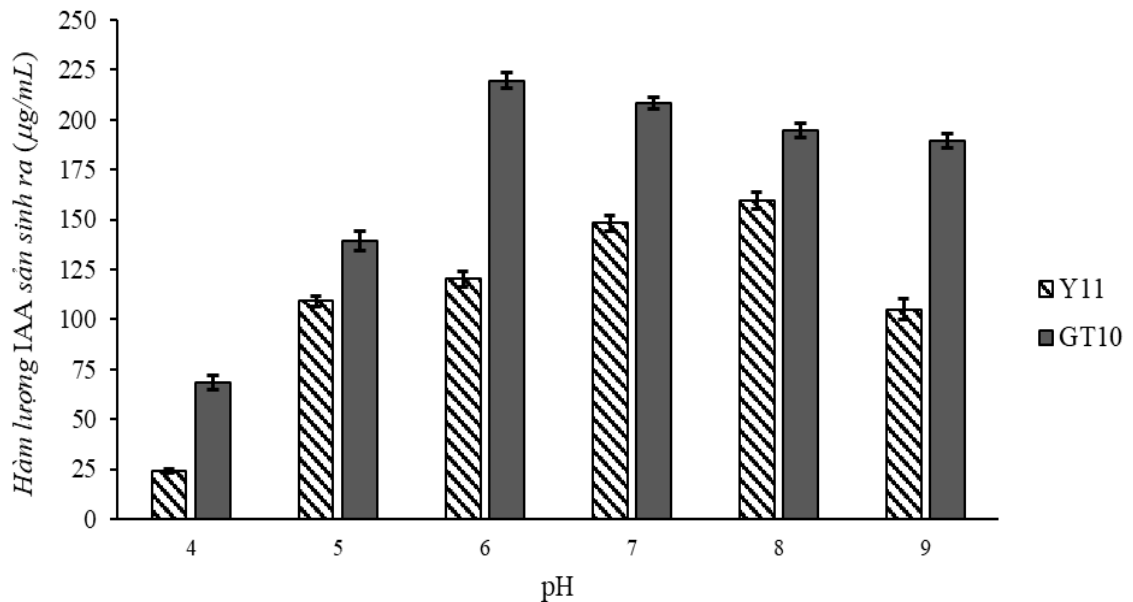
Đối với chủng Y<sub>11</sub>, sinh trưởng thấp trong môi trường axit với giá trị  $\Delta OD_{800}$  đạt khoảng  $0,57 \pm 0,18$  ở pH 4 và  $0,93 \pm 0,22$  ở pH 5. Khi pH tăng lên 6 và 7, sinh trưởng của chủng tăng rõ rệt, đạt lần lượt  $1,32 \pm 0,19$  và  $1,95 \pm 0,30$ . Giá trị sinh trưởng cao nhất được ghi nhận ở pH 8 ( $2,02 \pm 0,41$ ), sau đó giảm xuống  $0,95 \pm 0,23$  khi pH tăng lên 9. Kết quả này cho thấy chủng Y<sub>11</sub> thích nghi tốt trong điều kiện pH trung tính đến hơi kiềm, với pH tối ưu khoảng 7–8.

Đối với chủng GT<sub>10</sub>, sinh trưởng cũng thấp ở pH 4 với  $\Delta OD_{800}$  khoảng  $0,51 \pm 0,17$ . Khi pH môi trường tăng lên, sinh trưởng của chủng tăng nhanh, đạt  $1,72 \pm 0,20$  ở pH 5 và  $2,33 \pm 0,32$  ở pH 6. Giá trị cao nhất được ghi nhận ở pH 7 ( $2,40 \pm 0,21$ ), sau đó giảm nhẹ ở pH 8 và 9 nhưng vẫn ở mức khá cao. Cho thấy chủng GT<sub>10</sub> sinh trưởng tốt trong khoảng pH gần trung tính, với pH tối ưu khoảng 6 – 7.

Nhìn chung, cả hai chủng đều sinh trưởng trong khoảng pH tương đối rộng nhưng giảm rõ rệt ở điều kiện pH thấp. Theo Hunter và cộng sự (2009), VKTQH sinh trưởng được trong khoảng pH rộng nhưng tối ưu thường nằm trong khoảng pH 6 – 7. Kết quả này tương đồng với đặc điểm sinh đã được công bố trong các nghiên cứu trước của nhóm VKTQH.



**Hình 3.9.** Thí nghiệm đánh giá khả năng sản sinh IAA bằng thuốc thử *Salkowski* của 2 chủng Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> ở các pH khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng



**Hình 3.10.** Hàm lượng IAA sản sinh ra trong dịch nuôi (µg/mL) ở các pH khác nhau của chủng Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> trong điều kiện vi hiếu khí sáng

Đối với chủng Y<sub>11</sub>, khả năng sản sinh IAA thấp trong điều kiện môi trường axit. Ở pH 4, hàm lượng IAA tạo thành chỉ đạt khoảng  $24,17 \pm 1,09$  µg/mL. Khi pH tăng lên, hàm lượng IAA của chủng tăng rõ rệt, đạt khoảng  $109,06 \pm 2,45$  µg/mL ở

pH 5 và  $120,23 \pm 3,81$   $\mu\text{g/mL}$  ở pH 6. Ở pH 7 và pH 8, lượng IAA tăng và giá trị cao nhất tại pH 8 với khoảng  $159,45 \pm 4,16$   $\mu\text{g/mL}$ . Tuy nhiên, khi pH tăng lên 9, khả năng sản sinh IAA giảm xuống còn khoảng  $105,10 \pm 5,24$   $\mu\text{g/mL}$ . Kết quả này cho thấy chủng Y<sub>11</sub> sản sinh IAA tốt trong điều kiện pH trung tính đến hơi kiềm, với pH tối ưu khoảng 7 – 8.

Tương tự, chủng GT<sub>10</sub> cũng có khả năng sản sinh IAA thấp trong môi trường axit với hàm lượng khoảng  $68,20 \pm 3,60$   $\mu\text{g/mL}$  ở pH 4. Khi pH môi trường tăng lên, lượng IAA được tổng hợp tăng đáng kể, đạt khoảng  $139,11 \pm 4,81$   $\mu\text{g/mL}$  ở pH 5 và  $219,62 \pm 3,92$   $\mu\text{g/mL}$  ở pH 6. Ở pH 7 và pH 8, hàm lượng IAA giảm hơn tại pH 6 nhưng vẫn khá cao, lần lượt khoảng  $208,03 \pm 2,93$   $\mu\text{g/mL}$  và  $194,51 \pm 3,52$   $\mu\text{g/mL}$ . Khi pH tăng lên 9, khả năng sản sinh IAA tiếp tục giảm xuống còn khoảng  $189,62 \pm 3,64$   $\mu\text{g/mL}$ . Điều này thấy GT<sub>10</sub> có thể sinh IAA tốt trong điều kiện môi trường có pH gần trung tính, với pH tối ưu khoảng 6 – 7.

Nhìn chung, cả hai chủng VKTQH được lựa chọn đều có thể sinh IAA trong điều kiện pH từ 4 đến 9, tuy nhiên mức độ sản sinh IAA có sự khác biệt rõ rệt giữa các chủng. Trong đó, chủng GT<sub>10</sub> cho hàm lượng IAA cao hơn so với chủng Y<sub>11</sub> ở hầu hết các điều kiện pH khảo sát.

Dựa vào kết quả cho thấy pH vừa ảnh hưởng đến sinh trưởng và cả sự sản sinh IAA VKTQH được lựa chọn. Khi pH thích hợp cho sinh trưởng, khả năng sản sinh IAA của chúng cũng tăng lên theo. Tuy nhiên, pH không hoàn toàn đồng nhất giữa sinh trưởng và sinh IAA do khả năng vượt trội tùy chủng. Kết quả này chứng tỏ các chủng VKTQH nghiên cứu có khả năng thích nghi với cả môi trường axit lẫn môi trường kiềm và vẫn duy trì khả năng sản sinh IAA - hợp chất có vai trò quan trọng trong kích thích sinh trưởng thực vật.

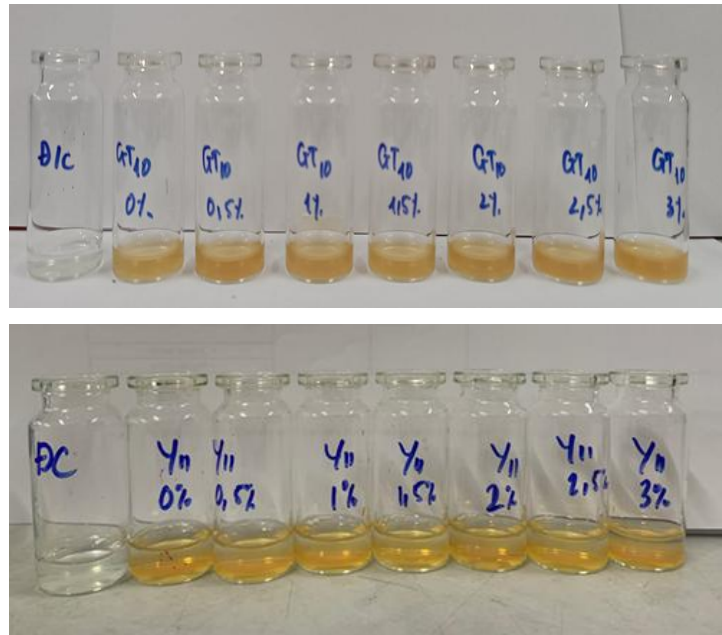
Kết quả phân tích ANOVA thấy pH vừa ảnh hưởng đến sinh trưởng và cả khả năng sản sinh IAA của các chủng VKQTH ( $p < 0,05$ ).

### **3.5.3. Ảnh hưởng của nồng độ muối đến khả năng cố định nitơ phân tử của VKTQH**

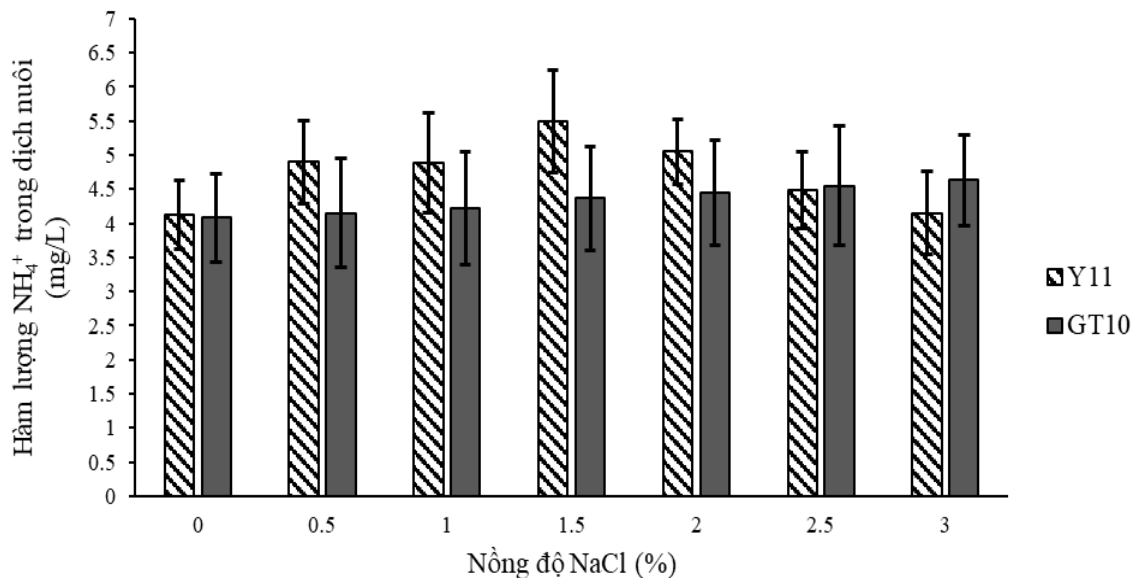
Khảo sát nồng độ NaCl trong khoảng 0 – 3%. Đất mặn và rất mặn trong nông nghiệp thường có hàm lượng muối dao động khoảng 0,5 – 1,5%; do đó, khoảng khảo sát 0 – 3% không chỉ bao phủ điều kiện tự nhiên mà còn mở rộng đến mức gây stress nhằm đánh giá sự thích nghi cao của hai chủng VKTQH này.

Nuôi GT<sub>10</sub> và Y<sub>11</sub> trong môi trường DSMZ-27 lỏng, không chứa nguồn nitơ có bổ sung muối ở các nồng độ: 0 – 3%. Khí N<sub>2</sub> được sục vào môi trường khoảng 17 – 20 ml/L, điều kiện nuôi vi hiếu khí sáng, nhiệt độ phòng. Sau 48 giờ, ly tâm dịch

nuôi và đánh giá khả năng sản sinh ra  $\text{NH}_4^+$  bằng thuốc thử Nessler. Kết quả ở Hình 3.11 và 3.12.



**Hình 3.11. Thí nghiệm đánh giá khả năng sản sinh  $\text{NH}_4^+$  bằng thuốc thử Nessler của 2 chủng  $Y_{11}$  và  $GT_{10}$  ở các nồng độ muối khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng**



**Hình 3.12. Hàm lượng  $\text{NH}_4^+$  sinh ra trong dịch nuôi (mg/L) ở các nồng độ muối khác nhau của chủng  $Y_{11}$  và  $GT_{10}$  trong điều kiện vi hiếu khí sáng**

Hình 3.12 thấy cả  $Y_{11}$  và  $GT_{10}$  đều có thể cố định nitơ trong khoảng nồng độ muối NaCl tương đối rộng từ 0 – 3%.

Đối với chủng Y<sub>11</sub>, hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sinh ra đạt khoảng 4,13±0,50 mg/L ở điều kiện không bổ sung muối. Khi nồng độ NaCl tăng lên 0,5 – 1%, lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sinh ra tăng lên và đạt khoảng 4,90±0,61 mg/L và 4,89±0,73 mg/L. Khả năng cố định nitơ của chủng đạt giá trị cao nhất ở 1,5% NaCl với khoảng 5,50±0,75 mg/L. Tuy nhiên, khi nồng độ muối tiếp tục tăng lên 2 – 3%, lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sinh ra có xu hướng giảm dần xuống còn khoảng 5,05±0,48 mg/L, 4,48±0,56 mg/L và 4,15±0,61 mg/L.

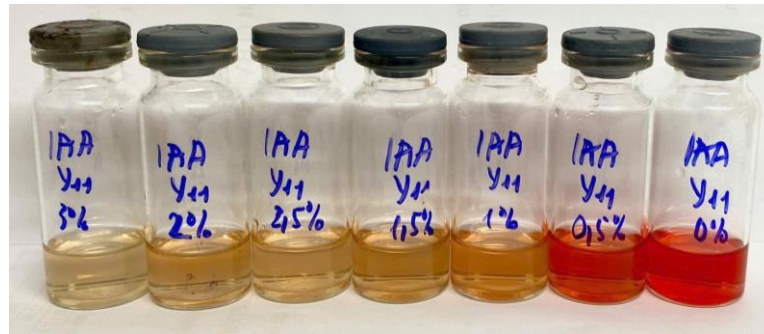
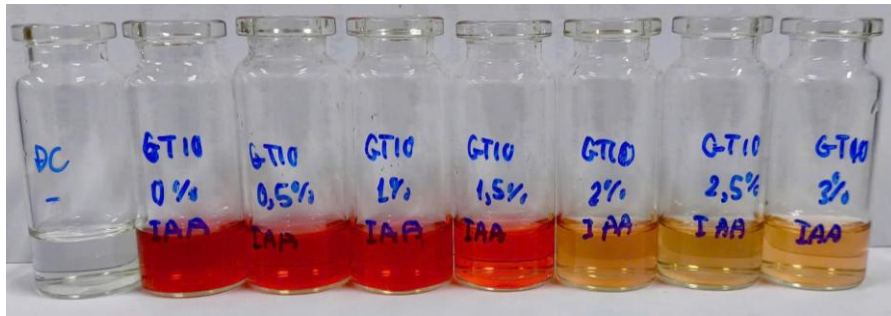
Đối với chủng GT<sub>10</sub>, hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sinh ra ở điều kiện không bổ sung muối đạt khoảng 4,08±0,65 mg/L. Khi nồng độ NaCl tăng lên 0,5 – 1%, lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sinh ra đạt khoảng 4,15±0,80 mg/L và 4,22±0,82 mg/L. Khi nồng độ muối tiếp tục tăng lên 1,5% và 2%, lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sinh ra tăng nhẹ đạt khoảng 4,37±0,76 mg/L và 4,45±0,77 mg/L. Tại nồng độ muối 2,5% và 3%, khả năng cố định nitơ của chủng vẫn được duy trì với hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> lần lượt khoảng 4,55±0,88 mg/L và 4,63±0,67 mg/L.

Nhìn chung, cả hai chủng Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> đều có thể chịu mặn tương đối tốt và vẫn duy trì hoạt động cố định nitơ trong khoảng nồng độ muối rộng. Trong đó, chủng Y<sub>11</sub> có xu hướng đạt hiệu quả cố định nitơ cao hơn ở nồng độ muối trung bình (nồng độ NaCl từ 1 – 2%), trong khi chủng GT<sub>10</sub> thể hiện khả năng duy trì hoạt động tương đối ổn định ngay cả ở nồng độ muối cao hơn. Đặc điểm này cho thấy các chủng VKTQH này thích nghi tốt với môi trường nhiễm mặn, mở ra tiềm năng trong phục vụ canh tác ở các vùng đất nhiễm mặn hoặc ven biển.

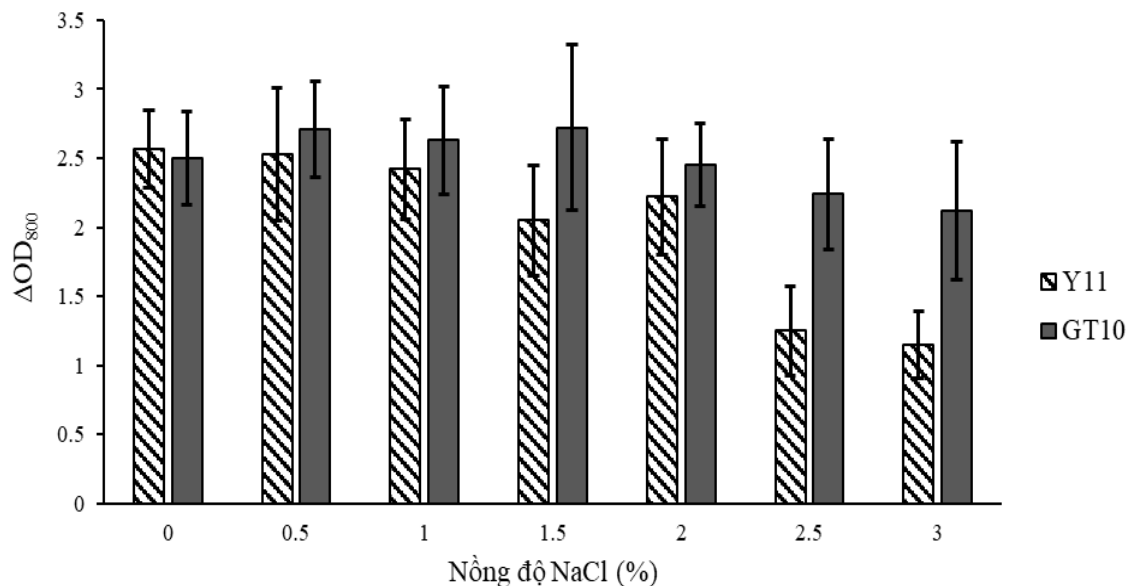
Kết quả phân tích ANOVA cho thấy nồng độ muối có ảnh hưởng đến hoạt động cố định nitơ của các chủng VKQTH ( $p < 0,05$ ).

#### **3.5.4. Ảnh hưởng của nồng độ muối đến khả năng sinh trưởng và sản sinh chất kích thích IAA của VKTQH**

Chủng GT<sub>10</sub> và Y<sub>11</sub> được đánh giá sự sinh trưởng và sản sinh IAA trong điều kiện nuôi cấy vi hiếu khí sáng (3000 lux) với các nồng độ muối tương tự.



**Hình 3.13. Thí nghiệm đánh giá khả năng sản sinh IAA bằng thuốc thử Salkowski của 2 chủng Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> ở các nồng độ muối khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng**



**Hình 3.14. Khả năng sinh trưởng của chủng Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> ở các nồng độ muối khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng**

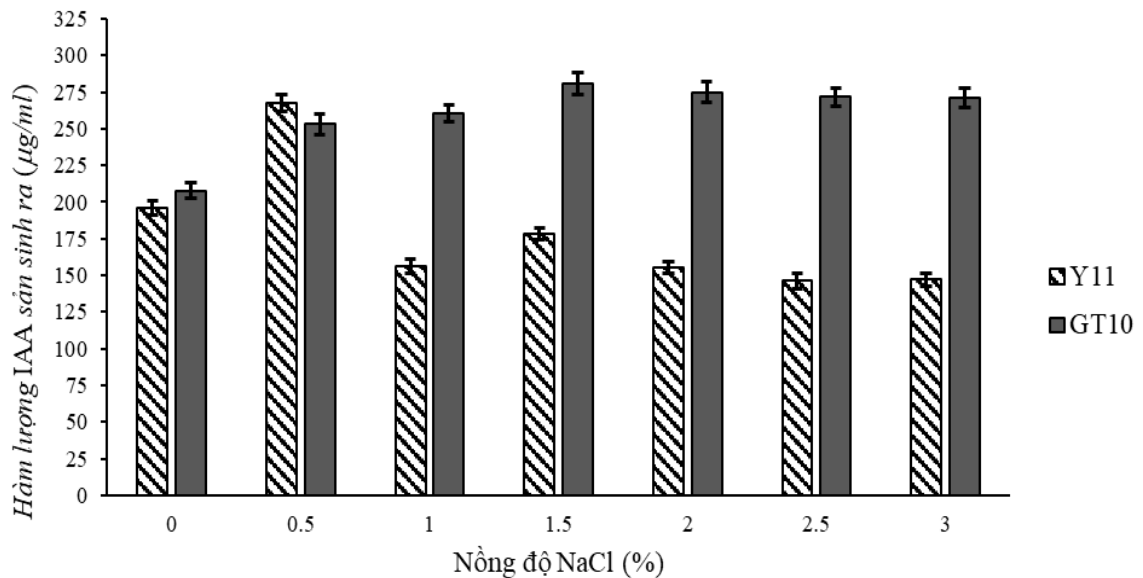
Hình 3.14 cho thấy cả hai chủng Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> đều có sinh trưởng được trong khoảng nồng độ NaCl từ 0 – 3% tại điều kiện vi hiếu khí sáng. Tuy nhiên, mức độ sinh trưởng của các chủng có xu hướng giảm khi độ mặn tăng.

Đối với chủng Y<sub>11</sub>, sinh trưởng cao nhất ở điều kiện không bổ sung NaCl với giá trị ΔOD<sub>800</sub> đạt khoảng 2,57±0,28. Khi nồng độ muối tăng lên 0,5% và 1%, sinh

trường của chủng giảm nhẹ, đạt lần lượt  $2,53\pm 0,48$  và  $2,42\pm 0,36$ . Ở các nồng độ muối cao hơn từ 1,5% đến 3%, sinh trưởng tiếp tục giảm và chỉ còn khoảng 1,15 – 2,22. Kết quả này cho thấy chủng Y<sub>11</sub> sinh trưởng tốt trong môi trường điều kiện không nhiễm mặn hoặc chỉ nhiễm mặn nhẹ, giảm đáng kể khi nồng độ muối tăng cao.

Đối với chủng GT<sub>10</sub>, sinh trưởng của vi khuẩn tương đối ổn định trong các điều kiện nuôi cấy có nồng độ muối khác nhau. Ở điều kiện không bổ sung NaCl, giá trị  $\Delta OD_{800}$  đạt khoảng  $2,50\pm 0,34$ . Khi nồng độ muối tăng lên 0,5 – 1,5%, sinh trưởng của chủng tăng nhẹ và đạt giá trị cao nhất ở 1,5% NaCl ( $2,72\pm 0,60$ ). Khi nồng độ muối tiếp tục tăng lên 2 – 3%, sinh trưởng tuy có giảm nhưng vẫn ở mức tương đối cao (2,12 – 2,45). Kết quả này cho thấy chủng GT<sub>10</sub> có khả năng thích nghi tốt hơn với điều kiện môi trường nhiễm mặn.

Nhìn chung, cả hai chủng VKTQH đều có thể sinh trưởng trong môi trường mặn. Tuy nhiên, sinh trưởng của chủng Y<sub>11</sub> giảm rõ rệt khi nồng độ muối tăng cao, trong khi chủng GT<sub>10</sub> vẫn duy trì sinh trưởng tương đối tốt. Điều này cho thấy GT<sub>10</sub> thích nghi tốt hơn với môi trường nhiễm mặn, đây là đặc điểm có ý lớn trong sản xuất nông nghiệp tại các vùng đất bị xâm nhập mặn.



**Hình 3.15. Hàm lượng IAA sản sinh ra trong dịch nuôi (µg/mL) của chủng Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> ở các nồng độ muối khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng**

Đối với khả năng sản sinh IAA, kết quả cho thấy cả hai chủng Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> đều có thể tổng hợp IAA trong khoảng nồng độ NaCl từ 0 – 3%, tuy nhiên hàm lượng IAA tạo thành thay đổi rõ rệt theo nồng độ muối của môi trường nuôi cấy.

Đối với chủng Y<sub>11</sub>, hàm lượng IAA cao nhất được ghi nhận ở nồng độ NaCl 0,5% với khoảng 267,66±5,46 µg/mL. Ở điều kiện không bổ sung muối, lượng IAA đạt khoảng 195,97±5,09 µg/mL. Khi nồng độ muối tăng lên 1%, hàm lượng IAA giảm xuống còn khoảng 156,23±4,80 µg/mL và tiếp tục giảm ở các nồng độ muối cao hơn từ 1,5 – 3%, chỉ còn trong khoảng 147,27 – 178,21 µg/mL. Kết quả này cho thấy chủng Y<sub>11</sub> sản sinh IAA tốt trong điều kiện mặn nhẹ nhưng khả năng tổng hợp IAA giảm đáng kể khi nồng độ muối tăng cao.

Đối với chủng GT<sub>10</sub>, hàm lượng IAA tăng dần khi nồng độ muối tăng từ 0 – 1,5%. Ở điều kiện không bổ sung muối, lượng IAA đạt khoảng 207,80±5,61 µg/mL; khi nồng độ muối tăng lên 0,5% và 1%, hàm lượng IAA đạt lần lượt 253,10±6,82 µg/mL và 260,23±5,91 µg/mL. Giá trị cao nhất được ghi nhận ở 1,5% NaCl với khoảng 280,71±7,73 µg/mL. Khi nồng độ muối tiếp tục tăng lên 2 – 3%, khả năng sản sinh IAA giảm nhẹ nhưng vẫn duy trì ở mức cao (khoảng 270,66 – 275,00 µg/mL). Điều này cho thấy chủng GT<sub>10</sub> có khả năng sản sinh IAA tốt trong điều kiện mặn nhẹ đến trung bình.

Nhìn chung, cả hai chủng VKTQH được lựa chọn đều sản sinh IAA điều kiện nhiễm mặn. Tuy nhiên, chủng GT<sub>10</sub> cho hàm lượng IAA cao hơn so với chủng Y<sub>11</sub> ở hầu hết các điều kiện khảo sát, cho thấy khả năng chịu mặn tốt hơn.

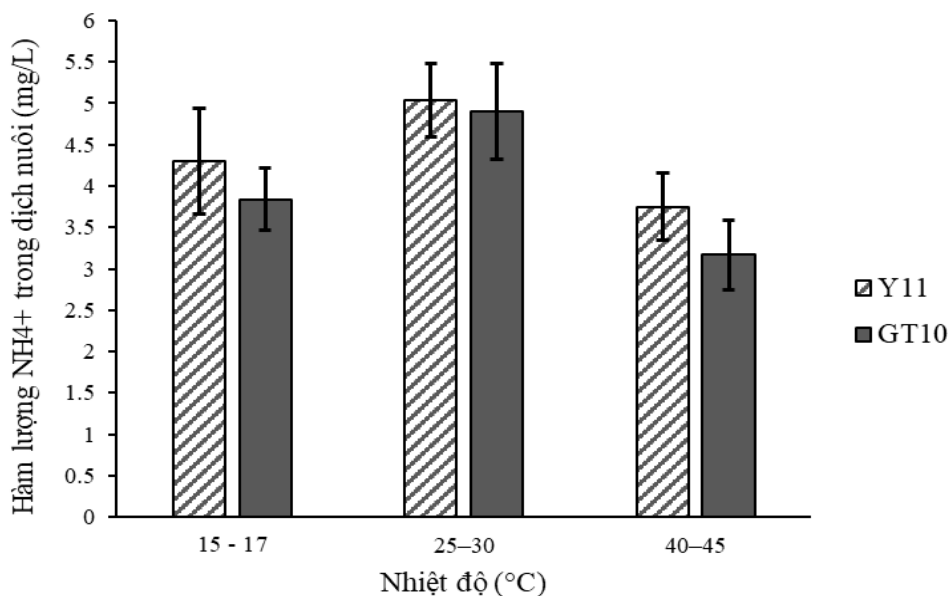
Tóm lại, nồng độ muối của môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và cả khả năng sinh IAA của các chủng VKTQH. Khi nồng độ muối nằm trong khoảng không phù hợp cho sinh trưởng thì khả năng tổng hợp IAA của các chủng cũng ở mức cao. Ngược lại, khi nồng độ muối tăng cao, sinh trưởng và khả năng sản sinh IAA cũng giảm.

Đặc biệt, chủng GT<sub>10</sub> cho thấy khả năng sinh trưởng và sản sinh IAA tương đối tốt trong điều kiện môi trường mặn. Đặc điểm này là ưu điểm lớn tại các vùng bị nhiễm mặn.

Kết quả phân tích ANOVA cho thấy nồng độ muối có ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng, sản sinh IAA của các chủng VKQTH ( $p < 0,05$ ).

### **3.5.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng cố định nitơ phân tử và sinh trưởng của VKTQH**

Nuôi cấy GT<sub>10</sub> và Y<sub>11</sub> trên môi trường DSMZ-27 lỏng không chứa nguồn nitơ điều kiện vi hiếu khí sáng với khí N<sub>2</sub> được sục vào môi trường khoảng 17 – 20 ml/L, ở các nhiệt độ: 15 – 17 °C, 25 – 30 °C, 40 – 45 °C. Sau 48 giờ, ly tâm dịch nuôi và đánh giá khả năng sản sinh ra NH<sub>4</sub><sup>+</sup> bằng thuốc thử Nessler.



**Hình 3.16. Hàm lượng  $\text{NH}_4^+$  sinh ra trong dịch nuôi (mg/L) ở các nhiệt độ khác nhau của chủng Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> trong điều kiện vi hiếu khí sáng**

Kết quả Hình 3.16. cho thấy cả Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> đều có thể cố định nitơ trong các khoảng nhiệt độ khảo sát. Tuy nhiên, mức độ cố định nitơ của các chủng có sự thay đổi rõ rệt theo nhiệt độ nuôi cấy.

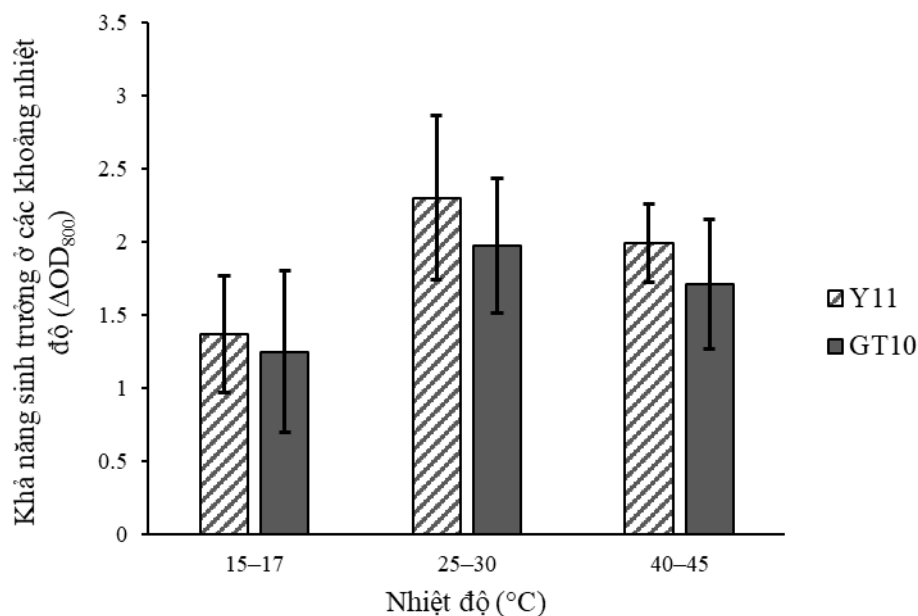
Đối với chủng Y<sub>11</sub>, ở khoảng nhiệt độ 15 – 17 °C, hàm lượng  $\text{NH}_4^+$  được tạo ra đạt khoảng  $4,30 \pm 0,64$  mg/L. Khi nhiệt độ tăng lên 25 – 30 °C, lượng  $\text{NH}_4^+$  được tạo ra tăng lên và đạt giá trị cao nhất khoảng  $5,04 \pm 0,44$  mg/L. Tuy nhiên, khi nhiệt cao mức 40 – 45 °C, khả năng cố định nitơ của chủng giảm xuống còn khoảng  $3,75 \pm 0,41$  mg/L. Kết quả này cho thấy chủng Y<sub>11</sub> có khả năng cố định nitơ tốt nhất ở khoảng nhiệt độ trung bình từ 25 – 30 °C, trong khi ở điều kiện nhiệt độ thấp hoặc cao hơn, hoạt động cố định nitơ của vi khuẩn có xu hướng giảm.

Tương tự, đối với chủng GT<sub>10</sub>, hàm lượng  $\text{NH}_4^+$  được tạo ra ở khoảng nhiệt độ 15 – 17 °C đạt khoảng  $3,84 \pm 0,38$  mg/L. Khi nhiệt độ tăng lên 25 – 30 °C, lượng  $\text{NH}_4^+$  được tạo ra tăng lên đáng kể và đạt giá trị cao nhất khoảng  $4,90 \pm 0,58$  mg/L. Tuy nhiên, ở khoảng nhiệt độ 40 – 45 °C, khả năng cố định nitơ của chủng giảm xuống còn khoảng  $3,17 \pm 0,42$  mg/L. Xu hướng này cho thấy nhiệt độ trung bình cũng là điều kiện thích hợp nhất cho hoạt động cố định nitơ của chủng GT<sub>10</sub>.

Kết quả cho thấy hai chủng VKTQH này có thể duy trì hoạt động cố định nitơ trong điều kiện nhiệt độ biến động, qua đó bước đầu cho thấy tiềm năng ứng dụng của chúng phục vụ canh tác lúa đất nước có khí hậu nhiệt đới như Việt Nam.

Kết quả phân tích ANOVA cho thấy nhiệt độ có ảnh hưởng đến khả năng cố định nitơ của các chủng VKQTH ( $p < 0,05$ ).

Đồng thời, khả năng sinh trưởng của các chủng cũng được theo dõi sau 7 ngày nuôi cấy ở các điều kiện nhiệt độ tương ứng. Việc đánh giá sinh trưởng của các chủng ở các khoảng nhiệt độ khác nhau góp phần đánh giá khả năng thích nghi sinh thái của VKTQH. Trong điều kiện canh tác lúa tại miền Bắc Việt Nam, nhiệt độ môi trường biến động lớn giữa các mùa, có thể giảm xuống khoảng  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  hay tăng cao lên trên  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  tùy mùa. Do đó, các chủng được ứng dụng cần có khả năng sinh trưởng và duy trì hoạt tính sinh học trong dải nhiệt độ rộng. Bên cạnh đó, việc đánh giá sinh trưởng kết hợp với khả năng cố định nitơ giúp lựa chọn được các chủng không chỉ có hoạt tính cố định  $\text{N}_2$  cao mà còn có khả năng phát triển sinh khối tốt, đảm bảo hiệu quả và tính ổn định khi ứng dụng trong điều kiện thực tế.



**Hình 3.17. Khả năng sinh trưởng của chủng Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> ở các nhiệt độ khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng**

Hình 3.17 thấy Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> đều có thể sinh trưởng trong điều kiện nuôi cấy với các khoảng nhiệt độ tương đối rộng từ  $15 - 17\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $40 - 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Đối với chủng Y<sub>11</sub>, sinh trưởng của chúng ở khoảng nhiệt độ thấp  $15 - 17\text{ }^{\circ}\text{C}$  đạt giá trị  $\Delta\text{OD}_{800}$  khoảng  $1,37 \pm 0,40$ . Khi ở khoảng nhiệt độ lý tưởng  $25 - 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sinh trưởng của chủng tăng đạt  $2,30 \pm 0,56$ . Ở khoảng nhiệt độ khắc nghiệt cao từ  $40 - 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sinh trưởng của chủng giảm nhẹ với giá trị  $\Delta\text{OD}_{800}$  khoảng  $1,99 \pm 0,27$ . Cho thấy

chủng  $Y_{11}$  sinh trưởng tốt nhất tại khoảng 25 – 30 °C, tuy nhiên vẫn có thể thích nghi tại cả điều kiện nóng hay lạnh.

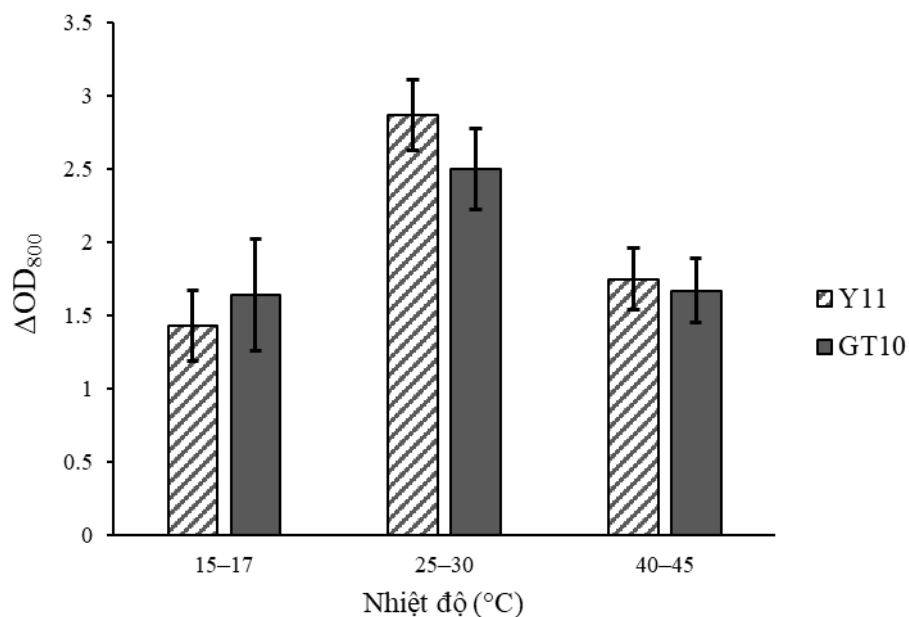
Xu hướng sinh trưởng chủng  $GT_{10}$  cũng tương tự như  $Y_{11}$ . Ở khoảng nhiệt độ 15 – 17 °C, giá trị  $\Delta OD_{800}$  đạt khoảng  $1,25 \pm 0,55$ . Khi nhiệt độ tăng lên 25 – 30 °C, sinh trưởng của chủng tăng rõ rệt và đạt giá trị cao nhất khoảng  $1,97 \pm 0,46$ . Khi nhiệt độ tiếp tục tăng lên cao 40 – 45 °C, sinh trưởng của chủng giảm xuống còn khoảng  $1,71 \pm 0,44$ . Vậy  $GT_{10}$  cũng sinh trưởng tốt nhất trong khoảng nhiệt độ trung bình .

Như vậy, ngoài khả năng cố định nitơ phân tử, cả 2 chủng lựa chọn đều có khả năng sinh trưởng khá tốt ở hai ngưỡng nhiệt độ 15 – 17 °C và 40 – 45 °C và sinh trưởng tốt nhất ở 25 – 30 °C. Do vậy, 2 chủng VKTQH lựa chọn này có thể sử dụng làm phân bón vi sinh mang đặc điểm sinh trưởng và hoạt tính phù hợp với khí hậu của nước ta.

Kết quả phân tích ANOVA cho thấy nhiệt độ có ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của các chủng VKQTH ( $p < 0,05$ ).

### 3.5.6. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh trưởng, sản sinh chất kích thích IAA của VKTQH.

Chủng  $GT_{10}$  và  $Y_{11}$  được đánh giá sự sinh trưởng và sản sinh IAA trong điều kiện tương tự.



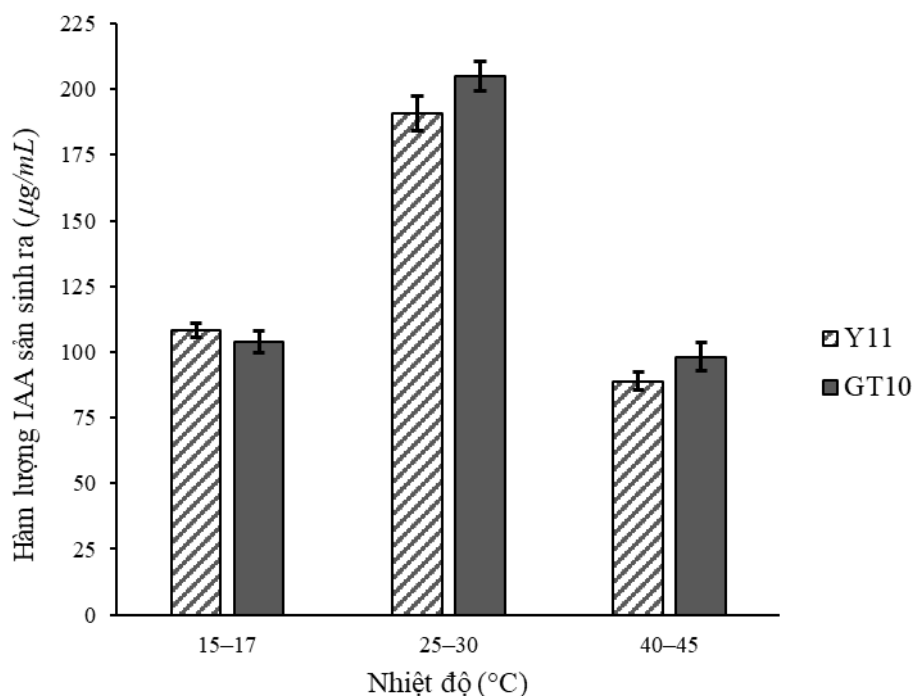
**Hình 3.18. Khả năng sinh trưởng của chủng  $Y_{11}$  và  $GT_{10}$  ở các nhiệt độ khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng**

Kết quả thể hiện ở Hình 3.18 cho thấy cả hai chủng VKTQH Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> đều sinh trưởng trong khoảng nhiệt độ từ 15 – 45 °C trong điều kiện vi hiếu khí sáng. Chúng đều sinh trưởng tốt nhất ở khoảng nhiệt độ 25 – 30 °C, khả năng sinh trưởng kém hơn ở nhiệt độ thấp hơn hoặc cao hơn.

Với chủng Y<sub>11</sub>, ở khoảng nhiệt độ 15 – 17 °C, giá trị  $\Delta OD_{800}$  khoảng  $1,43 \pm 0,24$ . Khi nhiệt độ tăng lên 25 – 30 °C, giá trị  $\Delta OD_{800}$  đạt cao nhất khoảng  $2,87 \pm 0,24$ . Khi nhiệt độ tăng lên 40 – 45 °C, sinh trưởng của chủng giảm xuống còn khoảng  $1,75 \pm 0,21$ .

Đối với chủng GT<sub>10</sub>, xu hướng sinh trưởng của vi khuẩn cũng tương tự. Ở nhiệt độ 15 – 17 °C, giá trị  $\Delta OD_{800}$  đạt khoảng  $1,64 \pm 0,38$ . Khi nhiệt độ 25 – 30 °C, sinh trưởng của chủng tốt nhất với giá trị  $\Delta OD_{800}$  khoảng  $2,50 \pm 0,28$ . Khi nhiệt độ tăng lên 40 – 45 °C, sinh trưởng của chủng giảm xuống còn khoảng  $1,67 \pm 0,22$ .

Nhìn chung, cả hai chủng VKTQH được lựa chọn đều có khả năng sinh trưởng trong khoảng nhiệt độ khá rộng, tuy nhiên nhiệt độ tối ưu của chúng nằm trong khoảng 25 – 30 °C. Khi nhiệt độ thấp hoặc quá cao, tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn giảm.



**Hình 3.19. Hàm lượng IAA sản sinh ra trong dịch nuôi (µg/mL) ở các nhiệt độ khác nhau của chủng Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> trong điều kiện vi hiếu khí sáng**

Đối với khả năng sản sinh IAA, kết quả ở Hình 3.19 cho thấy cả Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> đều có thể sinh IAA trong khoảng nhiệt độ thí nghiệm.

Đối với chủng Y<sub>11</sub>, khả năng sản sinh IAA ở 15 – 17 °C đạt 108,30±2,64 µg/mL, tại 40 – 45 °C đạt và 88,75±3,41. Ở 25 – 30 °C, khả năng sản sinh IAA của đạt giá trị cao nhất khoảng 190,64±6,54 µg/mL. Kết quả này cho thấy chủng Y<sub>11</sub> có khả năng sinh IAA cao nhất ở khoảng nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng của vi khuẩn.

Đối với chủng GT<sub>10</sub>, xu hướng biến đổi hàm lượng IAA theo nhiệt độ cũng tương tự. Ở khoảng nhiệt độ 15 – 17 °C, hàm lượng IAA đạt khoảng 103,84±4,30 µg/mL. Khi nhiệt độ tăng lên 25 – 30 °C, lượng IAA được tổng hợp tăng lên và đạt giá trị cao nhất khoảng 204,90±5,57 µg/mL. Tại 40 – 45 °C, khả năng sản sinh IAA của chủng giảm xuống còn khoảng 98,17±5,42 µg/mL.

Tóm lại, nhiệt độ môi trường không chỉ ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng mà còn tác động rõ rệt đến khả năng sản sinh IAA của VKTQH. Cả hai chủng Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> đều ưa khoảng nhiệt độ 25 – 30 °C, khi nhiệt độ thấp 15 – 17 °C hoặc tăng lên 40 – 45 °C thì khả năng sinh trưởng và sản sinh IAA đều giảm.

Đặc điểm này có ý nghĩa quan trọng trong việc ứng dụng của các chủng VKTQH để sản xuất chế phẩm vi sinh phục vụ canh tác lúa, bởi khoảng nhiệt độ 25 – 30 °C cũng là điều kiện nhiệt độ phổ biến trong môi trường đất và nước ở các vùng trồng lúa tại Việt Nam.

Kết quả phân tích ANOVA cho thấy nhiệt độ có ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng, sản sinh IAA của các chủng VKQTH ( $p < 0,05$ ).

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### 1. KẾT LUẬN

- Đã phân lập được 24 chủng VKTQH không lưu huỳnh từ các mẫu đất và mẫu nước được thu thập ngẫu nhiên ở các ruộng lúa nước, ruộng lúa nhiễm phèn, nhiễm mặn tại Nam Định.
- Từ 24 chủng VKTQH phân lập được đã tuyển chọn được hai chủng GT<sub>10</sub> và Y<sub>11</sub> tiềm năng có khả năng cố định nitơ phân tử và sinh chất kích thích sinh trưởng IAA.
- Dựa trên các đặc điểm sinh học và phân tích trình tự gen 16S rDNA của các chủng VKTQH tiềm năng đã xác định được chủng GT<sub>10</sub> thuộc loài *Rhodobacter capsulatus* và chủng Y<sub>11</sub> thuộc loài *Rhodopseudomonas palustris*.
- Đánh giá ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy cho thấy cả 2 chủng GT<sub>10</sub> và Y<sub>11</sub> đều có khả năng cố định nitơ phân tử, sinh trưởng, sản sinh chất kích thích IAA ở các điều kiện pH tương đối rộng từ pH 4 – 9, nồng độ muối đến 3%, và các điều kiện nhiệt độ 15 – 17 °C, 25 – 30 °C, 40 – 45 °C. Hai chủng này cho thấy tiềm năng lớn trong việc phát triển thành chế phẩm phân bón vi sinh nhằm nâng cao năng suất cây lúa.

### 2. KIẾN NGHỊ

- Xác định các điều kiện nuôi cấy tối ưu trong phòng thí nghiệm khi VKTQH chịu tác động đồng thời của nhiều yếu tố, nhằm tìm ra điều kiện tốt nhất cho khả năng sinh trưởng, cố định nitơ và sinh IAA, làm cơ sở sản xuất chế phẩm vi sinh ổn định và hiệu quả khi ứng dụng thực tế.
- Tiến hành thử nghiệm hai chủng VKTQH đã lựa chọn trên đồng ruộng thực nghiệm để đánh giá hiệu quả khả năng cố định nitơ và thúc đẩy sinh trưởng cây lúa.
- Mở rộng tuyển chọn chủng từ nhiều cánh đồng thuộc các tỉnh, vùng có đặc điểm thổ nhưỡng khác nhau để tìm thêm các chủng VKTQH tiềm năng.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Wei X., Xie B., Wan C., Song R., Zhong W., Xin S., Song K., 2024, Enhancing Soil Health and Plant Growth through Microbial Fertilizers: Mechanisms, Benefits, and Sustainable Agricultural Practices, *Agronomy*, 14(3), p. 609.
- [2] Li S., Fan W., Xu G., Cao Y., Zhao X., Hao S., Deng B., Ren S., Hu S., 2023, Bio-organic fertilizers improve *Dendrocalamus farinosus* growth by remolding the soil microbiome and metabolome, *Frontiers in Microbiology*, 14, p. 1117355.
- [3] Liu C., Xie J., Liu H., Zhong C., Pan G., Zhang S., Jin J., 2024, Microbial Fertilizer: A Sustainable Strategy for Medicinal Plants Production, *Phyton - International Journal of Experimental Botany*, 93(6), pp. 1221-1236.
- [4] Research and Markets, 2024, *Research and Markets*.
- [5] Singh M., Jha S., Pathak D., Maisnam G., 2025, Advancing biofertilizers: the evolution from single-strain formulations to synthetic microbial communities (SynCom) for sustainable agriculture, *Discover Plants*, 2.
- [6] Jia Y., Gray V.M., Straker C.J., 2004, The influence of *Rhizobium* and arbuscular mycorrhizal fungi on nitrogen and phosphorus accumulation by *Vicia faba*, *Annals of Botany*, 94(2), pp. 251–258.
- [7] Yardin M.R., Kennedy I.R., Thies J.E., 2000, Development of high quality carrier materials for field delivery of key microorganisms used as bio fertilisers and bio-pesticides, *Radiation Physics and Chemistry*, 57(3–6), pp. 565–568.
- [8] Bai Y., Feng P., Chen W., Xu S., Liang J., Jia J., 2021, Effect of three microbial fertilizer carriers on water infiltration and evaporation, microbial community and alfalfa growth in saline-alkaline soil, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 52(20), pp. 2462–2470.
- [9] Isabel J.B., Balamurugan A., Devi P.R., Selvakumar P., 2024, Chitosan encapsulated microbial biofertilizer: a breakthrough for enhanced tomato crop productivity, *International Journal of Biological Macromolecules*, 260, p. 129462.
- [10] Akhtar N., Ilyas N., Meraj T.A., Pour-Aboughadareh A., Sayyed R.Z., Mashwani Z.U.R., 2022, Improvement of plant responses by nanobiofertilizer: a step towards sustainable agriculture, *Nanomaterials*, 12(6), p. 965.

- [11] Wagner S.C., 2011, Biological nitrogen fixation, *Nature Education Knowledge*, 3(10), p. 15.
- [12] Tairo E.V., Ndakidemi P.A., 2013, Possible benefits of rhizobial inoculation and phosphorus supplementation on nutrition, growth and economic sustainability in grain legumes, *American Journal of Research Communication*, 1, pp. 532–556.
- [13] Aasfar A., Bargaz A., Yaakoubi K., Hilali A., Bennis I., Zeroual Y., Kadmiri I.M., 2021, Nitrogen fixing Azotobacter species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability, *Frontiers in Microbiology*, 12, p. 628379.
- [14] Schindelin H., Kisker C., Schlessman J.L., Howard J.B., Rees D.C., 1997, Structure of ADP × AlF<sub>4</sub>(-)-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction, *Nature*, 387(6631), pp. 370–376.
- [15] Postgate J.R., 1982, *The Fundamentals of Nitrogen Fixation*, Cambridge University Press, New York.
- [16] Hubbell D.H., Kidder G., 2009, *Biological Nitrogen Fixation*, University of Florida IFAS Extension, Florida.
- [17] Nguyễn Thị Thu Hằng, Nguyễn Thị Thủy, 2015, Tuyển chọn vi khuẩn Azotobacter có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, 4.
- [18] Khan H.R., Mohiuddin, Rahman, 2008, Enumeration, isolation and identification of nitrogen-fixing bacterial strains at seeding stage in rhizosphere of rice grown in non-calcareous grey flood plain soil of Bangladesh, *Journal of the Faculty of Environmental Science and Technology*, 13, pp. 97–101.
- [19] Vadakattu G., Paterson J., 2006, Free-living bacteria increase soil nitrogen, *Farming Ahead*, 169, p. 40.
- [20] Fattah Q.A., 2005, Plant resources for human development, *Proceedings of the Third International Botanical Conference*, Bangladesh Botanical Society, Dhaka.
- [21] Benson D.R., Silvester W.B., 1993, Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants, *Microbiological Reviews*, 57, pp. 293–319.
- [22] Vance C., 2001, Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition, *Plant Physiology*, 127, pp. 391–397.

- [23] Lan P.T.N., Xuân L.T.T., Châu N.T.B., 2020, Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cố định nitrogen từ đất trồng rau ở thành phố Pleiku, tỉnh Gia Lai, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 17(2).
- [24] Glick B.R., 2012, Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications, *Scientifica*, p. 963401.
- [25] Patten C.L., Glick B.R., 2002, Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), pp. 3795–3801.
- [26] Duca D., Lorv J.R., Patten C.L., Rose D., Glick B.R., 2014, Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions, *Antonie van Leeuwenhoek*, 106, pp. 85–125.
- [27] Koga J., Adachi T., Hidaka H., 1991, Molecular cloning of the gene for indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, *Molecular and General Genetics*, 226, pp. 10–16.
- [28] Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R., 2007, Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling, *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), pp. 425–448.
- [29] Manulis S., Haviv-Chesner A., Brandl M.T., Lindow S.E., Barash I., 1998, Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophylae*, *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 11, pp. 634–642.
- [30] Glick B.R., Penrose D.M., Li J., 1998, A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria, *Journal of Theoretical Biology*, 190, pp. 63–68.
- [31] Pollmann S., Muller A., Piotrowski M., Weiler E.W., 2002, Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana*, *Planta*, 216, pp. 155–161.
- [32] Bak S., Tax F.E., Feldmann K.A., Galbraith D.W., Feyereisen R., 2001, CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, 13, pp. 101–111.
- [33] Zhao Y., Christensen S.K., Fankhauser C., Cashman J.R., Cohen J.D., Weigel D., Chory J., 2001, A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis, *Science*, 291, pp. 306–309.

- [34] Hartmann A., Singh M., Klingmüller W., 1983, Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid, *Canadian Journal of Microbiology*, 29, pp. 916–923.
- [35] Kobayashi M., Suzuki T., Fujita T., Masuda M., Shimizu S., 1995, Occurrence of enzymes involved in biosynthesis of indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile in plant-associated bacteria, *Agrobacterium* and *Rhizobium*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, pp. 714–718.
- [36] Oberhansli T., Defago G., Haas D., 1991, Indole-3-acetic acid synthesis in the biocontrol strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase, *Journal of General Microbiology*, 137, pp. 2273–2279.
- [37] Müller A., Weiler E.W., 2000, Indolic constituents and indole-3-acetic acid biosynthesis in the wild-type and a tryptophan auxotroph mutant of *Arabidopsis thaliana*, *Planta*, 211, pp. 855–863.
- [38] Prinsen E., Costacurta A., Michiels K., Vanderleyden J., Van Onckelen H., 1993, *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway, *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 6, pp. 609–615..
- [39] Sakarika M., Kornaros M., 2019, Purple non-sulfur bacteria and their potential for sustainable agriculture and wastewater treatment, *Biotechnology Advances*, 37, pp. 107403.
- [40] Koh R.H., Song H.G., 2007, Effects of application of *Rhodopseudomonas sp.* on crop growth and N<sub>2</sub>O emission during rice cultivation, *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 26(4), pp. 319–325.
- [41] Imhoff J.F., Hiraishi A., Süling J., 2005, Anoxygenic phototrophic purple bacteria, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer, pp. 119–132.
- [42] Imhoff J.F., 2017, Diversity of anaerobic anoxygenic phototrophic purple bacteria, *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes: Environmental and Applied Aspects*, Springer, Cham, pp. 47–85.
- [43] Petushkova E.P., Tsygankov A.A., 2017, Acetate metabolism in the purple non-sulfur bacterium *Rhodobacter capsulatus*, *Frontiers in Microbiology*, 8, p. 604.
- [44] Lee C.S., Song I.H., Lee A., Kang J., Lee Y.S., Lee I.K., Song Y.S., Lee S.H., 2021, Enhancing the landscape of colorectal cancer using targeted deep sequencing, *Scientific Reports*, 11, p. 8154.

- [45] Sakpirom J., Kantachote D., Nunkaew T., Khan E., 2017, Characterizations of purple non-sulfur bacteria isolated from paddy fields, and identification of strains with potential for plant growth-promotion, greenhouse gas mitigation and heavy metal bioremediation, *Research in Microbiology*, 168(3), pp. 266–275.
- [46] Imhoff J.F., Trüper H.G., 1989, Purple non-sulfur bacteria, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3, Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1658–1680.
- [47] Krieg N.R., Holt J.G. (eds.), 1989, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore.
- [48] Imhoff J.F., 2001, The anoxygenic phototrophic purple bacteria, trong: Boone D.R., Garrity G.M. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., Springer-Verlag, p. 53.
- [49] Thornber J.R., Trosper T.L., Strouse C.E., 1978, Bacteriochlorophyll in vivo: relationships of spectral forms to specific membrane components, *The Photosynthetic Bacteria*, Plenum Press, London, pp. 133–160.
- [50] Zuber H., Cogdell R.J., 1995, Structure and organisation of purple bacterial antenna complexes, *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 315–348.
- [51] Morrison H.M., Bose A., 2024, Purple non-sulfur bacteria for biotechnological applications, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 52, pp. kuae052.
- [52] Asif A., Mohsin H., Rehman Y., 2021, Purple nonsulfur bacteria: an important versatile tool in biotechnology, *Recent Advancement in Microbial Biotechnology*, Academic Press, London, pp. 309–337.
- [53] Madigan M.T., Jung D.O., 2009, An overview of purple bacteria: systematics, physiology and habitats, *The Purple Phototrophic Bacteria*, Springer, Amsterdam, pp. 1–15.
- [54] Alloul A., Blansaer N., Segura P.C., Wattiez R., Vlaeminck S.E., Leroy B., 2023, Dehazing redox homeostasis to foster purple bacteria biotechnology, *Trends in Biotechnology*, 41, pp. 106–119.
- [55] Richardson D.J., King G.F., Kelly D.J., McEwan A.G., Ferguson S.J., Jackson J.B., 1988, The role of auxiliary oxidants in maintaining redox balance during phototrophic growth of *Rhodobacter capsulatus* on propionate or butyrate, *Archives of Microbiology*, 150, pp. 131–137.

- [56] Larimer F.W., et al., 2004, Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*, *Nature Biotechnology*, 22, pp. 55–61.
- [57] Hoffmann M.C., Müller A., Fehringer M., Pfänder Y., Narberhaus F., Masepohl B., 2014, Coordinated expression of *fdxD* and molybdenum nitrogenase genes promotes nitrogen fixation by *Rhodobacter capsulatus* in the presence of oxygen, *Journal of Bacteriology*, 196, pp. 633–640.
- [58] Masepohl B., 2017, Regulation of nitrogen fixation in photosynthetic purple nonsulfur bacteria in *Modern Topics in Phototrophic Prokaryotes*, pp. 1–26.
- [59] Soundararajan M., et al., 2019, Phototrophic N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> fixation using a *Rhodospseudomonas palustris*–H<sub>2</sub> mediated electrochemical system with infrared photons, *Frontiers in Microbiology*, 10, p. 1817.
- [60] Burris R.H., Roberts G.P., 1993, Biological nitrogen fixation, *Annual Review of Nutrition*, 13, pp. 317–335.
- [61] Taiz L., Zeiger E., Møller I.M., Murphy A., 2015, *Plant Physiology and Development*, 6th ed., Sinauer Associates.
- [62] Sakarika M., et al., 2020, Purple non-sulphur bacteria and plant production: benefits for fertilization, stress resistance and the environment, *Microbial Biotechnology*, 13, pp. 1336–1365.
- [63] Su P., Tan X., Li C., Zhang D., Cheng J., Zhang S., Zhou X., Yan Q., Peng J., Zhang Z., Liu Y., Lu X., 2017, Photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* GJ-22 induces systemic resistance against viruses, *Microbial Biotechnology*, 10, pp. 612–624.
- [64] Ge R., Zhang Y., 2019, Growth-promoting ability of *Rhodospseudomonas palustris* G5 and its effect on induced resistance in cucumber against salt stress, *Journal of Plant Growth Regulation*, 38, pp. 1476–1486.
- [65] Wong W.T., Tseng C.H., Hsu S.H., Lur H.S., Mo C.W., Huang C.N., Hsu S.C., Lee K.T., Liu C.T., 2014, Promoting effects of a single *Rhodospseudomonas palustris* inoculant on the growth of *Brassica rapa chinensis* under low fertilizer input, *Microbes and Environments*, 29(3), pp. 303–313.
- [66] Nookongbut P., Jingjit N., Kantachote D., Sukhoom A., Tantirungkij M., 2020, Selection of acid-tolerant purple non-sulfur bacteria for agricultural applications, *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*, 19, p. 775.

- [67] Bong K., Kim J., Yoo J.H., Park I., Lee C.W., Kim P., 2016, Mass cultivation and secondary metabolite analysis of *Rhodobacter capsulatus* PS-2, *KSBB Journal*, 31, pp. 158–164.
- [68] Kang S.M., et al., 2020, Inoculation of rhizobacterium *Rhodobacter sphaeroides* KE149 producing indole-3-acetic acid enhances growth of adzuki bean under drought stress conditions, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, pp. 717–725.
- [69] Sundar L.S., Chao Y.Y., 2022, Potential of Purple Non-Sulfur Bacteria in Sustainably Enhancing the Agronomic and Physiological Performances of Rice, *Agronomy*, 12(10), p. 2347.
- [70] Elbadry M., Elbanna K., Gomaa A., 1999, Occurrence of phototrophic purple nonsulfur bacteria in rice fields of Egypt, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15, pp. 411–416.
- [71] Kundu B.S., Ladha J.K., 1997, Microbiological studies on the yield of rice and nitrogen balance in rice–rice and rice–wheat cropping systems, *Biology and Fertility of Soils*, 24, pp. 132–138.
- [72] Rana A., Joshi M., Prasanna R., Shivay Y.S., Nain L., 2016, Biofortification of wheat through inoculation of plant growth promoting rhizobacteria and cyanobacteria, *European Journal of Soil Biology*, 75, pp. 36–43.
- [73] Kantha T., Song C., Park K., Koh R.H., 2015, Evaluation of selected purple non-sulfur bacterial strains for agricultural use, *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, 48(1), pp. 29–36.
- [74] Gamal-Eldin H.M., Elbanna K., 2011, Field assessment of biofertilizers for sustainable agriculture, *Egyptian Journal of Microbiology*, 46, pp. 95–110.
- [75] Zhai Z., Chen A., Zhou H., Zhang D., Du X., Liu Q., Wu X., Cheng J., Chen L., Hu F., Liu Y., Su P., 2021, Structural characterization and functional activity of an exopolysaccharide secreted by *Rhodopseudomonas palustris* GJ-22, *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, pp. 160–168.
- [76] Yen K.S., Sundar L.S., Chao Y.Y., 2022, Foliar application of *Rhodopseudomonas palustris* enhances the rice crop growth and yield under field conditions, *Plants*, 11, p. 2452.
- [77] Zhao Y., Sun Y., Pei M., Fu J., Ji H., Zhao L., Xiao X., 2021, Enhanced rice yields are related to pronounced shifts in soil resident bacterial community structures in response to *Rhodopseudomonas palustris* and *Bacillus subtilis* inoculation, *Journal of Soils and Sediments*, 21, pp. 2369–2380.

- [78] Arashida H., Kugenuma T., Watanabe M., Maeda I., 2019, Nitrogen fixation in *Rhodopseudomonas palustris* co-cultured with *Bacillus subtilis* in the presence of air, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127, pp. 589–593.
- [79] Khan M.R., Khan N., Khan S.M., 2001, Evaluation of agricultural materials as substrate for mass culture of fungal biocontrol agents of Fusarial wilt and root-knot nematode diseases, *Tests of Agrochemicals and Cultivars*, 22, pp. 50–51.
- [80] Su Y., 2017, Effects of purple non-sulfur bacteria fertilizer on control of plant virus disease, *Journal of Agricultural Science and Technology*, 19(1), pp. 129–138.
- [81] Minh V.Q., Vũ P.T., 2015, Ảnh hưởng của độ mặn đến hoạt động sinh học đất vùng Đồng bằng sông Cửu Long, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 38, tr. 103–112.
- [82] Linh N.T.M., Đức T.V., Mai P.N., 2019, Khả năng chịu mặn và ứng dụng của một số chủng *Rhodopseudomonas palustris* phân lập từ đất mặn tỉnh Sóc Trăng, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 56, tr. 112–120.
- [83] Hùng L.V., Thu P.T., Lợi N.V., 2020, Ảnh hưởng của vi khuẩn tía quang hợp *Rhodobacter sphaeroides* đến sinh trưởng và năng suất lúa trên đất phèn tại Trà Vinh, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 4, tr. 66–72.
- [84] Khuong N.Q., Nhat N.M., Thu L.T.M., Thuc L.V., 2024, Influence of purple non-sulfur bacterial augmentation on soil nutrient dynamics and rice (*Oryza sativa*) growth in acidic saline-stressed environments, *PeerJ*, 12, p. e16943.
- [85] Khuong N.Q., Quyen L.K., Nguyen T.K., Nguyen T.T.K., Trong N.D., Thu L.T.M., Ngoc V.Y., Quang L.T., Thang L.C., Thao P.T.P., 2025, Effect of K-solubilizing purple nonsulfur bacteria on soil K content, plant K uptake and yield of hybrid maize grown on alluvial soil in a dyke area in field conditions, *Applied Microbiology*, 5(4).
- [86] Hülsen T., Hsieh K., Batstone D.J., 2019, Saline wastewater treatment with purple phototrophic bacteria, *Water Research*, 160, pp. 259–267.
- [87] Wada O.Z., Vincent A., McKay G., Mackey H.R., 2023, Converting fuel-synthesis process water to aquaculture feed by purple non-sulfur bacteria, *Chemical Engineering & Technology*, 46(6), pp. 1126–1133.
- [88] Hülsen T., Barry E.M., Lu Y., Puyol D., Keller J., Batstone D.J., 2016, Domestic wastewater treatment with purple phototrophic bacteria using a novel continuous photo anaerobic membrane bioreactor, *Water Research*, 100, pp. 486–495.

- [89] Cerruti M., Stevens B., Ebrahimi S., Alloul A., Vlaeminck S.E., Weissbrodt D.G., 2020, Enrichment and aggregation of purple non-sulfur bacteria in a mixed culture sequencing-batch photobioreactor for biological nutrient removal from wastewater, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, p. 557234.
- [90] Bunraksa T., Kantachote D., Chaiprapat S., 2020, The potential use of purple nonsulfur bacteria to simultaneously treat chicken slaughterhouse wastewater and obtain valuable plant growth promoting effluent and their biomass for agricultural application, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28, p. 101721.
- [91] Hülsen T., Hsieh K., Lu Y., Tait S., Batstone D.J., 2018, Simultaneous treatment and single cell protein production from agri-industrial wastewaters using purple phototrophic bacteria or microalgae – A comparison, *Bioresource Technology*, 254, pp. 214–223.
- [92] Lee S.S., Oh T.J., Kim J., Kim J.B., Lee H.S., 2009, Bacteriocin from Purple Nonsulfur Phototrophic Bacteria, *Rhodobacter capsulatus*, *Journal of Bacteriology and Virology*, 39(4), pp. 269–276.
- [93] Banerjee S., Azad S.A., Vikineswary S., Selvaraj O.S., Mukherjee T.K., 2000, Phototrophic bacteria as fish feed supplement, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 13(7), pp. 991–994.
- [94] Chowdhury A.J.K., Zakaria N.H., Abidin Z.A.Z., Rahman M.M., 2016, Phototrophic purple bacteria as feed supplement on the growth, feed utilization and body compositions of Malaysian mahseer (*Tor tambroides*) juveniles, *Sains Malaysiana*, 45(1), pp. 135–140.
- [95] Loo P.L., Chong V.C., Ibrahim S., Sabaratnam V., 2015, Manipulating culture conditions and feed quality to increase the survival of larval marble goby (*Oxyeleotris marmorata*), *North American Journal of Aquaculture*, 77(2), pp. 149–159.
- [96] Shapawi R., Ting T.E., Al-Azad S., 2012, Inclusion of purple non-sulfur bacterial biomass in formulated feed to promote growth, feed conversion ratio and survival of Asian seabass (*Lates calcarifer*) juveniles, *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 7(6), pp. 475–480.
- [97] Kobayashi M., Tchan Y.T., 1973, Treatment of industrial waste solutions and production of useful by-products using a photosynthetic bacterial method, *Water Research*, 7(8), pp. 1219–1224.

- [98] Delamare-Deboutteville J., Batstone D.J., Kawasaki M., Stegman S., Salini M., Tabrett S., Smullen R., Barnes A.C., Hülsen T., 2019, Mixed culture purple phototrophic bacteria is an effective fishmeal replacement in aquaculture, *Water Research X*, 4, p. 100031.
- [99] Vatsala T.M., Rekha R., Srividhya R., 2011, Novel substrate (algal protein) for cultivation of *Rhodospirillum rubrum*, *Indian Journal of Experimental Biology*, 49(10), pp. 773-778.
- [100] Van Niel C.B., 1971, Techniques for the enrichment, isolation, and maintenance of the photosynthetic bacteria, *Methods in Enzymology*, 23, pp. 3-28.
- [101] Nguyễn Lâm Dũng, 1979, *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- [102] Ahmad F., Ahmad I., Khan M.S., 2005, Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan, *Turkish Journal of Biology*, 29(1), pp. 29-34.
- [103] Yen H.T., Quynh T.T.T., Ha C.H., Thanh D.T., Hang D.T.T., 2019, Identification and characterization of a purple nonsulfur bacterium isolated from coastal area of Hai Phong for using in production of unsaturated fatty acid (omega 6, 7, 9), *Vietnam Journal of Science and Technology*, 57(6), pp. 665-676.
- [104] Gram C., 1884, Über die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten, *Fortschritte der Medizin*, 2, pp. 185-189.
- [105] Lê Trần Bình, Phan Văn Chi, Nông Văn Hải, Trương Nam Hải, Lê Quang Huấn, 2003, *Áp dụng các kỹ thuật phân tử trong nghiên cứu tài nguyên sinh vật Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- [106] Sambrook J., Russell D.W., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- [107] Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., 1977, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), pp. 5463-5467.
- [108] Masepohl B., Kranz R.G., 2009, Regulation of Nitrogen Fixation, *The Purple Phototrophic Bacteria*, pp. 759-775.
- [109] Gutierrez J., Atulba S.L., Kim G., Kim P.J., 2014, Importance of rice root oxidation potential as a regulator of CH<sub>4</sub> production under water logged conditions, *Biology and Fertility of Soils*, 50(5), pp. 861-868.

- [110] Nookongbut P., Kantachote D., Megharaj M., Naidu R., 2018, Reduction in arsenic toxicity and uptake in rice (*Oryza sativa* L.) by As-resistant purple nonsulfur bacteria, *Environmental Science and Pollution Research*, 25, pp. 36530-36544.
- [111] Nguyen Thi Thu Hang, Nguyen Thi Thuy, 2015, Selection of Azotobacter bacteria with the ability to fix nitrogen and synthesize IAA, *Journal of Forestry Science and Technology*, (4).
- [112] Thai Thanh Duoc, Nguyen Huu Hiep, 2022, Isolation and identification of nitrogen fixing bacteria from corn root zone soil in the Mekong Delta, *Can Tho University Journal of Science*, 58(2B), pp. 160-171.
- [113] Pham Thi Ngoc Lan, Le Thi Thanh Xuan, Ngo Thi Bao Chau, 2020, Isolation and selection of nitrogen-fixing bacteria from vegetable soil in Pleiku city, Gia Lai province, *Journal of Science and Technology, University of Science, Hue University*, 17(2), pp. 117-125.
- [114] Hoàng Kim Chi, Nguyễn Đình Tuấn, Trần Hồ Quang, Nguyễn Thanh Lâm, Lê Hữu Cường, Trần Thị Hồng Hà, Lê Mai Hương, Trần Thị Như Hằng, 2019, Screening and study of some strains of growth-promoting rhizosphere bacteria isolated from turmeric (*Curcuma longa* L.) in Vietnam, *Vietnam Journal of Science and Technology*, 62(5), tr. 54-59.
- [115] Torres-Rubio MG., Valencia-Plata SA., Bernal-Castillo J., Martinez-Nieto P., 2000, Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., producers of indole-3-acetic acid and siderophores, from Colombian rice rhizosphere, *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42, pp. 171-176.
- [116] Giriya KR., Ramana VV., Spröer C., Sasikala C., Takaichi S., Thiel V., Imhoff JF., 2010, *Rhodobacter johrii* sp. nov., an endospore-producing cryptic species isolated from semi-arid tropical soils, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, pp. 2099-2107.

**DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ**

1. Do Thi Lien, Cung Thi Ngoc Mai, Dinh Thi Thu Hang, Tran Thi Mai, **Nguyen Thi Kim Tien**, Le Thi Nhi Cong, Bui Thi Kim Anh, Nghiem Ngoc Minh (2026). “Characterization of nitrogen-fixing and IAA-producing purple non-sulfur bacteria isolated from rice fields in Nam Dinh, Vietnam.” *Academia Journal of Biology*, 48(1): 77–91. DOI: 10.15625/2615-9023/22919.

## PHỤ LỤC

**Phụ lục 1: Hàm lượng  $\text{NH}_4^+$  sinh ra trong dịch nuôi (mg/L) ở các pH khác nhau của chủng  $\text{Y}_{11}$  và  $\text{GT}_{10}$  trong điều kiện vi hiếu khí sáng nhau**

pH \ Chủng	GT <sub>10</sub>	Y <sub>11</sub>
	Hàm lượng $\text{NH}_4^+$ trong dịch nuôi (mg/L)	
4	5,17±0,55	5,01±0,50
5	5,35±0,60	5,15±0,63
6	4,17±0,66	3,95±0,58
7	4,15±0,71	3,90±0,47
8	3,70±0,76	4,58±0,55
9	2,55±0,45	4,17±0,60

**Phụ lục 2: Khả năng sinh trưởng của chủng  $\text{Y}_{11}$  và  $\text{GT}_{10}$  ở các pH khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng**

pH \ Chủng	GT <sub>10</sub>	Y <sub>11</sub>
	$\Delta\text{OD}_{800}$	
4	0,51±0,17	0,57±0,18
5	1,72±0,20	0,93±0,22
6	2,33±0,32	1,32±0,19
7	2,40±0,21	1,95±0,30
8	2,22±0,30	2,02±0,41
9	2,10±0,32	0,95±0,23

**Phụ lục 3: Hàm lượng IAA sản sinh ra trong dịch nuôi ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ở các pH khác nhau của chủng Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> trong điều kiện vi hiếu khí sáng**

pH \ Chủng	GT <sub>10</sub>	Y <sub>11</sub>
	Hàm lượng IAA sản sinh ra ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	
4	68,20 $\pm$ 3,60	24,17 $\pm$ 1,09
5	139,11 $\pm$ 4,81	109,06 $\pm$ 2,45
6	219,62 $\pm$ 3,92	120,23 $\pm$ 3,81
7	208,03 $\pm$ 2,93	148,21 $\pm$ 3,97
8	194,51 $\pm$ 3,52	159,45 $\pm$ 4,16
9	189,62 $\pm$ 3,64	105,10 $\pm$ 5,24

**Phụ lục 4: Hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sinh ra trong dịch nuôi (mg/L) ở các nồng độ muối khác nhau của chủng Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> trong điều kiện vi hiếu khí sáng**

NaCl (%) \ Chủng	GT <sub>10</sub>	Y <sub>11</sub>
	Hàm lượng NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> trong dịch nuôi (mg/L)	
0	4,08 $\pm$ 0,65	4,13 $\pm$ 0,50
0,5	4,15 $\pm$ 0,80	4,90 $\pm$ 0,61
1	4,22 $\pm$ 0,82	4,89 $\pm$ 0,73
1,5	4,37 $\pm$ 0,76	5,50 $\pm$ 0,75
2	4,45 $\pm$ 0,77	5,05 $\pm$ 0,48
2,5	4,55 $\pm$ 0,88	4,48 $\pm$ 0,56
3	4,63 $\pm$ 0,67	4,15 $\pm$ 0,61

III

**Phụ lục 5: Khả năng sinh trưởng của chủng Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> ở các nồng độ muối khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng**

Chủng NaCl (%)	GT <sub>10</sub>	Y <sub>11</sub>
	$\Delta OD_{800}$	
0	2,50±0,34	2,57±0,28
0,5	2,71±0,35	2,53±0,48
1	2,63±0,39	2,42±0,36
1,5	2,72±0,60	2,05±0,40
2	2,45±0,30	2,22±0,42
2,5	2,24±0,40	1,25±0,32
3	2,12±0,50	1,15±0,24

**Phụ lục 6: Hàm lượng IAA sản sinh ra trong dịch nuôi ( $\mu\text{g/mL}$ ) của chủng Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> ở các nồng độ muối khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng**

Chủng NaCl (%)	GT <sub>10</sub>	Y <sub>11</sub>
	Hàm lượng IAA sản sinh ra ( $\mu\text{g/ml}$ )	
0%	207,80±5,61	195,97±5,09
0,5%	253,10±6,82	267,66±5,46
1%	260,23±5,91	156,23±4,80
1,5%	280,71±7,73	178,21±3,97
2%	275,00±7,10	155,45±4,16
2,5%	271,50±5,81	146,10±5,24
3%	270,66±6,60	147,27±4,35

**Phụ lục 7: Hàm lượng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sinh ra trong dịch nuôi (mg/L) ở các nhiệt độ khác nhau của chủng Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> trong điều kiện vi hiếu khí sáng**

STT	Kí hiệu chủng	Hàm lượng NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> được tạo ra (mg/L NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )		
		15-17 °C	25-30 °C	40-45 °C
1	Y <sub>11</sub>	4,30±0,64	5,04±0,44	3,75±0,41
2	GT <sub>10</sub>	3,84±0,38	4,90±0,58	3,17±0,42

**Phụ lục 8: Khả năng sinh trưởng của chủng Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> ở các nhiệt độ khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng**

STT	Kí hiệu chủng	$\Delta OD_{800}$		
		15-17 °C	25-30 °C	40-45 °C
1	Y <sub>11</sub>	1,37±0,40	2,3±0,56	1,99±0,27
2	GT <sub>10</sub>	1,25±0,55	1,97±0,46	1,71±0,44

**Phụ lục 9: Hàm lượng IAA sản sinh ra trong dịch nuôi ( $\mu\text{g/mL}$ ) ở các nhiệt độ khác nhau của chủng Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> trong điều kiện vi hiếu khí sáng**

STT	Kí hiệu chủng	Hàm lượng IAA sản sinh ra ( $\mu\text{g/ml}$ )		
		15-17 °C	25-30 °C	40-45 °C
1	Y <sub>11</sub>	108,30±2,64	190,64±6,54	88,75±3,41
2	GT <sub>10</sub>	103,84±4,30	204,90±5,57	98,17±5,42

**Phụ lục 10: Khả năng sinh trưởng của chủng Y<sub>11</sub> và GT<sub>10</sub> ở các nhiệt độ khác nhau trong điều kiện vi hiếu khí sáng (môi trường GA)**

STT	Kí hiệu chủng	$\Delta OD_{800}$		
		15-17 °C	25-30 °C	40-45 °C
1	Y <sub>11</sub>	1,43±0,24	2,87±0,24	1,75±0,21
2	GT <sub>10</sub>	1,64±0,38	2,50±0,28	1,67±0,22

**Phụ lục 11: Trình tự gene 16S rDNA của 2 chủng vi khuẩn tía quang hợp  
tuyển chọn**

***Y11- Rhodopseudomonas palustris 1390 bp:***

GCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGCGTAGCAATACGTCAGTGG  
CAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTACCTTTTGGTTCGGAACAACACAGGGAAA  
CTTGTGCTAATACCGGATAAGCCCTTACGGGGAAAGATTTATCGCCGAAAGATCGGCC  
CGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTG  
GTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGA  
GGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTG  
AGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTGTGCGGGAAGATAATGACGGTACC  
GCAAGAATAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCT  
AGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGGTTTCTAAGTCAGAGG  
TGAAAGCCTGGAGCTCAACTCCAGAACTGCCTTTGATACTGGAAGTCTTGAGTATGGC  
AGAGGTGAGTGGAAGTGCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACAC  
CAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGGCCATTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGG  
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCCAGCCGTT  
AGTGGGTTTACTCACTAGTGGCGCAGCTAACGCTTTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTAC  
GGTCGCAAGATTAAGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCAT  
GTGGTTTAATTCGACGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATGTCCAGGACCG  
GTCGCAGAGACGTGACCTTCTCTTCGGAGCCTGGAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTGC  
TCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCCGTCCTT  
AGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAGCCGCGAGGAA  
GGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACA  
ATGGCGGTGACAATGGGAAGCTAAGGGGTGACCCTTCGCAAATCTCAAAAAGCCGTC  
TCAGTTCGGATTGGGCTCTGCAACTCGAGCCCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGT  
GGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACC  
ATGGGAGTTGGCTTTACCTGAAGACGGTGCCTAACCCGCAAGGGGGGCAGCCGGCC  
ACGGTAGGTCAGCG

***GT10-Rhodobacter capsulatus 1362 bp:***

TGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAGACCTTCGGGTCTAGCGG  
CGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTGCCCTTTGCTACGGAATAGCCCCGGGAAA  
CTGGGAGTAATACCGTATGTGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGGCAAAGGATCGGCC  
CGCGTTGGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGCCGACGATCCATAGCTG  
GTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA  
GGCAGCAGTGGGGAATCTTAGACAATGGGGGAAACCCTGATCTAGCCATGCCGCGTG  
AGCGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGGTGGGAAGATAATGACGGTACC  
ACCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCT  
AGCGTTGTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCAGAAAGTCAGAG  
GTGAAATCCCAGGGCTCAACCTTGGAACTGCCTTTGAAACTCCTGGTCTTGAGGTCGA  
GAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACA  
CCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG

## VI

GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCCAGTCGT  
CGGCAGGCATGCCTGTTCGGTGACACACCTAACGGATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTA  
CGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCA  
TGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAACCCTTGACATCGAGATCGCG  
GTTACCAGAGATGGTTTCCTTCAGTTCGGCTGGATCTTAGACAGGTGCTGCATGGCTGT  
CGTCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTTCGGTTAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCACACTT  
TCAGTTGCCATCATTTCAGTTGGGCACTCTGGAAGA ACTGCCGATGATAAGTCGGAGGA  
AGGTGTGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGTTGGGCTACACACGTGCTAC  
AATGGTGGTGACAATGGGCCAATCCCAAAAAGCCATCTCAGTTTCGGATTGGGGTCTGC  
AACTCGACCCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTAACAGCATGACGCGGTGA  
ATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCCGTCACACCATGGGAATTGGGTCTACCCT  
AAGATGGTGCGCCAACCAAGCAATGGAGGCAGCCAGCCACGTAG

**CHARACTERIZATION OF NITROGEN-FIXING AND IAA-PRODUCING  
PURPLE NON-SULFUR BACTERIA ISOLATED FROM RICE FIELDS  
IN NAM DINH, VIETNAM**

**Do Thi Lien<sup>1,\*</sup>, Cung Thi Ngoc Mai<sup>1</sup>, Dinh Thi Thu Hang<sup>2</sup>, Tran Thi Mai<sup>1</sup>,  
Nguyen Thi Kim Tien<sup>4</sup>, Le Thi Nhi Cong<sup>1</sup>, Bui Thi Kim Anh<sup>3</sup>, Nghiem Ngoc Minh<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Biology, Vietnam Academy of Science and Technology,  
18 Hoang Quoc Viet, Nghia Do, Ha Noi, Vietnam

<sup>2</sup>Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy  
of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Ha Noi, Vietnam

<sup>3</sup>Institute of Science and Technology for Energy and Environment, Vietnam Academy  
of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Ha Noi, Vietnam

<sup>4</sup>Phacogen Pharmaceutical Joint Stock Company, Ha Noi, Vietnam

Received 22 May 2025; accepted 12 March 2026

**ABSTRACT**

This study aimed to select purple photosynthetic bacteria (PPB) isolated from various paddy fields, including saline fields in Giao Thuy and paddy fields in Y Yen, based on their biofertilizer properties. Among 24 PPB isolates, strains GT10 and Y11 exhibited the highest efficiency in indole-3-acetic acid (IAA) production and nitrogen fixation. GT10 colonies were circular and convex, with smooth surfaces, reddish brown, diameter: 0.9-1.2 mm. The cell suspension appeared reddish-brown. Colonies of strain Y11 were spread out, reddish brown, slimy, diameter: 1.8-2.2 mm, with a purple-colored cell suspension. GT10 cells were oval-shaped (0.9-1.25  $\mu\text{m}$  long, 0.6-0.7  $\mu\text{m}$  wide) and reproduced by binary fission. In contrast, Y11 cells were rod-shaped (1.4-1.58  $\mu\text{m}$  long, 0.36-0.441  $\mu\text{m}$  wide) and reproduced by budding. Elemental sulfur globules were not observed in either strain. Both were Gram-negative and contained bacteriochlorophyll a as their primary photosynthetic pigment. The GT10 strain was able to use carbon sources such as acetate, propionate, lactate, succinate, formate, citrate, mannitol, sorbitol, glycerol, glutamate, isopropanol, sulfide, but not tartrate, methanol, or ethanol. These characteristics are consistent with the genus *Rhodobacter*. Y11 strain was able to use carbon sources such as acetate, propionate, lactate, succinate, formate, citrate, mannitol, sorbitol, glycerol, glutamate, or sulfide, but did not utilize tartrate, methanol, ethanol, or isopropanol. These capacities are similar to those of the *Rhodospseudomonas* species. Based on 16S rDNA sequencing, strain Y11 was identified as *Rhodospseudomonas palustris*, while strain GT10 was *Rhodobacter capsulatus*. The combined application of GT10 and Y11 strains may offer a sustainable biofertilizer alternative to chemical fertilizers in rice cultivation.

**Keywords:** IAA production, fixing molecular nitrogen, *Rhodospseudomonas palustris*, *Rhodobacter capsulatus*, Purple photosynthetic bacteria.

*Citation:* Do Thi Lien, Cung Thi Ngoc Mai, Dinh Thi Thu Hang, Tran Thi Mai, Nguyen Thi Kim Tien, Le Thi Nhi Cong, Bui Thi Kim Anh, Nghiem Ngoc Minh, 2026. Characterization of nitrogen-fixing and IAA-producing purple non-sulfur bacteria isolated from rice fields in Nam Dinh, Vietnam. *Academia Journal of Biology*, 48(1): 77–91. <https://doi.org/10.15625/2615-9023/22919>

\*Corresponding author email: [lien.ibt@gmail.com](mailto:lien.ibt@gmail.com)

## INTRODUCTION

Crop productivity and production efficiency are central goals in modern agriculture. Among the contributing factors, fertilizers are vital in enhancing crops' yield and quality. In rice cultivation (*Oryza sativa*), particularly under intensive farming systems, productivity cannot be sustained without fertilizer inputs (Kantha et al., 2015). Consequently, nitrogen-based chemical fertilizers have been widely applied to increase rice yield. However, prolonged use of these fertilizers is associated with several environmental concerns, including declining soil health and groundwater contamination by nitrate (Wang & Yang et al., 2003).

Increasing demands for organic farming products have recently encouraged farmers to utilize biofertilizers instead of chemicals. For instance, applying cultures of effective microorganisms (EM) to certain agricultural lands in Asia, including Vietnam, has been reported to improve soil quality, promote crop growth, and enhance crop yield. Recently, sustainable agriculture has been promoted, and plant growth-promoting bacteria and biofertilizers are among the substitutes for chemical fertilizers. Nitrogen is one of the major essential elements for plant growth. Biological nitrogen fixation by  $N_2$ -fixing microorganisms is an effective mechanism for converting  $N_2$  into ammonium ions ( $NH_4^+$ ), which can be used by plants (Olivares et al., 2013). Purple photosynthetic bacteria (PPB) are among nitrogen-fixing bacteria and are candidates for applications in paddy fields due to their extraordinary metabolic versatility, i.e. photoautotrophic, photoorganotrophic, chemoautotrophic and chemoorganotrophic (Sakarika et al., 2020). PPB not only fix  $N_2$ , but also produces plant growth-promoting substances (PGPSs) such as indole-3-acetic acid (IAA). IAA, commonly known as 'IAA', belongs to the group of auxins. Auxins are essential for plant development and have a cardinal role in regulating many growth and behavioural processes in the plant's life cycle. They are responsible for plant cell division, extension and specialization (Tsavkelova et al., 2006). Specifically, IAA is a phytohormone

playing a role in the growth activation of plants by inducing plant mineral uptake and root cell elongation (Sakarika et al., 2020). It also increases plant tolerance to salinity and low-temperature stress (Watanabe et al., 2000). Purple photosynthetic bacteria have been extensively used to enhance plant growth due to their metabolic versatility. PPB can utilize various organic compounds as carbon and energy sources during photoorganotrophic and chemoorganotrophic growth (Kim et al., 2004; Kantachote et al., 2005). There are claims that PPB can remove environmental contaminants such as  $H_2S$  and develop mechanisms of resistance to high concentrations of toxic metals such as Hg, As, Cd, Cu, Pb, and Zn (Ercal et al., 2001; Panwichian et al., 2010b), including Na (Panwichian et al., 2010a). Therefore, employing PPB in paddy fields could provide an attractive method to reduce chemical fertilizer use, aid rice plants in withstanding harsh conditions, and improve product quality. The experiment was set up in two fields, one as a control and the other as a PPB-treated field by Yen et al. (2022). PPB-treatment significantly increased root length (25%), root dry weight (57%), productive tillers per plant (26%), average grains per plant (38%), grain yield (33%), 1000 grain weight (1.6%), and harvest index (41%). Hence, from this research, it can be concluded that foliar application of PNSB on rice crops under field conditions improves crop growth and yield (Yen et al., 2022).

Limited studies have explored the potential of PPB as biofertilizers for paddy fields in Vietnam. Therefore, this study aimed to isolate and select PPB strains that can fix nitrogen ( $NH_4^+$ ) and produce indole-3-acetic acid (IAA) to promote plant growth. The selected PPB strains may offer a practical and eco-friendly alternative to chemical fertilizers in rice cultivation, especially under challenging environmental conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### Sampling

Soil and water samples were collected from saline paddy fields in Giao Thuy and non-saline fields in Y Yen, Nam Dinh,

Vietnam. Soil samples were collected from 0-0.5 cm below the soil surface, while water samples were taken from 0.5 cm below the water surface. The pooled soil samples were immediately transported to the laboratory under ambient conditions. The samples were subsequently subjected to enrichment culture to isolate purple non-sulfur bacteria.

#### **Enumeration and isolation of purple phototrophic bacteria from sample collections**

Purple phototrophic bacteria were enriched from the samples using cumulative cultivation in cylindrical plastic bottles (diameter = 5 cm, height = 35 cm), designed based on a modified Winogradsky column. Water and soil samples were introduced into the bottles at a ratio of 1:1 (for water samples) or 9:1 (for field soil samples). The bottles were then filled with a modified DSMZ-27 liquid medium, sealed, and incubated under continuous incandescent light at approximately 3000 lux. The composition of the DSMZ-27 medium (per 1 L) was as follows:  $K_2HPO_4$ , 1 g;  $KH_2PO_4$ , 0.5 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.4 g; NaCl, 15 g;  $NH_4Cl$ , 0.4 g;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.05 g; yeast extract, 0.3 g; sodium acetate, 1 g; succinic acid, 0.5 g; trace element solution, 1 mL; vitamin solution, 1 mL; agar, 20 g (for solid media); and distilled water up to 1000 mL. The initial pH was adjusted to 6.8-7.0 before autoclaving. The trace element solution (per 1 L) contained: HCl (25%), 6.5 mL;  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ , 1.5 g;  $H_3BO_3$ , 0.3 g;  $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.03 g;  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0.2 g;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.1 g;  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ , 17 mg;  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ , 24 mg; and  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 36 mg; in distilled water to a final volume of 1 L. The vitamin solution (1 L) consisted of: thiamine, 500  $\mu$ g; niacin, 500  $\mu$ g; and biotin, 15  $\mu$ g, dissolved in distilled water. The solution was filter-sterilized and added aseptically to the medium before use. All media and containers were sterilized by autoclaving at 121 °C for 15 minutes before use.

#### **Isolation of purple phototrophic bacteria**

After one week of enrichment, pigmented biofilms ranging from brown-yellow to purple-red developed along the inner walls of the

culture flasks, indicating the presence of purple non-sulfur bacteria (PPB). Samples from these zones were streaked onto DSMZ-27 agar plates and incubated under nitrogen-flushed microaerobic conditions with continuous illumination (~3,000 lux). After 3–5 days, pigmented colonies (brown, pink, or purple) appeared. Repeated sub-culturing yielded pure isolates. Each pure culture was preserved by stabbing into DSMZ-27 agar at 4 °C or suspending in 20% glycerol and storing at -80 °C. Isolates were identified based on morphological, cultural, and physiological characteristics. Gram staining was performed, and bacteriochlorophyll content was measured using a UV-visible spectrophotometer (V-530, JASCO, Japan).

To evaluate carbon source utilization, a modified DSMZ-27 medium was prepared by replacing acetate and succinate with various test carbon sources (e.g., formate, citrate, tartrate, glycerol, glucose, methanol, ethanol, mannitol, sorbitol, propionate, sulfide, glutamate, isopropanol). Yeast extract was used as the sole nitrogen source. Each test medium was inoculated (1.0 mL culture per vial, in triplicate), sealed, and incubated under light (~3,000 lux) for 7 days. Growth was assessed via  $OD_{800}$  measurement.

#### **Culturing of purple phototrophic bacteria**

A single colony of purple non-sulfur bacteria was inoculated using a sterile platinum needle and put into a screw-cap tube under aseptic conditions. The tube was filled with liquid DSMZ-27 medium, sealed tightly, and incubated at room temperature (~25–28 °C) under continuous illumination from an incandescent lamp. Cells were harvested at the end of the exponential growth phase, and 10% of the culture volume was used as an inoculum for subsequent flask cultures. Flask cultivation was performed in 100 mL flasks under microaerobic-light conditions to acclimate the cells to the experimental environment.

#### **Growth of purple photosynthetic bacteria assessment**

The growth of the purple non-sulfur bacterial cultures was monitored by measuring

the optical density at 800 nm ( $OD_{800}$ ) using a UV-visible spectrophotometer (UV-160A, Shimadzu, Japan).

Selection of isolated purple phototrophic bacteria with  $N_2$ -fixing ability

PPB strains previously isolated from saline paddy fields were screened for their nitrogen-fixing capability. A nitrogen-free medium, slightly modified from Vatsala et al. (2011), was used for this purpose. The medium composition per liter was as follows: sodium acetate, 1.0 g;  $K_2HPO_4$ , 0.9 g;  $KH_2PO_4$ , 0.6 g;  $MgSO_4$ , 0.2 g;  $FeSO_4$ , 0.012 g; EDTA, 0.018 g;  $CaCl_2$ , 0.075 g;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 0.01 g;  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ , 2.8 mg;  $ZnSO_4$ , 0.75 mg;  $CuSO_4$ , 0.24 mg;  $H_3BO_3$ , 0.016 mg; and biotin, 0.001 mg. The final pH was adjusted to 7.0 using distilled water. Each isolate was inoculated into screw-cap tubes containing nitrogen-free medium at a volume ratio of 10% (v/v). The tubes were filled to eliminate headspace, while the uninoculated medium was a negative control. All cultures were incubated under microaerobic conditions at room temperature ( $\sim 25$ – $30$  °C) and illuminated with incandescent light ( $\sim 3,000$  lux) for 48 hours. According to Kolev (2007), nitrogen gas dissolves in water at concentrations of approximately 17–20 mg/L at 20–30 °C and 1 bar, which is presumed sufficient to support  $N_2$  fixation in sealed tubes. After incubation, the cultures were centrifuged at 8000 rpm for 15 minutes to collect cell-free supernatants. To screen for  $NH_4^+$  release, 0.5 mL of each supernatant was tested by adding a few drops of Nessler's reagent. The intensity of color development was used as a qualitative indicator of ammonium production: no color indicated absence of  $NH_4^+$ , pale yellow indicated low levels, yellow indicated moderate levels, and brown indicated high  $NH_4^+$  levels. Supernatants showing strong positive reactions were further quantified for ammonium concentration using a UV-visible spectrophotometer.

#### IAA production test

IAA production by PPB isolates was assessed following the method described by Ahmad et al. (2005). The isolates were

cultured in a glutamate-acetate (GA) medium in which L-sodium glutamate was replaced by 1 mM L-tryptophan as the IAA precursor. Cultures were incubated under microaerobic-light conditions for 5 days. After incubation, cultures were centrifuged at 8,000 rpm for 15 minutes, and the supernatants were collected for IAA determination. To quantify IAA, 1 mL of each culture supernatant was mixed with 2 mL of Salkowski's reagent (2% of 0.5 M  $FeCl_3$  in 35%  $HClO_4$  solution) in a test tube. The mixture was incubated at room temperature for 25 minutes, and the absorbance was measured at 530 nm using a spectrophotometer. IAA concentration was determined based on a standard curve generated with pure IAA. The GA medium used for IAA production contained (per 1 L distilled water, pH adjusted to 7.0): 3.8 g sodium glutamate, 5.44 g sodium acetate monohydrate, 2.0 g yeast extract, 0.5 g  $KH_2PO_4$ , 0.5 g  $K_2HPO_4$ , 0.8 g  $(NH_4)_2HPO_4$ , 0.2 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 53 mg  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 1.2 mg  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ , 1.2 mg  $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0.01 mg biotin, 2.5 mg ferric citrate, and 1.0 mg nicotinic acid.

#### Purple phototrophic bacteria identification

To identify the selected purple non-sulfur bacterial (PPB) strains, 16S rDNA sequence analysis was performed. The strains were cultivated in liquid DSMZ-27 medium, and cells were harvested by centrifugation. Genomic DNA was extracted from the cell pellets using the ADT DNA extraction kit according to the manufacturer's protocol. PCR amplification of the 16S rDNA gene was carried out in a 25  $\mu$ L reaction mixture containing: 1  $\mu$ L each of primers 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') and 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'); 2.5  $\mu$ L of 10 $\times$  PCR buffer; 2.5  $\mu$ L of  $MgCl_2$  (25 mM); 2  $\mu$ L of dNTP mix (2.5 mM); 2  $\mu$ L of DNA template ( $\sim 100$  ng); 0.25  $\mu$ L of Taq DNA polymerase (5 U/ $\mu$ L); and 13.75  $\mu$ L of nuclease-free water. PCR conditions were as follows: initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturation at 95 °C for 50 s, annealing at 55 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 2 min, with a final extension step at

72 °C for 10 min. PCR products were visualized by electrophoresis on 0.8% agarose gel and detected under UV light using a gel documentation system (GelDoc/UV transilluminator). Target DNA bands were excised and purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, USA). Purified PCR products were sequenced using the Sanger method (Sanger et al., 1977) on an ABI Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) at the Key Laboratory of Gene Technology, Institute of Biology. The obtained sequences were analyzed using BLAST (NCBI) and DNASTAR software to identify closely related sequences. Multiple sequence alignments and phylogenetic analyses were performed using MEGA, ClustalX, and PHYLIP software packages.

### Statistical analysis

All experiments in this study were conducted in three replicates. Mean values and the standard deviations are presented. Data were analyzed using one-way ANOVA, and statistically significant differences were considered at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Isolation of purple photosynthetic bacteria

From water and soil samples collected 1.5 to 2 months after rice transplantation in Nam Dinh, 24 purple photosynthetic bacteria (PPB) strains were successfully isolated. These isolates exhibited considerable diversity in colony morphology, including size, shape, and pigmentation variations. Colony colors ranged from brown, yellowish-brown, and reddish-brown to purple-red, dark red, and pink. Cellular morphology among the isolates was also heterogeneous, comprising short rods, oval-shaped cells, and spherical forms. No intracellular sulfur granules were observed in any of the strains. Most isolates reproduced via binary fission or budding. Based on cell shape and the absence of sulfur inclusions, all 24 isolates were preliminarily classified within the family Rhodospirillaceae, a group of purple non-sulfur bacteria.

### Selection of PPB with the ability to release $\text{NH}_4^+$

Table 1. The concentrations of  $\text{NH}_4^+$  released by the isolated PPB strains under microaerobic-light conditions for 48 h

No.	PPB strains	$\text{NH}_4^+$ (mg/L)
1	GT <sub>1</sub>	$2.63 \pm 0.92^{\text{cd}}$
2	GT <sub>2</sub>	$3.05 \pm 0.60^{\text{cd}}$
3	GT <sub>21</sub>	$0.40 \pm 0.01^{\text{a}}$
4	GT <sub>11</sub>	$3.02 \pm 1.04^{\text{cde}}$
5	GT <sub>3</sub>	$3.97 \pm 1.03^{\text{def}}$
6	GT <sub>31</sub>	$3.67 \pm 0.99^{\text{def}}$
7	GT <sub>4</sub>	$4.19 \pm 0.73^{\text{def}}$
8	GT <sub>5</sub>	$00 \pm 0.00^{\text{a}}$
9	GT <sub>6</sub>	$0.33 \pm 0.10^{\text{a}}$
10	GT <sub>7</sub>	$2.70 \pm 1.05^{\text{cd}}$
11	GT <sub>8</sub>	$3.07 \pm 1.01^{\text{cde}}$
12	GT <sub>9</sub>	$3.80 \pm 0.90^{\text{def}}$
13	GT <sub>10</sub>	$4.34 \pm 0.85^{\text{ef}}$
14	Y <sub>1</sub>	$0.85 \pm 0.18^{\text{ab}}$
15	Y <sub>11</sub>	$4.63 \pm 0.71^{\text{f}}$
16	Y <sub>12</sub>	$2.12 \pm 0.78^{\text{bc}}$
17	Y <sub>2</sub>	$1.29 \pm 0.77^{\text{ab}}$
18	Y <sub>3</sub>	$4.15 \pm 0.64^{\text{def}}$
19	Y <sub>4</sub>	$3.77 \pm 0.85^{\text{cdef}}$
20	Y <sub>5</sub>	$3.54 \pm 0.71^{\text{def}}$
21	Y <sub>6</sub>	$3.55 \pm 0.95^{\text{def}}$
22	Y <sub>7</sub>	$3.72 \pm 0.67^{\text{cdef}}$
23	Y <sub>8</sub>	$2.40 \pm 0.89^{\text{cd}}$
24	Y <sub>9</sub>	$3.94 \pm 0.94^{\text{def}}$
25	Negative control	0,00

Note: Different lowercase letters (a, b, c, d, e, f) in the same column indicate a statistically significant difference (one-way ANOVA with Duncan's post hoc,  $p < 0.05$ ).

Nitrogen fixation by purple non-sulfur bacteria (PPB) is generally sufficient under strictly anaerobic conditions, as nitrogenase activity is vulnerable to oxygen (Masepohl et al., 2009). However, paddy fields are not completely anaerobic, even under flooded conditions, which is a common practice in rice cultivation. During the day, photosynthetic oxygen production and its subsequent transport from leaves to roots can introduce oxygen into the rhizosphere and surrounding

sediments (Larsen et al., 2015). While some of this oxygen is consumed in methane oxidation, a portion remains and hinders the establishment of strictly anaerobic environments (Gutierrez et al., 2014). To better reflect in situ field conditions, this study investigated the nitrogen-fixing capacity of PPB under microaerobic-light conditions. A total of 24 PPB strains previously isolated from sediment and water samples in rice paddies were evaluated for their ability to fix atmospheric  $N_2$ , as inferred from ammonium ( $NH_4^+$ ) release in a nitrogen-free medium (Table 1).

The results demonstrated that 23 of 24 isolated strains exhibited nitrogen-fixing activity, as indicated by the ammonium accumulation ( $NH_4^+$ ) in the nitrogen-free culture medium. However, the extent of nitrogen fixation varied among the isolates. Of the 24 strains, 20 were classified as medium-level  $NH_4^+$  producers, and three exhibited low-level production, while no  $NH_4^+$  was detected in strain GT<sub>5</sub>. The 20 medium-level strains released between  $1.29 \pm 0.77$  and  $4.63 \pm 0.71$  mg/L of  $NH_4^+$ . Notably, four strains exhibited high nitrogen-fixing capacity, producing more than  $4.15 \pm 0.64$  mg/L  $NH_4^+$ , and their performance significantly differed from the remaining strains ( $p \leq 0.05$ ).

Despite this, after 48 hours of incubation, biomass accumulation in nitrogen-free medium remained low across all tested strains, suggesting that  $NH_4^+$  utilization was minimal under these conditions.

#### **Selection of PPB with the ability to produce Indole-3-acetic acid (IAA)**

Following isolation, the 24 PPB strains were cultured in liquid form to evaluate their indole-3-acetic acid (IAA) production capacity. Each strain was inoculated into an improved glutamate-acetate (GA) medium supplemented with 1 mM L-tryptophan at a 10% (v/v) inoculum ratio. The initial cell density in the experimental flasks reached approximately  $10^9$  CFU/mL. Flasks were sealed with rubber stoppers to maintain microaerobic conditions, and control flasks

containing only sterile medium were included. All cultures were incubated under continuous illumination at room temperature (25–30 °C) for five days. IAA concentrations in the culture supernatants were quantified using a modified Salkowski colorimetric assay. The IAA production levels of each PPB strain after five days of incubation under microaerobic-light conditions are summarized in Table 2.

The results indicated that all 24 isolated strains were able to grow well in the modified GA medium supplemented with 1 mM L-tryptophan. Among them, 21 strains produced detectable levels of indole-3-acetic acid (IAA), although IAA production varied significantly among isolates. IAA concentrations ranged from  $54.33 \pm 3.10$  to  $205.40 \pm 5.85$  mg/L, as determined using the colorimetric Salkowski assay (Table 2). These findings suggest that PPB strains isolated from rice fields in Nam Dinh possess considerable IAA-producing potential under microaerobic-light conditions. Three isolates did not produce detectable levels of IAA under the tested conditions. Among all strains, GT<sub>10</sub> and Y<sub>11</sub> exhibited the highest levels of IAA production and demonstrated strong nitrogen-fixing capacity (Tables 1 & 2). Consequently, these two strains were selected for further taxonomic identification and characterization.

#### **Morphological, physiological and biochemical characterization of strains**

For the identification of purple non-sulfur bacteria (PPB), several biological, physiological, and biochemical characteristics were examined, including colony and cellular morphology, bacteriochlorophyll absorption spectra, carbon source utilization, and 16S rDNA sequence analysis. Colonies of strain GT<sub>10</sub> were circular, convex, smooth-surfaced, and reddish-brown, with a diameter ranging from 0.9 to 1.2 mm. The corresponding cell suspension also appeared reddish-brown. In contrast, colonies of strain Y<sub>11</sub> were spreading, slimy, and reddish-brown, with diameters between 1.8 and 2.2 mm; the cell suspension appeared purple. Cell morphology, size, cell division mode, and

flagella presence were observed using scanning electron microscopy (SEM; Model S-4800, Hitachi, Japan). GT<sub>10</sub> cells were oval-shaped, unicellular, and measured 0.6–0.7 μm in width and 0.9–1.25 μm in length. These cells reproduced via binary fission and no intracellular sulfur granules were detected (Fig. 1). Cells of strain Y<sub>11</sub> were rod-shaped,

measured 1.4–1.58 μm in length and 0.36–0.44 μm in width, and were observed either as single cells or in short chains. These cells reproduce by budding. Like GT<sub>10</sub>, no intracellular sulfur granules were observed in Y<sub>11</sub> cells. Both strains were determined to be Gram-negative. Representative colony and cell morphologies are shown in Figure 1.

Table 2. The concentrations of IAA production in GA medium supplemented with tryptophan by the isolated PPB strains under microaerobic-light conditions for 5 days

No.	PPB strains	ΔOD <sub>800</sub>	IAA productions (μg/ml)
1	GT <sub>1</sub>	1.88 ± 0.19	78.0 ± 4.92 <sup>def</sup>
2	GT <sub>2</sub>	2.63 ± 0.60	58.24 ± 5.60 <sup>b</sup>
3	GT <sub>21</sub>	1.98 ± 0.19	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
4	GT <sub>11</sub>	2.04 ± 0.27	67.98 ± 5.04 <sup>c</sup>
5	GT <sub>3</sub>	2.45 ± 0.23	87.15 ± 7.03 <sup>fg</sup>
6	GT <sub>31</sub>	2.23 ± 0.29	118.87 ± 5.90 <sup>h</sup>
7	GT <sub>4</sub>	2.48 ± 0.35	188.96 ± 6.73 <sup>k</sup>
8	GT <sub>5</sub>	1.65 ± 0.24	73.05 ± 4.05 <sup>cd</sup>
9	GT <sub>6</sub>	1.99 ± 0.22	54.33 ± 3.10 <sup>b</sup>
10	GT <sub>7</sub>	1.97 ± 0.30	82.70 ± 5.05 <sup>egh</sup>
11	GT <sub>8</sub>	2.07 ± 0.30	90.07 ± 6.01 <sup>g</sup>
12	GT <sub>9</sub>	2.31 ± 0.25	83.80 ± 4.90 <sup>egh</sup>
13	<b>GT<sub>10</sub></b>	<b>2.53 ± 0.50</b>	<b>205.4 ± 5.85<sup>l</sup></b>
14	Y <sub>1</sub>	2.81 ± 0.41	59.22 ± 5.88 <sup>b</sup>
15	<b>Y<sub>11</sub></b>	<b>2.73 ± 0.24</b>	<b>191.63 ± 7.41<sup>k</sup></b>
16	Y <sub>12</sub>	2.81 ± 0.34	81.81 ± 3.78 <sup>def</sup>
17	Y <sub>2</sub>	1.95 ± 0.27	58.63 ± 3.77 <sup>b</sup>
18	Y <sub>3</sub>	2.93 ± 0.35	146.15 ± 5.64 <sup>i</sup>
19	Y <sub>4</sub>	1.85 ± 0.38	79.67 ± 4.85 <sup>def</sup>
20	Y <sub>5</sub>	2.71 ± 0.36	76.54 ± 5.71 <sup>cde</sup>
21	Y <sub>6</sub>	2.55 ± 0.29	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
22	Y <sub>7</sub>	2.05 ± 0.31	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
23	Y <sub>8</sub>	2.90 ± 0.42	79.48 ± 4.85 <sup>def</sup>
24	Y <sub>9</sub>	2.23 ± 0.35	68.18 ± 2.97 <sup>c</sup>
25	Negative control	0,00	0.00

Note: Different lowercase letters (a, b, c, d, e, f, I, k, g, h, I, k) in the same column indicate a statistically significant difference (one –way ANOVA with Duncan’s post hoc, p < 0.05).

Based on colony morphology, cell suspension color, and cellular structure, strain GT<sub>10</sub> was preliminarily assigned to the genus *Rhodobacter*, while strain Y<sub>11</sub> was classified within the genus *Rhodospseudomonas*. A key feature distinguishing purple photosynthetic bacteria (PPB) from other phototrophic microorganisms is their ability to synthesize

bacteriochlorophylls (BChls) under illuminated conditions. Both GT<sub>10</sub> and Y<sub>11</sub> strains were cultivated in DSMZ-27 liquid medium under anaerobic conditions with continuous illumination from incandescent lamps to evaluate this characteristic. After four days of incubation, corresponding to the mid-exponential growth phase, the

bacteriochlorophyll content in the cell suspensions was analyzed spectrophotometrically. Absorption spectra were measured in the 400–900 nm range using Navaspec II (England) and UV-1650PC (Shimadzu, Japan) spectrophotometers. The absorption spectrum of strain GT<sub>10</sub> showed

characteristic peaks at 807 and 872 nm, while strain Y11 exhibited maximum absorption at 804 and 862 nm. These absorption maxima within the 800–900 nm range are typical of bacteriochlorophyll a in the cytoplasmic membranes of PPB (Plennig & Trüper, 1992), further supporting their taxonomic classification.

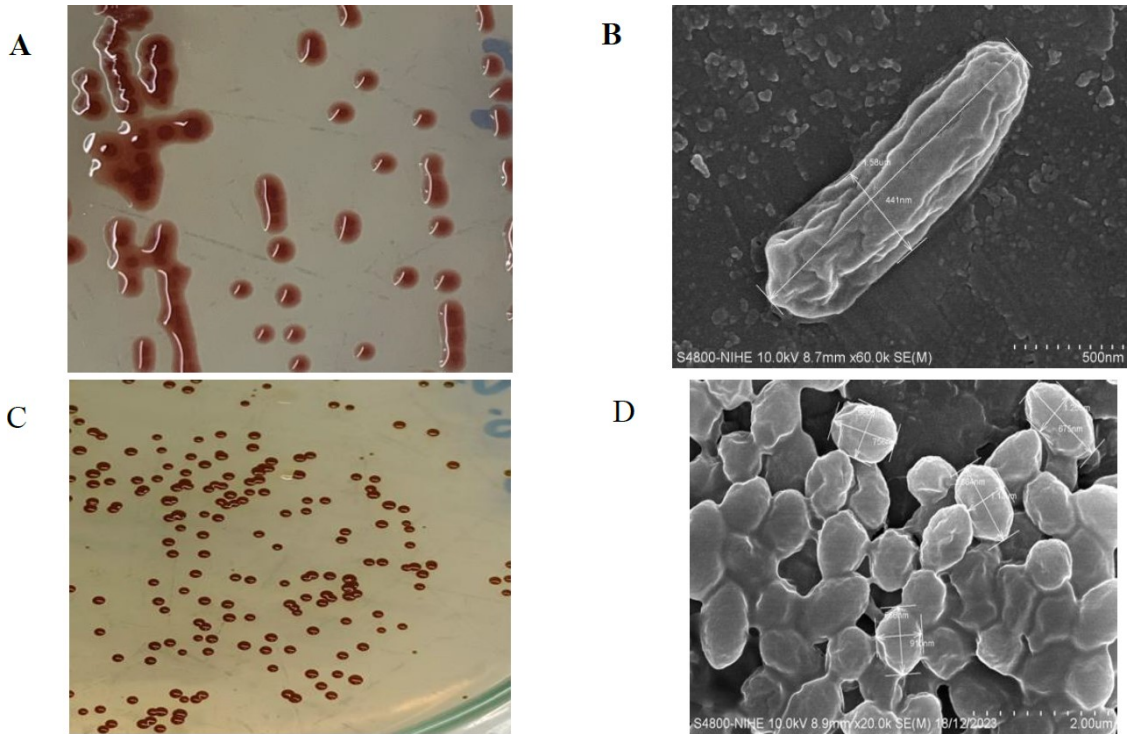


Figure 1. Colonies of strain (A), The cell morphology (B) of Y1 strains; Colonies of strain (C), The cell morphology (D) of GT10 strains

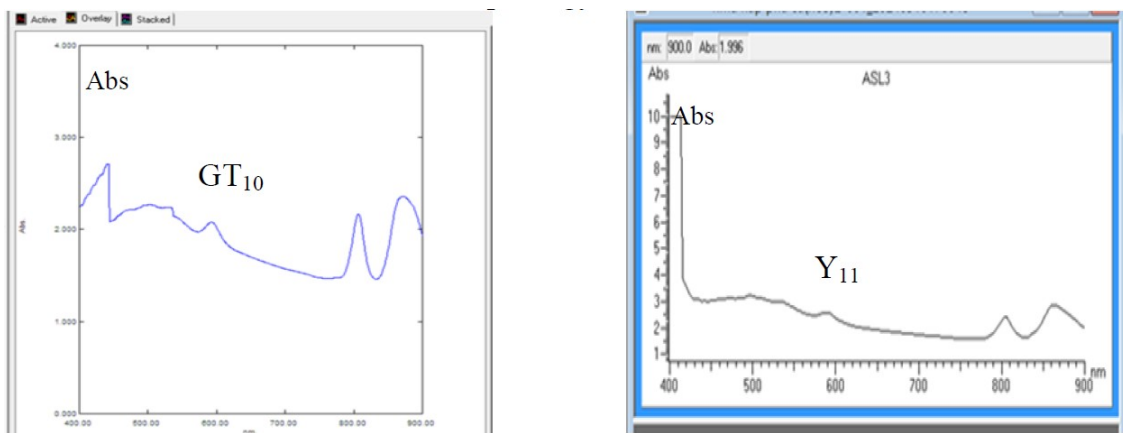


Figure 2. The absorption spectrum of GT<sub>10</sub> and Y<sub>11</sub> strains

### Ability to use carbon sources

In addition to their capacity for CO<sub>2</sub> fixation, purple photosynthetic bacteria (PPB) can utilize a wide range of organic carbon sources for growth. Some of these species-specific carbon sources can serve as taxonomic indicators for bacterial classification. To evaluate the carbon source utilization profiles of strains GT<sub>10</sub> and Y<sub>11</sub>, both isolates were cultured in a modified

DSMZ-27 medium, replacing sodium acetate with various alternative carbon sources. Cultivation was carried out under both anaerobic-light and aerobic-dark conditions, using liquid and solid media. The comparative ability of strains GT<sub>10</sub> and Y<sub>11</sub> to utilize different carbon sources was assessed about known profiles of *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodopseudomonas palustris*, based on the studies by Girija et al. (2010) and Imhoff & Trüper (1989) in Table 3.

Table 3. Comparison of carbon source utilization by strains GT<sub>10</sub> and Y<sub>11</sub> concerning *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodopseudomonas palustris* (Girija et al., 2010; Imhoff & Trüper, 1989)

Carbon source	GT <sub>10</sub>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	Y <sub>11</sub>	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
Acetate	++++	+	++++	+
Succinate	++++	+	++++	+
Formate	+	+	+	+
Tartate	-	-	-	-
Citrate	++	±	++	±
Glycerol	-	-	+++	+
Glucose	+++	+	++++	+
Methanol	-	-	-	±
Ethanol	-	-	-	±
Manitol	+++	±	++	±
Socbitol	++	±	+++	+
Propionate	+	+	+	+
Sulfide	+++	+	+++	+
Glutamate	++++	+	++++	+
Isopropanol	+	+	-	+

Note: Increased cell density at wavelength of 800 nm after 7 days of culture; (++++), ΔOD > 1.5; (+++), ΔOD from 1.0 to 1.5; (++), ΔOD from 0,5 to 1.0; (+), ΔOD from 0.1 to 0.5; and (-), ΔOD < 0.1 (no growth).

The results showed that under both anaerobic-light and aerobic-dark conditions, strain GT<sub>10</sub> could utilize a wide range of carbon sources, including acetate, propionate, lactate, succinate, formate, citrate, mannitol, sorbitol, glycerol, glutamate, isopropanol, and sulfide. However, it was unable to utilize tartrate, methanol, or ethanol. This carbon utilization profile closely resembled that of the genus *Rhodobacter*, particularly *R. capsulatus*, which, unlike other members of the genus such as *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter veldkampii*, and *Rhodobacter adriaticus*, is capable of metabolizing both formate and

isopropanol (Imhoff & Trüper, 1989). Similarly, strain Y<sub>11</sub> demonstrated the ability to utilize acetate, propionate, lactate, succinate, formate, citrate, mannitol, sorbitol, glycerol, glutamate, and sulfide, but not tartrate, methanol, ethanol, or isopropanol. This metabolic profile is consistent with the genus *Rhodopseudomonas*, and most closely aligned with *R. palustris*. Based on these physiological characteristics, it is likely that strain GT<sub>10</sub> belongs to the species *R. capsulatus*, while strain Y<sub>11</sub> belongs to *R. palustris*. 16S rDNA gene sequencing was subsequently conducted to confirm their precise taxonomic positions.

### Bacterial identification

All selected strains were analyzed based on their 16S rRNA gene sequences to validate these taxonomic predictions, and phylogenetic relationships were constructed as shown in Figure 3. Comparative analysis using the GenBank database revealed that strain GT<sub>10</sub> shared the highest sequence similarity with *R. capsulatus*, displaying over 99% homology with sequences from strains of this species. Specifically, GT10 exhibited 99.12% sequence identity with *R. capsulatus* ATCC 11166

(GenBank accession no. D16428.1). Similarly, strain Y<sub>11</sub> showed high sequence homology with *R. palustris*, sharing over 99% identity with reference sequences, including *R. palustris* strain D12700 (GenBank accession no. D12700). The results of molecular identification were consistent with previous phenotypic characterization, further supporting the classification of GT<sub>10</sub> as *R. capsulatus* and Y<sub>11</sub> as *R. palustris*. Phylogenetic analysis was performed using the neighbor-joining method with 1,000 bootstrap replications to assess the robustness of the tree topology.

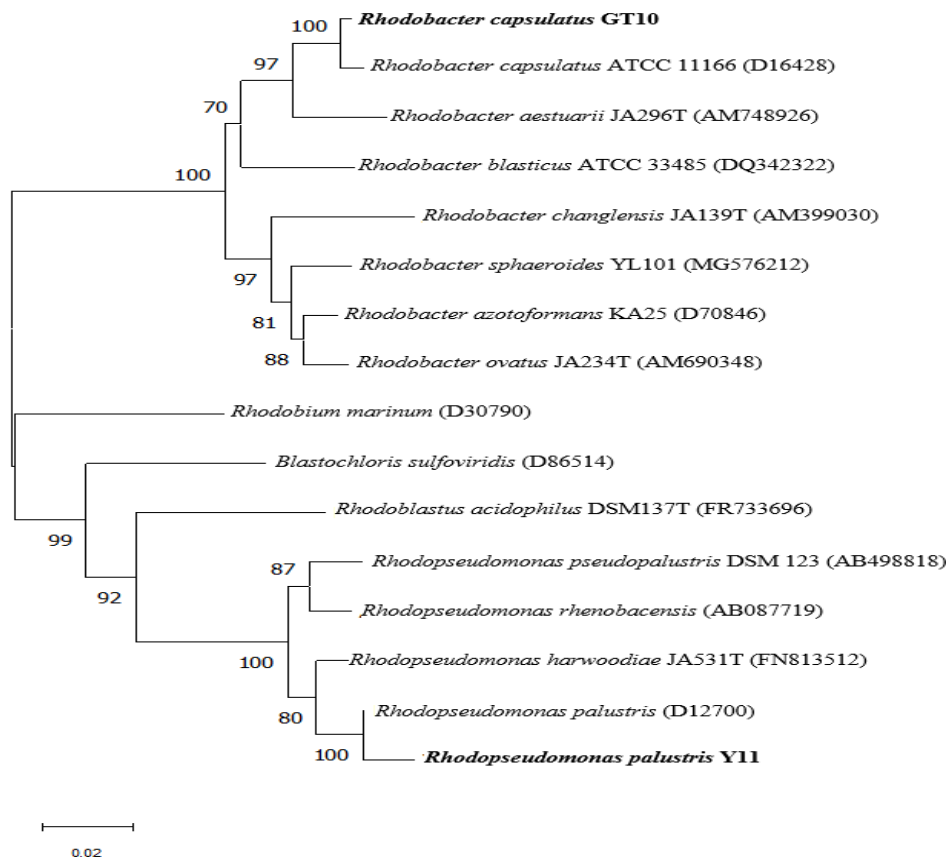


Figure 3. Phylogenetic tree constructed using the neighbor-joining method based on 16S rRNA gene sequences, illustrating the relationships of strains GT<sub>10</sub> and Y<sub>11</sub> with reference taxa within the domain Bacteria. Bootstrap values (based on 1000 replicates) are shown at the nodes. The scale bar indicates the number of nucleotide substitutions per site

### DISCUSSION

Over the past two decades, the trend of overusing chemical fertilizers in agriculture

has increased, with excess nitrogen fertilizer becoming standard in rice production; however, the fertilization principles have not been adhered to, resulting in low fertilizer use

efficiency (Bui Ba Bong, 2013). The overapplication of chemical fertilizers has been linked to increased disease susceptibility, greater dependence on pesticides, reduced product quality, environmental pollution, and higher greenhouse gas emissions (Truong Hop Tac, 2009). To mitigate these negative impacts, it is essential to investigate integrated fertilization strategies that combine inorganic, organic, and microbial fertilizers. Organic and microbial fertilizers are crucial in crop production, providing vital nutrients and maintaining long-term soil fertility. Among microbial inoculants, the most extensively studied nitrogen-fixing groups in rice cultivation include free-living cyanobacteria, heterotrophic bacteria, and cyanobacteria in symbiotic association with aquatic ferns (Choudhury et al., 2004). Additionally, purple photosynthetic bacteria (PPB) have emerged as promising candidates due to their nitrogen-fixing abilities and production of plant growth-promoting substances. Laboratory studies have demonstrated their potential to enhance cereal growth and increase rice yield (Montano et al., 2009; Harada et al., 2005). To produce fertilizer for rice, particularly in saline rice areas, we have isolated 24 strains of photosynthetic purple bacteria with varying morphological characteristics. These strains were evaluated for their ability to fix molecular nitrogen. The results indicated that nineteen medium-level  $\text{NH}_4^+$  releaser strains released between  $0.33 \pm 1.10$  and  $4.63 \pm 0.71$  mg/L. Notably, four strains were capable of fixing  $\text{N}_2$ , achieving over  $4.15 \pm 0.64$  mg/L, and exhibited a statistically significant difference ( $p \leq 0.05$ ) compared with all other tested bacterial strains. These findings align with those by Nookongbut et al. (2019), who isolated PPB from peat swamp forests in Thailand. In contrast to purple photosynthetic bacterial strains previously isolated from rice fields by Sakpirom et al. (2017) the strains obtained in the present study demonstrated a higher nitrogen-fixing capacity after 48 hours of incubation under light microaerobic conditions. Similarly, compared to the survey conducted by Nguyen Thi Thu Hang et al. (2015), in which

*Azotobacter* strains AZT1 and AZT7 were cultured in liquid Ashby medium supplemented with 2% glucose (pH 7.0) at 30 °C for 72 hours, nitrogen fixation capacities of 3.36 and 3.32 mg/L were reported, respectively. The nitrogen-fixing performance of the strains isolated in this study surpassed these values under comparable experimental conditions. Our six selected strains exceeded these figures, with  $\text{NH}_4^+$  production surpassing 3.94 mg/L. According to the study of Thai Thanh Duoc & Nguyen Huu Hiep (2022), screening 25 strains on Nfb liquid medium without a nitrogen source after 48 hours, the nitrogen-fixing bacteria strains isolated from corn roots all had the ability to synthesize  $\text{NH}_4^+$  ranging from 0.35–4.33 mg  $\text{NH}_4^+$ /L. This synthesis ability is equivalent to the photosynthetic purple bacteria strains isolated by us. According to the research results of Pham Thi Ngoc Lan & colleagues (2020), the study had two strains with strong growth and nitrogen fixation ability in Ashby liquid medium, strains N55 and N96. The  $\text{NH}_4^+$  content was 21.14 mg/mL and 59.60 mg/mL. The molecular nitrogen fixation capacity of these two strains was higher than that of the PPB strains we isolated.

The IAA content produced by our PPB isolates was also significant. It exceeded the IAA levels (63.11–73.87 ppm). Hoang Kim Chi et al. (2019) reported in root-zone bacterial strains isolated from turmeric. Compared with the IAA production ability of the PPB group isolated from a field contaminated with Cd and Zn in Thailand, published by Sakpirom & colleagues (2017), the IAA content produced by the isolated strains was 25–60 times higher. However, compared with the acid-tolerant PPB strains isolated in Thailand by Nookongbut & colleagues (2019), the IAA content produced by the acid-tolerant strains from  $(43.5 \pm 0.67)$ – $(302.6 \pm 1.77)$  mg/L was higher than that of the isolated PPB strains. Compared with the *Enterobacteria*, *Azotobacteria* & *Pseudomonas* species isolated from the rice rhizosphere soil in Colombia by the research group Torres & colleagues (2000), which produced the highest

IAA of 32.2 µg/mL, the IAA production ability of the 24 screened strains, of which 21 strains produced higher IAA.

This study initially screened 24 PPB strains, of which four were identified as potential biofertilizers based on NH<sub>4</sub><sup>+</sup> release (Table 3). Following further screening for indole-3-acetic acid (IAA) production (Table 2), three strains (GT4, GT10, and Y11) were identified as the most effective producers. Among them, strains GT10 and Y11 demonstrated high IAA production and strong nitrogen-fixing capabilities. These findings suggest that identifying strains suitable for field application requires broad (extensive) and targeted (intensive) screening efforts. Nevertheless, such efforts are justified, given the multifunctional potential of the selected isolates. Subsequent characterization of GT10 and Y11 included assessments of cell morphology, photosynthetic pigment profiles, and carbon source utilization. The carbon utilization analysis revealed that both strains were capable of metabolizing various carbon sources, including species-specific substrates. Notably, both strains could grow using sulfide as an electron donor. These combined physiological traits support the high potential of strains GT10 and Y11 as biofertilizer candidates for enhancing rice growth under diverse field conditions.

Under anaerobic conditions, the rhizosphere often supports the growth of sulfate-reducing bacteria (SRB), leading to the production of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) (Harada et al., 2001b). H<sub>2</sub>S at a concentration of 0.05 to 1 mg/mL adversely impacted rice cultivars by reducing the uptake rate of nutrients. This is due to H<sub>2</sub>S inhibiting respiration and the oxidative power of rice roots. GT<sub>10</sub> and Y<sub>11</sub> strains can use H<sub>2</sub>S as an electron donor for photosynthesis (Harada et al., 2001a, b). This ability may reduce sulfide toxicity in rice roots and enhance nutrient assimilation, improving grain production.

Strains GT<sub>10</sub> and Y<sub>11</sub> were further characterized based on biological, physiological, and biochemical features, including colony and cell morphology,

bacteriochlorophyll absorption spectra, carbon source utilization, and 16S rDNA sequence analysis. Based on these analyses, strain Y<sub>11</sub> was identified as *R. palustris*, while strain GT<sub>10</sub> was most closely related to *R. capsulatus*.

## CONCLUSION

In summary, two purple non-sulfur bacterial strains, GT<sub>10</sub> and Y<sub>11</sub>, were successfully isolated from rice fields in Nam Dinh, Vietnam. Both strains demonstrated significant abilities to fix atmospheric nitrogen and produce indole-3-acetic acid (IAA). Based on their biological characteristics and 16S rDNA sequence analysis, strain Y<sub>11</sub> was identified as *R. palustris*, while strain GT<sub>10</sub> was identified as *R. capsulatus*. These two strains exhibit promising potential for development as microbial biofertilizers to enhance rice cultivation. Further field-based studies are recommended to evaluate their effectiveness under real soil and environmental conditions, especially in saline-affected rice-growing areas.

**Acknowledgements:** This research is funded by the Vietnam National Foundation for Science and Technology Development (NAFOSTED), project code 07/2022/TN.

## REFERENCES

- Ahmad F., Ahmad I., Khan M. S., 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk J Biol*, 29: 29–34.
- Bui Ba Bong, 2013. “Foreword” Proceedings of the National Workshop on Solutions to Improve the Efficiency of Fertilizer Management and Use in Vietnam. Agriculture Publishing House, Ho Chi Minh City: 3–5.
- Cheng Y., Brantner S., Christine A., Tsapin A., Collins M. L., 2000. Role of the H protein in assembly of the photochemical reaction center and intracytoplasmic membrane in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.*, 182(5): 1200–1207.
- Choudhury A. T., Kennedy I. R., 2004. Prospects and potentials for systems of

- biological nitrogen fixation in sustainable rice production. *Biol Fert Soils*, 39: 219–227.
- Ercal N., Orhan H. G., Burn N. A., 2001. Toxic metals and oxidative stress Part I: Mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Curr. Top Med. Chem.*, 1: 529–539.
- Girija K. R., Sasikala Ch., Ramana Ch. V., Spröer C., Takaichi S., Thiel V. & Imhoff J. F., 2010. *Rhodobacter johrii* sp. nov., an endosporeproducing cryptic species isolated from semi-arid tropical soils. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60: 2099–2107.
- Gutierrez J., Atulba S. L., Kim G., Kim P.J., 2014. Importance of rice root oxidation potential as a regulator of CH<sub>4</sub> production under water logged conditions. *Biol Fert Soils*, 50(5): 861–868.
- Harada N., Nishiyama M., Matsumoto S., 2001. Inhibition of methanogens increases photo- dependent nitrogenase activities in anoxic paddy soil amended with rice straw. *FEMS Microbiol Ecol*, 35(3): 231–238.
- Harada N., Nishiyama M., Otsuka S., Matsumoto S., 2005. Effects of inoculation of phototrophic purple bacteria on grain yield of rice and nitrogenase activity of paddy soil in a pot experiment. *Soil Sci Plant Nutr*, 51(3): 361–367.
- Hoang Kim Chi, Nguyen Đình Tuan, Tran Ho Quang, Nguyen Thanh Lam, Le Huu Cuong, Tran Thi Hong Ha, Le Mai Huong, Tran Thi Nhu Hang, 2019. Screening and study of some strains of growth-promoting rhizosphere bacteria isolated from turmeric (*Curcuma longa* L) in Vietnam. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 62(5): 54–59.
- Imhoff J. F., Trueper H. G., 1989. Purple non-sulfur bacteria (*Rhodospirillaceae* Pfennig and Trueper 197, 17AL), P: 1438-1680. In: Staley JT; Bryant M P; Pfennig N, and Holt JG. (eds.). *Bergey' manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 3. Williams and Wilkins. Baltimore.
- Kantachote D., Salwa T., Kamontam U., 2005. The potential use of anoxygenic photosynthetic bacteria for treating latex rubber sheet wastewater. *Electron. J. Biotechnol.*, 8(3): 314–323.
- Kantha T., Chaiyasut C., Kantachote D., Sukrong S., Muangprom A., 2010. Selection of photosynthetic bacteria producing 5- aminolevulinic acid from soil of organic saline paddy fields from the Northeast region of Thailand. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 4(17): 1848–1855.
- Kim M. K., Choi K. M., Yin C. R., Lee K. Y., Im W. T., Lim J. H., Lee S. T., 2004. Odorous swine wastewater treatment by purple non-sulfur bacteria, *Rhodopseudomonas palustris* isolated from eutrophicated ponds. *Biotech. Lett.*, 26(10): 819–822.
- Koh R. H., Song H. G., 2007. Effects of application of *Rhodopseudomonas* sp. on seed germination and growth of tomato under axenic conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17: 1805–1810.
- Kolev N. I., 2007. Solubility of O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> in water. In: Kolev NI, editor. *Multiphase flow dynamics 3: turbulence, gas absorption and release, diesel fuel properties*. Heidelberg: Springer: 185–214.
- Larsen M., Santner J., Oburger E., Wenzel W. W., Glud R. N., 2015. O<sub>2</sub> dynamics in the rhizosphere of young rice plants (*Oryza sativa* L.) as studied by planar optodes. *Plant Soil*, 390(1): 279–92.
- Masepohl B., Kranz R. G., 2009. Regulation of nitrogen fixation. In: Hunter CN, Daldal F, Thurnauer M. C., Beatty J. T., editors. *The purple phototrophic bacteria*. Dordrecht: Springer: 759–75.
- Masepohl B., Kranz R.G., 2009. Regulation of nitrogen fixation. In: Hunter CN, Daldal F, Thurnauer MC, Beatty JT, editors. *The purple phototrophic bacteria*. Dordrecht: Springer: 759–775.

- Montano G. L., Chan J. S., Jarabelo E. R., Pastor A. B. I., Cruz TEED., 2009. Isolation and characterization of purple nonsulfurbacteria (PNSB) from a rice paddy soil in bulacan, philippines. *Philippine Journal of Systematic Biology*, 3: 57–67.
- Nguyen Thi Thu Hang, Nguyen Thi Thuy, 2015. Selection of Azotobacter bacteria with the ability to fix nitrogen and synthesize IAA. *Journal of Forestry Science and Technology*, No. 4.
- Nookongbut P., Kantachote D., Megharaj M., Naidu R., 2018. Reduction in arsenic toxicity and uptake in rice (*Oryza sativa* L.) by As-resistant purple nonsulfur bacteria. *Environ Sci Pollut Res*, 25: 36530–36544.
- Olivares J., Bedmar E. J., Sanjuan J., 2013. Biological nitrogen fixation in the context of global change. *Mol Plant Microbe Interact*, 26(5): 486–494.
- Panwichian S., Kantachote D., Wittayaweerarak B., Mallavarapu M., 2010a. Isolation of purple nonsulfur bacteria for the removal of heavy metals and sodium from contaminated shrimp ponds. *Electron. J. Biotechnol.*, 13(4): 12. doi: 10.2225/vol13-issue4-fulltext-8.
- Panwichian S., Kantachote D., Wittayaweerarak B., Mallavarapu M., 2010b. Factors affecting immobilization of heavy metals by purple nonsulfur bacteria isolated from contaminated shrimp ponds. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26: 2199–2210.
- Pfennig N., Trueper H. G., 1992. Characterization and identification of the Anoxygenic Phototrophic Bacteria. In: *The Prokaryote: a handbook of on habitats, isolation and identification of bacteria*. Springer- Verlag, Berlin: 299–311.
- Pham Thi Ngoc Lan, Le Thi Thanh Xuan, Ngo Thi Bao Chau, 2020. Isolation and selection of nitrogen-fixing bacteria from vegetable soil in Pleiku city, Gia Lai province, *Journal of Science and Technology*, University of Science, Hue University, 17(2).
- Raymond J., Siefert J. L., Staples C. R., Blankenship R. E., 2004. The natural history of nitrogen fixation. *Mole Biol. Evol.*, 21: 541–555.
- Sakarika M., Spanoghe J., Sui Y., Wambacq E., Grunert O., Haesaert G., Spiller M., Vlaeminck S.E., 2020. Purple non-sulphur bacteria and plant production: Benefits for fertilization, stress resistance and the environment. *Microb. Biotechnol.*, 13: 1336–1365.
- Sakpirom J., Kantachote D., Nunkaew T., Khan E., 2017. Characterizations of purple non-sulfur bacteria isolated from paddy fields, and identification of strains with potential for plant growth-promotion, greenhouse gas mitigation and heavy metal bioremediation. *Res Microbiol*, 168(3): 266–275.
- Sasikala G. H., Ramana C. H. V., 1995. Biotechnological potentials of anoxygenic phototrophic bacteria. I. Production of Single Cell Protein, vitamins, ubiquinones, hormones and enzymes and use in waste treatment. *Advan. Appl. Microbiol.*, 41: 173–226.
- Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R., 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev*, 31(4): 425–428.
- Thai Thanh Duoc & Nguyen Huu Hiep, 2022. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacteria from corn root zone soil in the Mekong Delta. *Can Tho University Science Journal*, 58(2B): 160–171.
- Torres-Rubio M. G., Valencia-Plata S. A., Bernal-Castillo J., Martinez-Nieto P., 2000. Isolation of *Enterobacteria*, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., Producers of Indole-3-Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice *Rhizosphere*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42: 171–176.

- Truong Hop Tac, 2009. The impact of fertilizer use on the environment. [http://www.agroviet.gov.vn/Pages/news\\_detail.aspx/NewsId=7877&Page=4](http://www.agroviet.gov.vn/Pages/news_detail.aspx/NewsId=7877&Page=4).
- Vatsala T. M., Rekha R., & Srividhya R., 2011. Novel substrate (algal protein) for cultivation of *Rhodospirillum rubrum*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 49(10): 773.
- Wang M. C., Yang C. H., 2003. Type of fertilizer applied to a paddy-upland rotation affects selected soil quality attributes. *Geoderma*: 114.
- Watanabe K., Tanaka T., Hotta Y., Kuramochi H., Takeuchi Y., 2000. Improving salt tolerance of cotton seedling with 5-aminolevulinic acid. *Plant Growth Regul*, 32: 99–103.