

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



CAO THỊ NGỌC ANH

**PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC
CỦA CHỦNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG**

SINH NH₄⁺

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM

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



CAO THỊ NGỌC ANH

**PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC
CỦA CHỦNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG
SINH NH₄⁺**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :
TS. Nguyễn Sỹ Lê Thanh

Hà Nội – 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin xác nhận rằng nội dung trình bày trong luận văn này là kết quả của quá trình lao động khoa học độc lập, dựa trên hệ thống tư liệu và dữ liệu thực nghiệm dưới sự hướng dẫn của TS. Nguyễn Sỹ Lê Thanh. Toàn bộ các phát hiện và số liệu được công bố đều đảm bảo tính nguyên bản, phản ánh trung thực bản chất của đối tượng nghiên cứu và chưa từng được công bố dưới bất kỳ hình thức nào trong các công trình khác. Tôi hoàn toàn tự tin về tính xác thực của các kết quả nêu trên và xin chịu trách nhiệm cao nhất trước pháp luật về tính minh bạch của nghiên cứu này.

Hà Nội, tháng 3 năm 2026

Người làm luận văn

Cao Thị Ngọc Anh

LỜI CẢM ƠN

Để có thể hoàn thiện công trình nghiên cứu này, bên cạnh sự cố gắng của cá nhân, tôi đã nhận được những giá trị hỗ trợ vô cùng to lớn từ quý Thầy Cô, đồng nghiệp và gia đình.

Trước hết, tôi xin gửi lời tri ân sâu sắc đến TS. Nguyễn Sỹ Lê Thanh và TS. Nguyễn Thị Thảo. Tôi vô cùng may mắn khi được hai Thầy Cô tận tâm dẫn dắt, không chỉ truyền đạt tri thức chuyên môn mà còn tiếp thêm động lực giúp tôi vượt qua những khó khăn trong nghiên cứu khoa học.

Tôi cũng xin trân trọng ghi nhận sự hỗ trợ từ Ban Lãnh đạo, Phòng Đào tạo cùng các đơn vị nghiệp vụ tại Học viện Khoa học và Công nghệ đã tạo điều kiện thuận lợi mà cô đã dành cho tôi trong suốt quá trình thực hiện các thủ tục học tập.

Cuối cùng, tôi xin dành trọn tình cảm biết ơn tới gia đình, bạn bè và những người đồng nghiệp thân thiết. Chính sự thấu hiểu và đồng hành của mọi người trong mọi giai đoạn thăng trầm là nguồn sức mạnh tinh thần giúp tôi đi đến tận cùng chặng đường này.

Hà Nội, tháng 3 năm 2026

Người làm luận văn

Cao Thị Ngọc Anh

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG SINH NH₄⁺	3
1.1.1. Các chủng vi khuẩn có khả năng sinh NH ₄ ⁺ và nhu cầu dinh dưỡng về nitơ của cây trồng	3
1.1.2. Đặc điểm kiểu gen, kiểu hình của vi khuẩn vùng rễ	7
1.1.3. Các nghiên cứu trong nước	13
1.2. Định danh vi sinh vật	16
1.2.1. Theo phương pháp truyền thống	16
1.2.2. Dựa vào vật liệu di truyền.....	16
1.2.3. Dựa trên các đặc điểm hóa sinh - proteomic.....	16
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	18
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	18
2.1.1. Mẫu nghiên cứu.....	18
2.1.2. Hoá chất, thiết bị.....	18
2.2. PHƯƠNG PHÁP	20
2.2.1. Phân lập chủng vi khuẩn có hoạt tính sinh NH ₄ ⁺ từ mẫu đất và rễ lúa ...	20
2.2.2. Phân tích định lượng khả năng sinh NH ₄ ⁺ của chủng vi khuẩn phân lập	21
2.2.3. Định danh vi khuẩn sinh NH ₄ ⁺	22
2.2.4. Phương pháp điện di DNA trên gel agarose	23
2.2.5. Tinh sạch sản phẩm PCR	23
2.2.6. Xác định các yếu tố đơn lẻ của môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến khả năng sinh NH ₄ ⁺ của chủng vi khuẩn.....	24
2.2.7. Định lượng yếu tố sinh trưởng IAA	25
2.2.8. Đánh giá mức độ biểu hiện gen sinh NH ₄ ⁺ của chủng vi khuẩn.....	26
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	28
3.1. Phân lập các chủng vi khuẩn từ các mẫu đất và rễ lúa ở Cần Thơ	28
3.1.1. Tạo bộ sưu tập chủng vi khuẩn từ các mẫu đất và rễ lúa ở Cần Thơ	28
3.1.2. Đánh giá khả năng sinh NH ₄ ⁺ của 14 chủng vi khuẩn	30

3.1.3. Đánh giá khả năng sản sinh enzyme của chủng vi khuẩn	31
3.1.4. Định danh các chủng có hoạt tính sinh NH_4^+	33
3.2. Nghiên cứu đặc điểm của điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh NH_4^+ của chủng vi khuẩn 2.4.1	39
3.2.1. Khảo sát môi trường và thời gian thích hợp đến khả năng sinh NH_4^+	39
3.2.2. Khảo sát nhiệt độ và pH thích hợp để sinh NH_4^+	43
3.2.3. Ảnh hưởng của nhân tố magie đến khả năng sinh NH_4^+	47
3.3. Đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn có khả năng sinh NH_4^+	49
3.3.1. Khả năng sinh IAA của chủng 2.4.1	49
3.3.2. Biểu hiện của gen của chủng có khả năng sinh NH_4^+	51
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	54
4.1. KẾT LUẬN.....	54
4.2. KIẾN NGHỊ	54
TÀI LIỆU THAM KHẢO	55
PHỤ LỤC.....	60

DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

Ký hiệu	Tiếng Anh	Diễn giải
PDA	Potato Dextrose Agar	Dưỡng chất nuôi vi khuẩn.
LB	Luria Bertani	Dinh dưỡng giúp tế bào vi sinh vật phát triển.
LGI	Lactose–Glucose–Iodine medium	Môi trường có tính chọn lọc, được ứng dụng nuôi dưỡng các nhóm vi khuẩn có khả năng cố định nitơ tự do.
BURK	Burk's medium	Dinh dưỡng đặc thù để phân lập cũng như khảo sát sự phát triển của các chủng vi sinh vật cố định đạm.
NFB	Nitrogen Free Broth	Môi trường thuốc dùng để nhận diện và đánh giá đặc tính của các dòng vi khuẩn cố định nitơ.
CMC	Carboxymethyl Cellulose	Cơ chất enzyme cellulase.
SMA	Skim milk agar	Cơ chất của enzyme protease

DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1. Hình thái khuẩn sau quá trình phân lập tại các môi trường khác nhau....	28
Bảng 3.2. Đánh giá khả năng sinh NH_4^+ của chủng vi khuẩn đã phân lập.....	31
Bảng 3.3. Mức độ tương đồng của của đoạn gen 16S rRNA từ chủng 2.4.1 so với các chủng trên GenBank.....	34
Bảng 3.4. Mức độ tương đồng của của đoạn gen 16S rRNA từ chủng 1.3 so với các chủng trên GenBank.....	36
Bảng 3.5. Mức độ tương đồng của của đoạn gen 16S rRNA từ chủng CP100 so với các chủng trên GenBank.....	37
Bảng 3.6. Mức độ tương đồng của của đoạn gen 16S rRNA từ chủng Đ100 so với các chủng trên GenBank.....	38

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1: Kết quả phân tích hoạt tính sinh học của chủng đột biến (trích từ [40]).	12
Hình 2.1: Mẫu rễ lúa và đất được thu thập	18
Hình 3.1: Hình ảnh khuẩn lạc được chọn sau phân lập trên đĩa LGI thạch	30
Hình 3.2: Khả năng sinh protease của các chủng vi khuẩn phân lập.....	32
Hình 3.3: Khả năng phân giải tinh bột và cellulose của các chủng vi khuẩn phân lập	32
Hình 3.4: Điện di đồ phân tích DNA tổng số của chủng phân lập (A); Sản phẩm PCR của gen 16S RNA (C); 1, 2, 3, 4: chủng 2.4.1, 1.3, CP100, Đ100; M: Marker.	34
Hình 3.5: Cây phát sinh chủng loài của chủng vi khuẩn 2.4.1 và các chủng tham chiếu từ ngân hàng gen.....	35
Hình 3.6: Cây phát sinh chủng loài của chủng vi khuẩn 1.3 và các chủng tham chiếu từ ngân hàng gen.....	36
Hình 3.7: Cây phát sinh chủng loài của chủng vi khuẩn CP100 và các chủng tham chiếu từ ngân hàng gen.....	37
Hình 3.8: Cây phát sinh chủng loài của chủng vi khuẩn Đ100 và các chủng tham chiếu từ ngân hàng gen.....	39
Hình 3.9: Khả năng sinh NH_4^+ của chủng vi khuẩn 2.4.1 trên môi trường LGI.....	40
Hình 3.10: Khả năng sinh NH_4^+ của chủng vi khuẩn 2.4.1 trên môi trường BURK.	41
Hình 3.11: Khả năng sinh NH_4^+ của chủng vi khuẩn 2.4.1 trên môi trường NFB...	42
Hình 3.12: Khả năng sinh NH_4^+ của chủng 2.4.1 tại ba mức nhiệt độ.....	45
Hình 3.13: Khả năng sinh NH_4^+ của chủng 2.4.1 tại các điểm pH	46
Hình 3.14: Khả năng sinh NH_4^+ của chủng 2.4.1 ảnh hưởng bởi yếu tố magie	48
Hình 3.15: Khả năng sinh IAA của chủng 2.4.1	50
Hình 3.16: Điện di RNA tổng số. 1: <i>Bacillus zanthoxyli</i> 2.4.1; 2: <i>Burkholderia</i> sp. CP100; 3: <i>Burkholderia</i> sp. Đ100.....	52
Hình 3.17: Điện di RNA tổng số (A); gen nifH (B); gen nifH (C); M: Marker 1: <i>Bacillus zanthoxyli</i> 2.4.1; 2: <i>Burkholderia</i> sp. CP100; 3: <i>Burkholderia</i> sp. Đ100...	53

MỞ ĐẦU

Chiếm 78% thành phần khí quyển của trái đất, nitơ tồn tại dưới nhiều dạng trong nhiều môi trường khác nhau. Tuy nhiên nitơ ở dạng khí (N_2) trở sẽ không thể là thành phần đóng vai trò vào các chu trình chuyển hóa sinh học bên trong sinh vật sống. Nitơ thường tồn tại ở dạng hợp chất hữu cơ và vô cơ trong đất, hai ion amoni (NH_4^+) và nitrat (NO_3^-) là nguồn dưỡng chất thiết yếu cho mọi chu kỳ sống của thực vật, là yếu tố nền tảng tham gia xây dựng các phân tử quan trọng như axit nucleic, protein, enzyme, diệp lục cũng như các hợp chất hữu cơ khác. Nitơ là thành phần dinh dưỡng quan trọng đóng vai trò mật thiết ở các quy trình tạo năng lượng, bao gồm hô hấp và quang hợp của cây trồng [1]. Từ thực tế trên, có thể thấy nguồn nitơ ổn định chính là nhân tố quan trọng liên quan đến sản lượng và hiệu quả dinh dưỡng cho cây trồng.

Sự gia tăng quy mô thâm canh nhằm mục tiêu tối ưu hóa sản lượng đã thúc đẩy việc lạm dụng các loại phân bón có nguồn gốc hóa học cũng như các loại thuốc bảo vệ thực vật hóa học. Điều này dẫn đến đất trồng ngày càng khô cằn và khó cải tạo cũng như không có lợi cho sự bền vững của sức khỏe đất mà còn gây ra mối đe dọa đến độ phì nhiêu của đất. Việt Nam là một quốc gia diện tích trồng trọt nông nghiệp cao, việc lạm dụng phân bón vô cơ để cung ứng nitơ đã dẫn đến những hệ lụy đa chiều. Về mặt sinh thái, tình trạng này gây thoái hóa cấu trúc đất, làm thay đổi cân bằng hệ vi sinh vật dẫn đến suy giảm độ phì nhiêu tự nhiên. Bên cạnh đó, việc dư thừa hóa chất còn tiềm ẩn nguy cơ nhiễm độc nông sản, có nguy cơ ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng. Đáng quan ngại là lượng phát thải nitơ oxit (N_2O) phát sinh từ hoạt động này đang làm trầm trọng thêm hiệu ứng nhà kính. Hệ quả tất yếu là sự gia tăng gánh nặng chi phí đầu vào, gây ảnh hưởng trực tiếp đến lợi nhuận và kinh tế của người dân.

Sự tồn dư các muối khoáng hòa tan hiện diện trong đất và cấu trúc mô cây là hệ quả trực tiếp của việc bón phân hóa học sai định mức. Việc cung ứng dưỡng chất vượt quá khả năng hấp thụ của hệ rễ đã gây ra tình trạng ô nhiễm cục bộ và biến đổi thành phần hóa lý của thực vật. Tình trạng này tiềm ẩn hiểm họa lớn đối với hệ sinh thái và sức khỏe cộng đồng, do sự hình thành các dẫn xuất nitơ độc hại. Cụ thể, hàm lượng nitrat (NO_3^-) và nitrit (NO_2^-) phát sinh từ các phản ứng khử nitơ trong nông sản có nguy cơ gây ảnh hưởng cho các loài thủy sinh. Đồng thời, thông qua các nguồn nước bị nhiễm bẩn, những độc chất này còn gián tiếp đe dọa đến sự an toàn của động vật trên cạn và con người [2]. Nhằm giải quyết những vấn đề tồn đọng trong việc sử dụng phân bón hóa học nêu trên, trong nhiều nghiên cứu gần đây, các nghiên cứu đã

tập trung phát triển những chiến lược thay thế vừa bảo đảm lợi ích kinh tế, vừa an toàn cho hệ sinh thái. Việc khai thác các đặc tính ưu việt của quần thể vi sinh vật bản địa trong đất đã trở thành hướng đi trọng tâm để phục hồi sức khỏe thổ nhưỡng và ổn định sản lượng nông nghiệp. Thực tế này đòi hỏi sự hình thành của những giải pháp bền vững, có khả năng cân bằng giữa bảo vệ môi trường và kinh tế trong dài hạn.

Sự biến đổi nitơ trong không khí (N_2) thành dạng ion amoni (NH_4^+) thông qua hoạt tính chuyển hóa của hệ vi sinh bản địa chuyên biệt là một cách triển khai giải pháp sinh học mang tính đột phá. Quá trình sinh chuyển hóa này giúp chuyển hóa nguồn tài nguyên nitơ dồi dào nhưng khó hấp thụ trong không khí thành dạng dưỡng chất mà hệ rễ thực vật có thể dễ dàng hấp thu để sinh trưởng. Đây là dạng đạm hòa tan mà hệ rễ thực vật có thể sử dụng và đồng hóa một cách dễ dàng, thay thế cho các nguồn phân bón vô cơ. Enzyme nitrogenase xúc tác chuyển hóa N_2 thành đạm trong các nhóm vi khuẩn đặc biệt như *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Gluconacetobacter*... Sử dụng các chủng vi khuẩn cố định đạm trong sản xuất phân bón vi sinh mang lại lợi ích kép: vừa cắt giảm sự lệ thuộc vào phân bón vô cơ, vừa bồi đắp dưỡng chất tự nhiên cho đất. Cách tiếp cận này đóng vai trò mấu chốt trong việc duy trì sự cân bằng sinh học của môi trường canh tác, đồng thời củng cố ngưỡng chịu đựng của hệ thống trước những tác động tiêu cực từ các tác nhân hóa học.

Từ cơ sở nêu trên, đề tài nghiên cứu được đề xuất là: “**Phân lập và đánh giá đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn có khả năng sinh NH_4^+** ”. Luận văn được thực hiện tại phòng Công nghệ sinh học Enzyme - Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, dưới sự hướng dẫn của TS. Nguyễn Sỹ Lê Thanh. Với các mục tiêu sau:

- Phân lập và định danh được chủng vi khuẩn có khả năng sinh NH_4^+ từ trong mẫu đất và rễ lúa.
- Nghiên cứu được một số đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn có liên quan đến khả năng sinh NH_4^+ .

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG SINH NH_4^+

1.1.1. Các chủng vi khuẩn có khả năng sinh NH_4^+ và nhu cầu dinh dưỡng về nitơ của cây trồng

Mặc dù nhu cầu về nitơ của đại đa số cây trồng là cực kỳ cao, nhưng việc bổ sung nguồn này từ quá trình phong hóa khoáng chất tự nhiên là điều không thể. Đây là điểm khác biệt cốt lõi giữa nitơ và các yếu tố vi lượng/đa lượng khác. Do đó, hàm lượng nitơ tồn tại dưới dạng khoáng vật trong đất thường chiếm tỷ lệ rất nhỏ và không đủ đáp ứng nhu cầu sinh trưởng của thực vật [3]. Trong canh tác thực tiễn, các loại phân đạm tổng hợp thường được ứng dụng như một giải pháp chủ đạo để bổ sung hàm lượng nitơ thiết yếu cho cây trồng. Việc cung ứng phân đạm còn gắn liền với các nguy cơ thảm họa sinh thái, từ lượng khí thải carbon trong sản xuất đến hiện tượng rò rỉ nitrat. Quá trình này khiến các hợp chất độc hại xâm nhập vào mạch nước ngầm và lưu vực sông ngòi, gây ra tình trạng phú dưỡng hóa và ô nhiễm nguồn cấp nước. Bên cạnh đó, việc sản xuất phân bón hóa học đòi hỏi các nguồn tài nguyên như than đá và các sản phẩm dầu mỏ. Việc duy trì ngưỡng bón phân vô cơ quá mức nhằm thúc đẩy năng suất thương mại đã trực tiếp gây ra sự suy thoái đặc tính lý hóa của đất. Hệ quả là sự cạn kiệt nguồn dinh dưỡng tự thân và làm rạn nứt nền tảng canh tác bền vững vốn có của hệ sinh thái nông nghiệp. Đứng trước những thách thức này, việc thiết lập một chiến lược dinh dưỡng mới, đảm bảo sự cân bằng giữa hiệu quả kinh tế và bảo vệ môi trường, trở thành yêu cầu cấp thiết. Trong bối cảnh đó, cơ chế cố định nitơ sinh học nổi lên như một giải pháp thay thế đầy tiềm năng, cho phép tận dụng các chủng vi sinh vật có khả năng chuyển hóa N_2 khí quyển thành nguồn đạm cho cây trồng có thể hấp thu [4]. Thông qua việc đưa các quần thể vi sinh hữu ích vào canh tác, phân bón sinh học góp phần tối ưu hóa lý tính đất, cải thiện độ thông thoáng và dự trữ dưỡng chất cho thực vật. Trong chu trình chuyển hóa, các nhóm vi sinh này đảm nhiệm vai trò cố định đạm tự do và bài tiết các hoạt chất điều hòa sinh trưởng nhằm kích hoạt tiềm năng phát triển của cây, thực hiện quá trình tạo khoáng, hòa tan lân (phốt phát) và kali vốn tồn tại ở dạng khó tiêu, từ đó tăng cường các chất dinh dưỡng cho hệ rễ [5]. Việc mở rộng cộng sinh cố định đạm sang các cây trồng quan trọng như ngũ cốc từ lâu đã là một mục tiêu lâu dài trong lĩnh vực cố định đạm sinh học. Thực hiện nghiên cứu quần thể vi khuẩn nội sinh có năng lực cố định đạm - dù là tồn tại tự nhiên hay thông qua cải biến sinh học - từ các nguồn gen lúa đa dạng (lúa hoang và lúa canh tác) đang mở ra những tiềm năng mới. Xuất phát từ vị thế đặc biệt của cây lúa tại khu vực kinh tế nông nghiệp quốc gia, luận văn đã đặt ra yêu cầu cấp

bách của việc tìm kiếm và phân lập các chủng vi khuẩn này nhằm tạo ra lựa chọn thay thế hiệu quả cho phân bón hóa học, góp gia tăng sản lượng sản xuất lúa gạo. Việc xác định và ứng dụng các vi sinh vật cố định đạm tiềm năng là chìa khóa để nâng cao chỉ số sinh trưởng thực vật. Giải pháp này ưu tiên sử dụng các vật liệu có nguồn gốc tự nhiên, giúp bảo vệ môi trường và cải thiện chất lượng nông sản một cách ổn định. Mặt khác, một số dòng vi khuẩn vùng rễ thúc đẩy sinh trưởng (PGPR) còn sở hữu năng lực nội sinh các phytohormone, đóng vai trò như những hoạt chất kích hoạt quá trình phát triển của thực vật, có một số ưu điểm, bao gồm phân bố rộng rãi, khả năng xâm chiếm mạnh mẽ, dễ phân lập và nuôi cấy, và khả năng ngăn chặn các bệnh trong đất để duy trì sức khỏe của cây trồng [6].

Do sự hiện diện của liên kết cộng hóa trị ba siêu bền, nitơ từ không khí (N_2) thường sẽ ở trạng thái kém hoạt động. Tuy nhiên, nhờ sự can thiệp của enzyme nitrogenase có nguồn gốc vi sinh, rào cản này sẽ bị phá vỡ. Enzyme tiến hành khử nitơ bằng cách bổ sung ba nguyên tử hydro vào mỗi nguyên tử N, biến đổi dạng khí trơ thành ion amoni (NH_4^+) mà rễ cây dễ dàng hấp thụ. Dựa vào phương thức thiết lập liên kết với bộ rễ, các chủng vi sinh vật kể trên được chia làm ba loại hình cơ bản, phản ánh mức độ gắn kết sinh học khác nhau. Vi sinh vật tự do, số lượng lớn sống trong đất có khả năng cố định đạm yếu gồm các loài *Azotobacter*, *Beijerinckia*. Vi khuẩn cộng sinh: Vi khuẩn *Rhizobium* hoặc *Bradyrhizobium* xâm chiếm hệ thống rễ của cây chủ và khiến rễ hình thành các nốt sần để làm nơi trú ngụ cho vi khuẩn. Vi khuẩn nội sinh: như *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, các quần thể vi khuẩn này giúp cung cấp đạm dồi dào thông qua quá trình sinh chuyển hóa nitơ diễn ra ngay tại vùng rễ của thực vật chủ [7]. Để xác định các dòng vi khuẩn cố định đạm tiềm năng, cần đánh giá dựa trên sự hội tụ của: hiệu suất đồng hóa nitơ tự do, đáp ứng trước các áp lực ngoại cảnh và tính tương thích sinh học tuyệt đối. Điển hình như chủng *B. amyloliquefaciens*, ngoài khả năng cung cấp dưỡng chất, nó còn bảo vệ cây trồng bằng cách tiêu diệt các tác nhân gây bệnh từ đất. Thực tế cho thấy, năng suất cây trồng được cải thiện rõ hơn thông qua khả năng của vi khuẩn này trong việc thiết lập một hàng rào phòng ngự, hạn chế sự xâm nhiễm của các loài nấm và vi khuẩn có hại [8].

Trong các môi trường tự nhiên với sự khác nhau rõ ràng về hàm lượng oxy phân tử, người ta tìm thấy nhóm vi khuẩn cố định đạm dị dưỡng tồn tại dưới dạng tự do. Năng lực thích nghi với các vi môi trường đa dạng của nhóm vi sinh này bắt nguồn từ sự khác biệt trong phương thức hô hấp. Nhằm ngăn chặn sự ức chế của O_2 đối với phức hệ enzym, vi khuẩn thực hiện chiến lược ngăn khoáng hóa. Chẳng hạn, việc hình thành các tế bào dị hình đóng vai trò như một màng chắn vật lý, kiểm soát

nồng độ oxy ở ngưỡng thấp nhất, đảm bảo chu trình chuyển hóa nitơ diễn ra liên tục [9]. Việc tự cung cấp năng lượng là đặc điểm cốt lõi của các sinh vật cố định đạm sống tự do, giúp chúng tích lũy nitơ cho đất mà không cần sự giúp đỡ từ các sinh vật khác. Nguồn năng lượng này chủ yếu đến từ sự phân hủy vật chất hữu cơ hoặc thông qua con đường hóa tự dưỡng vô cơ ở một số chủng chuyên biệt. Tuy nhiên, một thách thức lớn đối với quá trình cố định nitơ là tác động ức chế của oxy đối với nitrogenase. Vì vậy, quá trình sinh tổng hợp đạm ở nhóm này chỉ diễn ra hiệu quả khi môi trường đạt trạng thái kỵ khí hoặc nồng độ oxy cực thấp (vi hiếu khí). Do sự khan hiếm các nguồn cacbon và năng lượng thích hợp cho các sinh vật này, nên đóng góp của chúng vào tốc độ cố định nitơ toàn cầu thường được coi là nhỏ [10].

Sự hiệp lực giữa cây chủ và vi khuẩn cộng sinh được duy trì thông qua cơ chế trao đổi vật chất hệ thống. Cụ thể, các dẫn xuất carbohydrate từ quá trình quang hợp được chuyển dịch xuống rễ, trở thành nguồn cơ chất chuyển hóa thiết yếu, giúp vi sinh vật duy trì các hoạt động chức năng và tổng hợp đạm sinh học. Ngược lại, vi sinh vật thực hiện việc chuyển hóa nitơ khí quyển thành dạng khả dụng để hỗ trợ sự sinh trưởng của cây. Trên quy mô toàn cầu, hình thức cộng sinh giữa các loài cây họ Đậu với các chi vi khuẩn như *Rhizobium* và *Bradyrhizobium* được đánh giá là hệ thống quan trọng nhất. Các đại diện ưu tú trong mô hình này tập trung vào nhóm cây lấy dầu như đậu nành và lạc, kết hợp với các loài thức ăn gia súc như cỏ linh lăng, cỏ ba lá. Ngoài ra, danh mục còn bao gồm các dòng đậu đỗ thực phẩm như đậu tằm và đậu mắt đen [10].

Trong hệ sinh thái nông nghiệp, mối liên kết giữa vi khuẩn *Azospirillum* và các cây ngũ cốc chủ lực (lúa, ngô, lúa mì, lúa mạch) đóng góp giá trị cốt lõi trong việc tái thiết và cung ứng nguồn dưỡng chất hữu cơ nguyên bản cho hệ sinh thái cây trồng. Thay vì thiết lập mối quan hệ cộng sinh bắt buộc, các chủng này tạo ra sự tương tác mật thiết tại vùng rễ. Tại đây, chúng thực hiện nhiệm vụ chuyển hóa nitơ tự do thành các dạng hợp chất đạm khả dụng, giúp hệ rễ dễ dàng hấp thụ và đồng hóa. Khả năng tích lũy nitơ tại chỗ của chúng giúp giảm bớt áp lực trong việc bón phân hóa học cho cây trồng thuộc họ cỏ này [11].

Năng suất và sức khỏe thực vật được cải thiện đáng kể nhờ hoạt động của nhóm vi khuẩn vùng rễ thông qua ba cơ chế chính: điều tiết hiệu quả việc thu nhận chất dinh dưỡng từ đất, giải phóng hoạt chất điều tiết sinh trưởng và thiết lập hàng rào sinh học xâm nhiễm vào hệ thống rễ của mầm bệnh. Những vi sinh vật này không chỉ hỗ trợ cây phát triển mạnh mẽ mà còn củng cố khả năng miễn dịch của hệ thống thực vật [12]. Việc thu hồi và làm sạch chúng từ mẫu đất, phân tích các thành phần

cấu thành năng suất của các chủng vi sinh vật như *P. tropica* S39-2 và *C. palmae* JS23^T là một phần trong nỗ lực tìm kiếm các yếu tố hoạt hóa và phát triển sinh khối từ nhóm *Burkholderia*. Công trình hướng tới việc định lượng sự cải thiện các thông số sinh lý trên ba đối tượng cây trồng chiến lược. Kết quả thu được sẽ là cơ sở khoa học để xác lập vai trò điều tiết của vật liệu sinh học trong việc gia tăng giá trị kinh tế nông nghiệp gồm dầu cọ (*Elaeis guineensis*), bạch đàn (*Eucalyptus urophylla*) và đậu mè (*Jatropha curcas*). Chủng *P. tropica* S39-2 cho thấy hoạt tính cố định đạm mạnh nhờ có enzyme nitrogenase, được xác nhận qua phân tích khả năng khử acetylene (ARA assay). Chủng này không những hỗ trợ cung cấp nguồn nitơ tự nhiên mà còn thúc đẩy sinh trưởng rõ rệt của cả ba loài cây trồng kể trên. Ngược lại, chủng *C. palmae* JS23^T không có thể cố định đạm hoặc tổng hợp auxin (IAA). Hoạt động của enzyme ACC deaminase nồng độ cao là đặc điểm nổi bật của chủng vi khuẩn JS23^T, là yếu tố giúp cây trồng phát triển và vượt qua các rào cản sinh lý. Bằng cách làm giảm sự tích lũy ethylene nội sinh, JS23^T giúp cây duy trì đà tăng trưởng ổn định hiệu quả trong điều kiện bất lợi. Hiệu quả thực tế của chủng này đã được xác nhận thông qua sự phát triển vượt trội của bạch đàn và cây dầu cọ, dù đối với *J. curcas*, tác động của nó vẫn còn khá hạn chế [13].

Sự thiếu hụt nitrogen là nguyên nhân trực tiếp làm thu hẹp khoảng 10%–20% quy mô canh tác hữu hiệu dẫn đến những khó khăn trong việc xác định đặc điểm di truyền của các chủng vi khuẩn sinh amoni đang được sử dụng thường xuyên hơn, và tiềm năng của vi khuẩn cố định đạm trong việc loại bỏ tình trạng thiếu nitơ ở cây trồng, làm giàu dinh dưỡng cho đất, tăng sản lượng nông nghiệp và thúc đẩy chuyển đổi công nghệ, đặc biệt là trong nông nghiệp xanh đang ngày càng được quan tâm.

Nitơ giữ vai trò là nguyên tố dinh dưỡng cốt lõi, tham gia trực tiếp vào cấu tạo của các phân tử protein thông qua các liên kết axit amin, là thành phần thiết yếu trong hoạt động xúc tác enzym và vận chuyển electron. Sự hiện diện của nitrogen trong phức hệ sắc tố là giúp đồng hóa carbon của cây trồng. Ở góc độ sinh lý, nitơ không chỉ giúp lá cây có màu xanh đặc trưng mà còn kích thích sự phát triển mạnh mẽ của hệ thống sinh dưỡng từ rễ, thân đến lá. Việc cung ứng đầy đủ nguồn nitơ giúp rút ngắn chu kỳ phát triển, tăng giá trị nông sản, đồng thời gia tăng thành phần dinh dưỡng cho các loại cây làm thức ăn chăn nuôi [14].

Sự thiếu hụt nguồn cung nitơ kìm hãm sự phát triển của các cơ quan sinh dưỡng như lá, thân và cành do sự hạn chế trong phân hóa chồi. Một đặc điểm nhận diện quan trọng là các lá già sẽ bị ảnh hưởng đầu tiên, sau đó mới đến các bộ phận non do cơ chế tái phân phối dưỡng chất trong cây. Tuy nhiên, việc lạm dụng phân đạm đồng thời gây ra những tác động bất lợi như: cây phát triển mất cân đối, nước trong tế bào

tích trữ quá nhiều, dẫn đến tình trạng quả kém cả về chất lượng cũng như số lượng, gây thiệt hại về giá trị kinh tế. Cây chỉ hấp thụ đạm ở dạng hữu ích, hầu hết cây hấp thụ đạm ở dạng nitrat, nhưng lại không có tác dụng trên một số loại đất như đất ngập nước, trong khi NH_4^+ lại thích hợp và ổn định nhất đối với lúa. Sự sinh trưởng và phát triển bình thường của cây trồng đòi hỏi lượng đạm tối ưu. Bón quá ít đạm làm giảm năng suất cây trồng, trong khi việc bón quá nhiều đạm dẫn đến tác động xấu đến cây trồng và vấn đề này liên tục được chú trọng trong sản xuất cây trồng. Nitơ có thể là một phần của cấu trúc cây hoặc tham gia vào các quá trình sống [15].

1.1.2. Đặc điểm kiểu gen, kiểu hình của vi khuẩn vùng rễ

Nitrogen là nguyên tố định hình cấu trúc của các polymer sinh học, đặc biệt là chuỗi polypeptide và vật chất di truyền. Nhờ phức hệ enzyme *nitrogenase*, các vi khuẩn, vi sinh vật thực hiện việc khử N_2 khí quyển thành dạng Ammoni (NH_4^+) khả dụng, cung cấp nguồn đạm khả dụng cho toàn bộ hệ sinh thái đất. Quá trình này được các nhà khoa học đánh giá là cơ chế sinh hóa quan trọng thứ hai trên hành tinh, chỉ sau quang hợp. Sự chuyển hóa này diễn ra qua hai con đường chính: cộng sinh (điển hình là các chi *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* trên cây họ Đậu) và tự do (*Azotobacter*, *Azospirillum*),.. đóng góp trực tiếp vào việc tối ưu hóa sản lượng các dòng ngũ cốc trọng điểm như lúa, ngô và lúa mì [16].

Hệ enzyme nitrogenase, gồm hai thành phần protein riêng biệt (dinitrogenase reductase và dinitrogenase) được mã hóa bởi một hệ thống gene *nif* gồm các gene cấu trúc (*nifH*, *nifD*, *nifK*) và các gen điều hòa (*nifA*, *nifL*) [17]. Dinitrogenase, còn được gọi là protein FeMo, là một tetramer $\alpha_2\beta_2$ được mã hóa bởi các gen *nifD* và *nifK*, trong khi dinitrogenase reductase hay protein Fe là một homodimer được mã hóa bởi gen *nifH*. Dinitrogenase chứa hai cụm kim loại hiếm gặp, một trong số đó là đồng yếu tố sắt molybden (FeMo-co), được coi là vị trí khử dinitrogen [18]. Sự tương đồng về cấu trúc và trình tự đại phân tử của hai loại enzyme này cho thấy một cơ chế vận hành được bảo tồn nghiêm ngặt. Đặc tính này cho phép quá trình cố định đạm sinh học diễn ra với biên độ ổn định xuyên suốt các chủng vi khuẩn từ cộng sinh đến tự do [19]. Chính nhờ tính bảo tồn cao, các trình tự gene như *nifH*, *nifD* hoặc *nifK* đã trở thành những chỉ thị phân tử tiêu biểu được ứng dụng rộng rãi trong việc định danh khả năng cố định nitơ. Việc phân tích các vùng gene này không chỉ giúp xác định tiềm năng sinh học của vi khuẩn mà còn cho phép phân tích về mô hình phân bố của các quần thể vi sinh vật cố định đạm trong các hệ sinh thái tự nhiên. Sự biểu hiện của các gen cố định nitơ (*nif*, mã hóa cho các polypeptide nitrogenase) và fix (mã hóa cho các đồng yếu tố nitrogenase) được kích hoạt bởi một chuỗi tín hiệu, bao gồm các chất điều hòa cảm nhận oxy thấp như NifA [20, 21]. Bên cạnh các yếu tố di truyền, sự

biểu hiện của hệ thống gene cố định nitơ chịu sự chi phối mạnh mẽ bởi hàm lượng nitơ khoáng khả dụng trong môi trường. Đặc biệt, quá trình này đòi hỏi sự cung ứng đầy đủ của các ion sắt Fe, do tất cả các biến thể nitrogenase hiện nay đều cấu tạo từ các trung tâm hoạt động chứa sắt. Ngoài ra, tùy thuộc vào chủng vi sinh vật, các enzyme này còn cần sự hiện diện của các kim loại chuyển tiếp khác như molybden (Mo) hoặc vanadi (V) để hình thành các đồng yếu tố (cofactors) thiết yếu cho hoạt động xúc tác.

Vai trò của cụm gene *nif* trong việc mã hóa hệ enzyme nitrogenase được chứng minh dựa trên những thử nghiệm tương đồng. Nghiên cứu đột biến transposon và gen *nifH* cho thấy cụm gen *nif* và một số gen khác như *gltB* (mã hóa một tiểu đơn vị của glutamate synthase) chi phối trực tiếp khả năng tăng trưởng của *B. vietnamiensis* trong điều kiện không có nguồn đạm ngoại sinh. Việc dò tìm DNA cụm gen *nif* trên các blot DNA hệ gen của các chủng đột biến khiếm khuyết khả năng cố định nitơ cho thấy một trong các chủng này đã bị xóa hoàn toàn cụm gen *nif* [22]. Kết quả này khẳng định vai trò thiết yếu của cụm gen *nif* trong quá trình cố định nitơ. Đồng thời, các thí nghiệm cũng chứng minh rằng *Klebsiella pneumoniae* 342 (Kp342) có khả năng cố định nitơ hiệu quả và cung cấp nguồn nitơ đáng kể cho cây lúa mì. Khi lúa mì được cấy *K. pneumoniae* 342 vào rễ, các triệu chứng thiếu nitơ ở cây giảm rõ rệt, hàm lượng N tổng và nitơ trong mô tăng so với cây không được cấy vi khuẩn. Sau sáu tuần sinh trưởng trong nhà kính mà không bón phân đạm, cây không được cấy vi khuẩn và cây được cấy *K. pneumoniae* 342 đột biến *nifH* đều bị còi cọc và vàng úa, cho thấy các dấu hiệu nghiêm trọng của sự thiếu hụt đạm [22]

Sự hiện diện của các chủng *Bacillus*, *Pseudomonas* và *Azospirillum* tại vùng rễ giúp sản sinh hormone tự nhiên. Bằng cách tận dụng tryptophan từ nguồn dịch tiết của cây, các vi sinh vật này tổng hợp nên IAA, một loại auxin quan trọng ảnh hưởng đến kiến trúc rễ. IAA do vi khuẩn tiết ra tác động lên sự phân chia tế bào rễ, làm gia tăng mật độ rễ bên và hệ thống lông hút. Quá trình biến đổi hình thái này không chỉ làm tăng cường sức chống chịu mà giúp cây thu dinh dưỡng thông qua việc gia tăng không gian tiếp xúc giữa rễ và các keo đất [23]. Sự phối hợp giữa các kích thích tố cytokinin và gibberellin do vi khuẩn tiết ra giúp tối ưu hóa sự phát triển phôi hạt và tăng cường hoạt động phân bào tại các mô non. Các công bố khoa học gần đây khẳng định rằng gibberellin ngoại sinh từ vi khuẩn giúp cây trồng vượt qua các giới hạn sinh lý hạn chế về điều kiện nhiệt độ và ánh sáng. Thêm vào đó, năng lực điều phối mức độ ethylene nội sinh của nhóm PGPB thông qua enzyme ACC deaminase đóng vai

trò như một hệ thống đệm sinh học, bảo vệ cây trồng khỏi các tổn thương do stress gây ra. Thay vì trực tiếp sản xuất hormone tăng trưởng, các vi khuẩn này làm giảm nồng độ ethylene "stress" trong cây bằng cách phân hủy tiền chất ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) [24]. Cơ chế này được coi là đột phá trong nghiên cứu về stress phi sinh học, và đã được chứng minh trên cây trồng duy trì năng suất dưới tác động của hạn hán, độ mặn cao và ô nhiễm kim loại nặng [25].

Việc xác định các locus gen liên quan đến sinh tổng hợp phytohormone và các hệ thống vận chuyển khoáng đã cho thấy IAA là phytohormone đóng vai trò trung tâm trong cơ chế thúc đẩy sinh trưởng thực vật của vi khuẩn. Đây là loại auxin quan trọng nhất được vi khuẩn tổng hợp, chủ yếu dựa trên nguồn cơ chất tryptophan. Sự hiện diện của năm lộ trình chuyển hóa tryptophan với các hệ enzyme và operon điều tiết riêng biệt đã tạo nên năng lực kích ứng sinh trưởng đa dạng cho các chủng PGPB. Con đường indole-3-acetamide (IAM), con đường indole-3-pyruvic acid (IPyA), con đường tryptamine (TAM), con đường indole-3-acetonitrile (IAN), con đường tryptophan side-chain oxidase (TSO). Trong đó con đường indole-3-pyruvate (IPyA) được xem là phổ biến nhất ở vi khuẩn thúc đẩy sinh trưởng (PGPB) [26]. Gene *ipdC* mã hóa enzyme indole-3-pyruvate decarboxylase đóng vai trò trung tâm của con đường IpyA [27] nhà nghiên cứu đã sử dụng kỹ thuật đột biến chèn (insertional mutagenesis) để làm mất chức năng gene *ipdc*, tạo ra chủng *P. putida* bị thiếu hụt khả năng sản sinh IAA đóng vai trò là yếu tố tăng trưởng.

Bên cạnh IAA, một số vi khuẩn sinh trưởng vùng rễ còn có khả năng sinh tổng hợp gibberellin (GA). Cụm gene liên quan đến sinh tổng hợp GA, bao gồm *cps*, *ks* và các gene cytochrome P450 như *cyp112*, *cyp114*, *cyp117*, đã được mô tả rõ ở *Bradyrhizobium japonicum*. Các gen này tham gia chuyển hóa tiền chất geranylgeranyl diphosphate thành các dạng GA hoạt tính sinh học, góp phần điều hòa kéo dài thân và phát triển hạt [28].

Bên cạnh khả năng sản xuất phytohormone, hệ thống thu nhận sắt thông qua siderophore là một đặc điểm sinh thái quan trọng của PGPB. Các phân tử siderophore sở hữu ái lực cực cao với Fe^{3+} , giúp vi khuẩn chiếm ưu thế trong việc khai thác nguồn sắt tại vùng rễ, đồng thời gián tiếp ức chế quần thể mầm bệnh thông qua nguyên lý loại trừ cạnh tranh dinh dưỡng. Nền tảng di truyền của quá trình này bao gồm các cụm gene tiêu biểu như *pvd* (tổng hợp pyoverdine), *entA-F* (enterobactin) và *iucABCD* (aerobactin). Những con đường sinh tổng hợp này đã được xác định và mô tả chi tiết ở các chi vi khuẩn đất chủ chốt như *Pseudomonas*, *Bacillus* và *Enterobacter* [29].

Vi khuẩn *Bacillus* sp. hỗ trợ thực vật thông qua việc phân giải các đại phân tử chứa N và P thành những gốc tự do mà bộ rễ có thể đồng hóa trực tiếp. Thông qua việc tiết enzyme phosphatase và các axit hữu cơ, nhóm vi khuẩn này thúc đẩy quá trình axit hóa môi trường cục bộ, từ đó chuyển hóa hiệu quả các phức hợp phosphate vô cơ thành dạng ion tự do mà cây trồng dễ dàng đồng hóa. Trong chu trình nitơ, các chủng *Bacillus* không chỉ giải phóng ammonia từ nguồn hữu cơ sẵn có mà còn có thể sở hữu gene *nifH* để tổng hợp phức hệ nitrogenase (EC 1.18.6.1) nhằm cố định N₂ khí quyển. Những hoạt động sinh học này không chỉ tối ưu hóa năng suất mà còn đóng vai trò ảnh hưởng tích cực trong việc làm chậm quá trình già hóa ở thực vật [30]. Các chủng *Bacillus* spp. giúp tăng cường khả năng hấp thụ và tích lũy các dưỡng chất thiết yếu bao gồm đạm, lân và kali, từ đó hỗ trợ cây trồng chống chịu với các điều kiện stress phi sinh học tốt hơn. Ngoài ra, *Bacillus* còn sản sinh IAA và ACC deaminase để trực tiếp điều chỉnh quá trình phát triển của cây. Với hệ hoạt tính đa mục tiêu (phân giải lân, tiết IAA, siderophore và ammoniac), chủng *B. licheniformis* A2 đóng vai trò là tác nhân giảm thiểu stress và kích ứng sinh khối cây trồng hiệu quả [31]. Khả năng kiểm soát dịch hại tự nhiên góp phần giảm phụ thuộc vào hóa chất bảo vệ thực vật. Bên cạnh khả năng ức chế côn trùng tiêu biểu của *B. thuringiensis*, các chủng *B. cereus*, *B. subtilis* và *B. amyloliquefaciens* cũng thể hiện hoạt tính sinh học mạnh mẽ trong việc ngăn chặn sự bùng phát của các đối tác nhân gây hại cho cây trồng. Chúng ức chế mầm bệnh thông qua việc hình thành màng sinh học quanh rễ và tiết ra các độc tố sinh học như surfactin, iturin, macrolactin, bacillomycin và fengycin [32]. Dù khả năng cải thiện sinh khối và sản lượng thực vật của chi *Bacillus* đã được ghi nhận rộng rãi, việc giải mã chi tiết các con đường tín hiệu phân tử và phản ứng sinh lý nội bào vẫn là rào cản kỹ thuật đáng kể trong các thực nghiệm hiện nay do số lượng công bố chuyên sâu còn hạn chế.

Các đại diện thuộc phức hợp *Burkholderia cepacia* (Bcc) định cư tại vùng rễ đã được khẳng định về năng lực thúc đẩy sinh trưởng trong hệ thống canh tác bền vững. Điển hình là loài *Burkholderia vietnamiensis* với khả năng cố định nitơ N₂ đặc trưng; dù ban đầu được phát hiện trên cây lúa, các nghiên cứu sau đó đã xác nhận sự hiện diện của chúng trong rễ mía và ngô. Đáng chú ý, việc sử dụng chủng TVV75 đã mang lại hiệu quả vượt trội khi giúp sản lượng hạt lúa cuối vụ gia tăng từ 13% đến 22% [33]. Khả năng tổng hợp Auxin vượt trội của các chủng *Burkholderia* sp. (như *B. cepacia* RRE25) là tác nhân then chốt giúp tối ưu hóa cấu trúc hình thái thực vật. Việc cải thiện hàm lượng sắc tố quang hợp đã dẫn đến sự bứt phá về hiệu suất đồng hóa carbon, biểu hiện trực tiếp qua sự gia tăng đáng kể trọng lượng chất khô. Điều này giúp cây lúa xác lập được ưu thế sinh trưởng ngay từ những giai đoạn đầu của

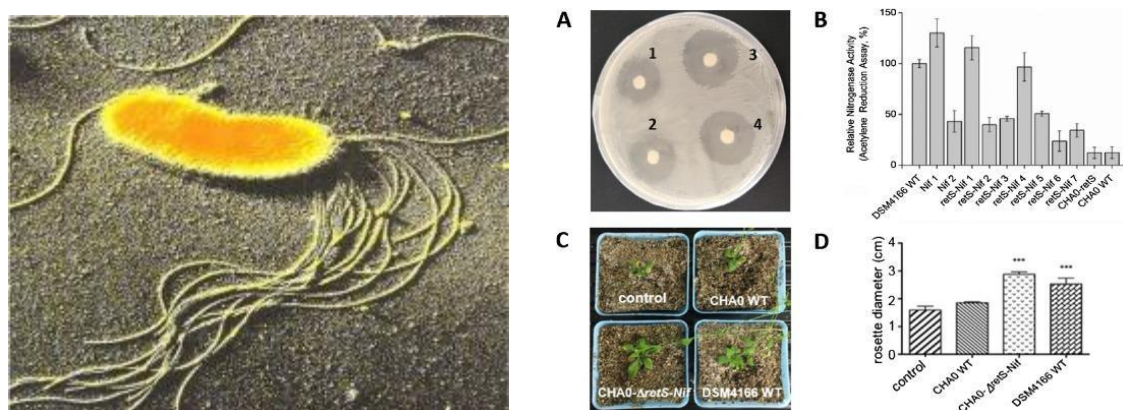
chu kỳ sống [34]. Ngoài các lợi ích về sinh trưởng, phức hợp Bcc còn sở hữu khả năng tiết đa dạng các hợp chất kháng nấm và các chất chuyển hóa đối kháng, đóng vai trò trực tiếp trong việc ức chế quần thể vi sinh vật gây hại tồn dư trong đất [35].

Như vậy có thể khẳng định PGPB là chìa khóa cho nền nông nghiệp xanh. Ghi nhận sự chênh lệch kết quả giữa phòng thí nghiệm và ngoài đồng ruộng của PGPB là hệ quả của các biến số môi trường phức tạp và sự đối kháng của hệ vi sinh vật tại chỗ. Các tác nhân PGPB ngoại lai thường khó tạo được mối tương tác bền vững với cây chủ hoặc mất đi các chức năng sinh học quan trọng do không thích nghi được với điều kiện thổ nhưỡng mới. Bối cảnh này đặt ra áp lực thực tiễn khi nhu cầu an ninh lương thực thế giới đang chịu sức ép cao từ sự gia tăng dân số và những thay đổi khắc nghiệt của khí hậu cùng tình trạng thoái hóa đất (nhiễm độc kim loại, mặn hóa) ngày càng trầm trọng. Vì vậy, nghiên cứu hiện nay quan tâm đến việc tối ưu hóa hiệu quả của vi khuẩn vùng rễ nâng cao tăng trưởng thực vật thông qua kỹ thuật di truyền để tạo ra PGPB được cải tiến phù hợp cho mục đích nông nghiệp.

Các nghiên cứu về khả năng sinh NH_4^+ trên thế giới của vi sinh vật. Năm 2017, Nghiên cứu của Muthukumarasamy và cộng sự đã xác lập năng lực thúc đẩy sinh khối mía đường thông qua cơ chế tối ưu hóa hấp dụng dinh dưỡng của các chủng vi khuẩn. Nghiên cứu tập trung vào việc tuyển chọn và giám định các chủng vi khuẩn đa chức năng, sở hữu đồng thời các đặc tính ưu việt như: cố định đạm sinh học, chuyển hóa lân khó tan và giải phóng kali từ khoáng vật [36]. Trong nghiên cứu thực hiện năm 2018, Kyaw và cộng sự đã tập trung vào việc phân lập và định tính các dòng vi sinh vật đa năng có khả năng đồng thời cố định đạm và phân giải cellulose nhằm sản xuất phân bón sinh học. Dựa vào chỉ số phân giải cellulose đặc trưng, nghiên cứu đã chọn lọc được 20 chủng ưu tú từ các mẫu đất khảo sát. Sau quá trình thử nghiệm, 6 chủng ưu việt nhất được phối trộn với phân hữu cơ làm vật liệu mang để bón cho lúa. Dữ liệu phản ánh tổ hợp phân bón sinh học này vượt trội hơn phân bón hóa học thông thường trong việc cải thiện sinh khối, năng suất hạt và hàm lượng nitơ tổng số trong đất [37]. Nghiên cứu của Richard et al. (2018) đã tập trung khai thác các dòng vi khuẩn cư trú tại bộ rễ cây ngô với khả năng giải phóng NH_3 và cố định đạm tự do. Bằng cách phân tích các đặc tính kiểu hình và di truyền, nhóm tác giả đã làm sáng tỏ vai trò của các chủng này như những tác nhân kích thích tăng trưởng tự nhiên, mở ra triển vọng ứng dụng trong canh tác ngô bền vững [38]. Nghiên cứu của Nohwar et al. (2019) đã làm sáng tỏ vai trò của các vi khuẩn nội cộng sinh chịu mặn phân lập từ rễ cây điền điền (*Sesbania sesban*). Nhóm tác giả hướng tới việc tuyển chọn các ứng viên vi sinh vật không chỉ chống chịu tốt với độ mặn của đất mà còn hỗ trợ đặc lực

cho chu trình nitơ. Các chế phẩm vi sinh đa đặc tính được phân lập giúp hóa giải rào cản thiếu hụt đạm trong điều kiện áp lực mặn [39].

Trong nghiên cứu công bố năm 2019, Yu, Jing và cộng sự đã thiết kế thành công chủng đột biến *Pseudomonas protegens* CHA0- Δ retS-Nif, tích hợp đồng thời hai đặc tính ưu việt: kiểm soát nấm bệnh và cố định nitơ sinh học (N_2). Qua các thử nghiệm trên đối tượng thực vật mô hình *Arabidopsis thaliana*, chủng này cho thấy khả năng kích thích sinh trưởng rõ rệt. Đồng thời, nhóm tác giả cũng đã chuẩn hóa các thông số nuôi cấy nhằm hướng tới việc thương mại hóa và sản xuất ở quy mô công nghiệp, góp phần cắt giảm dư lượng chất bảo vệ thực vật [40].



Hình 1.1: Kết quả phân tích hoạt tính sinh học của chủng đột biến (trích từ [40])

Nghiên cứu của Wang et al. (2020) đã đánh dấu một điểm sáng khi sử dụng chủng *P. protegens* CHA0- Δ retS-nif làm nguồn cung cấp đạm sinh học cho cây tỏi. Bằng việc thử nghiệm trong nhiều điều kiện đồng ruộng, nhóm tác giả đã chứng minh được năng lực của vi khuẩn trong việc bù đắp thiếu hụt dinh dưỡng và sự ổn định sản lượng cây trồng ngay cả khi lượng phân đạm đầu vào bị hạn chế. Kết quả trên minh chứng khả năng thay thế một phần phân bón hóa học của hệ vi sinh vật mà không gây suy giảm hiệu suất thu hoạch [41].

Đánh giá của Aasfar et al. (2021) về chi vi khuẩn *Azotobacter* đã xác lập năng lực đồng hóa N_2 vượt trội của các chủng vi khuẩn này, cung cấp giải pháp sinh học giúp nâng cao sức khỏe đất. Dữ liệu thu được chỉ ra đây là nguồn bổ sung dinh dưỡng phù hợp cho thực vật, hỗ trợ thiết lập một hệ sinh thái nông nghiệp bền vững thông qua việc ổn định sản lượng nông nghiệp và làm giảm các tác động tiêu cực từ việc thiếu hụt khoáng chất trong đất [7]. Sự hiện diện của các vi khuẩn nội sinh cố định đạm trong cây sắn (Zhang X và cs., 2022) Không chỉ phản ánh sự đa dạng của hệ vi sinh vật nội sinh, kết quả này còn cho thấy tiềm năng thay thế hóa chất nông nghiệp bằng các chế phẩm sinh học an toàn [42].

1.1.3. Các nghiên cứu trong nước

Với quỹ đất nông nghiệp khoảng 11,6 – 11,8 triệu ha (trong đó đất trồng cây hàng năm chiếm ~ 6,7 triệu ha và đất lúa xấp xỉ 3,9 triệu ha theo số liệu năm 2025), thách thức lớn ở Việt Nam là mỗi năm có tới 10.000–15.000 ha tái cơ cấu sử dụng chức năng kinh tế mới khác ngoài nông nghiệp. Hệ quả của tiến trình mở rộng không gian đô thị áp lực thâm canh cực lớn trên diện tích đất canh tác đang bị thu hẹp. Điều này dẫn đến tình trạng cường độ sử dụng phân bón hóa học tại nước ta cao gấp khoảng 3 lần mức trung bình toàn cầu. Việc lạm dụng phân bón vô cơ không kiểm soát không chỉ gây suy thoái môi trường đất, nước mà còn ảnh hưởng trực tiếp đến an toàn nông sản và sức khỏe con người, thúc đẩy Chính phủ phải chuyển dịch mạnh mẽ sang lộ trình nông nghiệp hữu cơ và bón phân thông minh [43].

Các định hướng nghiên cứu ở Việt Nam hiện nay tập trung trọng tâm vào việc khai thác nguồn vi sinh vật bản địa từ vùng rễ cây trồng, nhằm tuyển chọn các chủng có khả năng thích nghi cao với đặc điểm thổ nhưỡng và khí hậu đặc trưng của từng vùng miền. Điển hình, nghiên cứu của Hoàng Minh Tâm (2020) tại vùng mía Tây Ninh đã phân lập thành công 140 chủng vi khuẩn sở hữu đồng thời đặc tính cố định nitơ và hòa tan phosphate khó tan. Trong số đó, 41 chủng được ghi nhận có năng lực sinh tổng hợp IAA vượt trội. Kết quả định danh di truyền phản ánh sự đa diện về mặt cấu trúc quần thể, bao gồm các chi chủ đạo như *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Chitinophaga*, *Burkholderia*, *Serratia* và *Acinetobacter* [44].

Khảo sát của Nguyễn Quốc Khương (2021) trên đối tượng cây đinh lăng tại khu vực An Giang đã dẫn đến việc phân lập được 30 chủng vi khuẩn thủy phân yếu tố lân tiềm năng. Ghi nhận thực tế cho thấy chủng *Bacillus subtilis* AC10L2 không chỉ dẫn đầu về khả năng chuyển hóa lân mà còn thích nghi linh hoạt với điều kiện pH thấp. Việc sở hữu thêm các đặc tính sinh học quý giá như cố định đạm và sản sinh auxin (IAA) khiến chủng AC10L2 trở thành chủng được ưu tiên cho việc sản xuất phân bón vi sinh chuyên biệt cho các vùng đất chua [45].

Nghiên cứu của Nguyễn Khởi Nghĩa (2025) trên đối tượng đất trồng nhãn tại khu vực Vĩnh Long đã xác định được hai đại diện vi sinh vật ưu việt ký hiệu là VL2.3 và VL13.3. Các dòng vi khuẩn này có hoạt tính sinh học kép: vừa có khả năng giải phóng lân từ các hợp chất khoáng, vừa có năng lực tổng hợp enzyme phytase với hoạt độ cao. Đây là cơ sở tốt để phát triển các chế phẩm vi sinh giúp tối ưu hóa chu trình lân trong các vườn cây ăn trái thâm canh lâu năm [46].

Nguyễn Yên Chi (2025) đã hệ thống hóa nguồn gen vi sinh vật bản địa từ lúa hoang tại ĐBSCL, qua đó xác lập 12 chủng PGPB ưu tú có khả năng hỗ trợ cây trồng

vượt trội. Từ 4 mẫu đất tại Tiền Giang và Vĩnh Long (thu thập vùng rẫy), nghiên cứu đã lựa chọn được các chủng có hoạt tính sinh học mạnh mẽ. Đặc biệt, các dòng BĐ1.3, BĐ2.3.2 và BĐ2.4 chứng minh khả năng hỗ trợ dinh dưỡng kép thông qua chu trình nitơ và photpho, kết hợp cùng năng lực sản sinh auxin (IAA). Kết quả định danh cho thấy chủng có hoạt tính cao nhất, BĐ1.3, chính là một đại diện của chi *Stenotrophomonas* [47].

Việc khai thác hệ vi sinh vật từ giống lúa bản địa Huyét Rồng đã giúp phát hiện chủng *B. vietnamiensis* TVV75 bởi Trần Văn V và cs. Được phân lập từ điều kiện khắc nghiệt của đất mặn chua sunfat, chủng này không chỉ thể hiện năng lực cố định nitơ vượt trội thông qua chỉ số nitrogenase cao mà còn nhờ phổ đối kháng rộng, dòng phân lập này được xác lập là phương án tối ưu, giúp ngăn chặn sự xâm nhiễm của các loại nấm hại mục tiêu. Sự tích hợp các cơ chế sản xuất chất vận chuyển sắt (siderophore) và hormone tăng trưởng (IAA) khiến TVV75 trở thành ứng viên tiềm năng để nâng cao sức chống chịu và năng suất cây trồng. Kết quả đánh giá chứng minh việc cấy TVV75 đảm bảo năng suất tương đương với năng suất thu được ở đối chứng không cấy vi sinh vật với lượng phân đạm nhiều hơn từ 25 đến 30 kg [33]. Tương tự, Ngô Thanh Phong và cộng sự (2024) cũng chứng minh hiệu quả của dòng vi khuẩn *Burkholderia vietnamiensis* BV2 có thể cung cấp khoảng 50% đạm sinh học so với lượng đạm hóa học đối với nhu cầu sinh trưởng, phát triển ở cây lúa [48].

Mặc dù có tiềm năng lớn, các chủng PGPB tự nhiên vẫn bộc lộ hạn chế về hoạt tính sinh học chưa cao và thiếu tính ổn định khi ứng dụng ngoài đồng ruộng. Trong điều kiện khí hậu biến động và quỹ đất sản xuất bị thu hẹp. Nhu cầu giảm hóa chất nông nghiệp làm nổi bật vai trò của các giải pháp sinh học bền vững, đòi hỏi phải nâng cao hiệu suất của các chủng này. Việt Nam có nguồn chủng PGPB bản địa rất phong phú, nhưng nghiên cứu chỉnh sửa gen hoặc cải biến di truyền có định hướng ở PGPB tại Việt Nam còn rất hạn chế

Nghiên cứu của Nguyễn Hữu Hiệp et al. (2019) đã đánh dấu bước chuyển sang phân tích di truyền chức năng khi sàng lọc thành công 78 dòng vi khuẩn từ các chủng ngô. Thông qua phương pháp khuếch đại gen bằng kỹ thuật PCR, nhóm tác giả đã sử dụng các đoạn môi chuyên biệt để nhận diện gene *nifH*. Đây là quy trình quan trọng giúp khẳng định tiềm năng cố định nitơ của vi khuẩn ngay từ cấp độ bộ gen, thay vì chỉ dựa vào các biểu hiện sinh hóa truyền thống. Kết quả có 13 chủng *Azospirillum lipoferum* và 2 chủng *Burkholderia vietnamiensis* mang gene *nifH*, chứng minh sự hiện diện cụ thể gene chức năng này trong vi khuẩn bản địa [49]. Giang et al. (2013) đã phân lập được chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng sản xuất phytase ngoại bào - enzyme quan trọng trong phân giải photpho hữu cơ - từ môi trường đất

canh tác, mặc dù vậy, trọng tâm phân tích vẫn ưu tiên các hoạt tính enzyme cốt lõi của chủng vi khuẩn [50]. Lê Thị Xá và cs (2018) đã khảo sát hệ vi sinh vật bản địa ở đất canh tác khác nhau bao gồm bưởi, lúa, rau, mía, ngô, cam, chuối, tre, hành lá, đồng cỏ, v.v. trong tỉnh Sóc Trăng. Kết quả cho thấy tất cả các chủng được khảo sát đều có khả năng hòa tan P, sinh tổng hợp IAA đáng kể và đều có chứa gene *nifH*, và 8 trong số 15 chủng chứa gene *nifH* có khả năng cố định N [51].

Trong một nghiên cứu thực hiện năm 2012 tại Đại học Cần Thơ nghiên cứu đã phân lập thành công 28 dòng vi khuẩn có năng lực hòa tan khoáng vật từ các sản phẩm phong hóa granit (đá hoa cương) trên môi trường chọn lọc. Kết quả ghi nhận toàn bộ các chủng này đều có năng lực sinh tổng hợp amoni (NH_4^+) trong môi trường Burk's, với 5 dòng thể hiện hiệu suất vượt trội. Thử nghiệm chủng nạp hỗn hợp ba dòng vi khuẩn tiềm năng nhất trên đối tượng hành lá (*Allium fistulosum*) và mồng tơi (*Basella alba* L.) đã cho thấy những tác động tích cực rõ rệt, giúp cải thiện đáng kể chiều cao, năng suất thực tế của cây trồng nông nghiệp [14]. Nghiên cứu của Nguyễn Quốc Khương et al. (2019) đã tập trung vào việc phân lập các tác nhân thúc đẩy sinh trưởng thực vật (PGPR) cư trú trong đất vùng rẫy bắp lai. Việc xác lập các dòng vi khuẩn có khả năng khoáng hóa lân và cố định đạm tạo tiền đề cho chiến lược canh tác bắp bền vững. Cách tiếp cận này giúp hạn chế hệ lụy từ việc sử dụng hóa chất hóa học mà vẫn đảm bảo sản lượng cây trồng [52].

Nghiên cứu của Nguyễn Thành Được et al. (2022) tập trung vào việc từ 38 mẫu thổ nhưỡng đại diện cho vùng đất phù sa ĐBSCL, nghiên cứu đã chiết xuất và xác lập được 120 chủng PGPB có năng lực cố định nitơ sinh học cao trên đối tượng cây ngô. Dựa vào kết quả thu được trong việc tuyển chọn các ứng viên vi sinh vật ưu việt để chế tạo phân bón sinh học chuyên dụng cho các vùng trồng ngô trọng điểm phía Nam. Bằng cách giải trình tự và phân tích gen 16S rRNA 6 dòng vi khuẩn có khả năng cố định đạm tốt nhất được định danh có 3 chi bao gồm *Bacillus*, *Pseudomonas* và *Klebsiella* [15]. Nghiên cứu của Ngô Thanh Phong và cs. (2024) tại Vĩnh Long đã minh chứng năng lực thúc đẩy sinh trưởng của chủng *B. vietnamiensis* BV2 trên giống lúa IR50404. Kết quả thí chỉ ra dòng vi sinh vật này bộc lộ khả năng cung cấp dưỡng chất tương đương với 50% định mức phân đạm hóa học. Việc chủng nạp BV2 không chỉ đảm bảo chỉ tiêu sinh trưởng ở cây lúa mà còn duy trì năng suất ổn định, mở ra triển vọng cắt giảm đáng kể lượng phân bón vô cơ trong canh tác lúa tại địa phương [48]. Trong nghiên cứu thực hiện năm 2024, Giang Cẩm Tú và cộng sự đã tập trung khai thác mạng lưới sinh học vùng rẫy xoài tại khu vực vùng đất chịu tác động mặn của huyện Cần Giò, TP. Hồ Chí Minh. Bằng cách sử dụng môi trường Luria Bertani (LB) có bổ sung 4% NaCl, nhóm tác giả đã tuyển chọn thành công 23

dòng vi khuẩn có khả năng thích nghi với áp lực thẩm thấu cao. Kết quả ghi nhận hai chủng X4.1 và X1.1 sở hữu hoạt tính cố định nitơ vượt trội với hàm lượng amoni tích lũy đạt từ 3,29 đến 3,42 mg/L sau 6 ngày nuôi cấy. Thử nghiệm in vitro trên hạt lúa cho thấy các chủng X4.1 và X8.2 thúc đẩy mạnh mẽ sự phát triển chiều cao thân và chiều dài rễ. Căn cứ vào kết quả vùng gene mã hóa 16S rRNA, các chủng ưu việt này được định danh là *Pantoea* sp. (X4.1) và *Bacillus subtilis* (X8.2) [53].

1.2. Định danh vi sinh vật

1.2.1. Theo phương pháp truyền thống

Phương pháp định danh dựa trên kiểu hình (phenotype) là cách tiếp cận cổ điển để phân loại vi sinh vật thông qua các tiêu chí về đặc điểm về hình thái, sinh lý và sinh hóa. Các chuyên gia thường bắt đầu bằng việc phân tích các đặc điểm hình thái tế bào và hình thái khuẩn lạc trên các môi trường nuôi cấy chuyên biệt. Các yếu tố định tính bao gồm khả năng di động, sự hiện diện của các cấu trúc bề mặt (lông nhung, roi), cũng như năng lực biệt hóa thành bào tử hoặc tạo màng nhầy. Những đặc điểm này cung cấp những dữ liệu định danh ban đầu quan trọng trước khi tiến hành các phân tích chuyên sâu hơn ở cấp độ phân tử.

1.2.2. Dựa vào vật liệu di truyền

Định danh dựa trên chỉ thị di truyền hiện được xem là một kỹ thuật với độ nhạy và độ đặc hiệu tối ưu, quy trình chuẩn hóa và thời gian thực hiện tối ưu. Mặc dù đòi hỏi hệ thống trang thiết bị chuyên dụng và chi phí hóa chất đáng kể, kỹ thuật này đã trở thành tiêu chuẩn vàng trong vi sinh vật học. Trọng tâm của phương pháp là việc khai thác gene 16S rRNA một 'thước đo tiến hóa' lý tưởng ở sinh vật nhân sơ nhờ sự đan xen giữa các vùng bảo tồn nghiêm ngặt và các vùng biến đổi đặc trưng cho từng loài. Sau khi trình tự 16S rDNA được giải mã, việc định danh được thực hiện thông qua công cụ BLAST để đối chiếu với cơ sở dữ liệu quốc tế (GenBank). Quá trình này không chỉ giúp xác định danh tính loài mà còn cho phép thiết lập cây phát sinh loài, làm rõ mối quan hệ tiến hóa và vị trí phân loại của chủng nghiên cứu.

1.2.3. Dựa trên các đặc điểm hóa sinh - proteomic

Theo Croxatto, và cs năm 2012 [54] phương pháp định danh dựa trên MALDI-TOF MS minh chứng cho sự đột phá trong phạm vi nghiên cứu proteomics, tập trung khai thác các đặc tính protein đặc thù của tế bào vi khuẩn. Bằng cách phân tích các protein ribosome có khối lượng phân tử thấp đến trung bình, kỹ thuật này thiết lập một 'dấu vân tay protein' (protein fingerprinting) đặc hiệu cho từng chủng. Khác với cách tiếp cận dựa trên kiểu hình truyền thống hay kiểu gen (DNA/RNA), MALDI-

TOF MS phản ánh trực tiếp trạng thái biểu hiện protein thực tế. Trong thực nghiệm, mẫu vi khuẩn thuần khiết được trộn với chất nền (matrix), thường là acid hữu cơ, và chiếu tia laser. Matrix hấp thụ năng lượng từ laser, giúp các protein trong tế bào được giải phóng và ion hóa mà không bị phá hủy cấu trúc, quá trình này gọi là ion hóa mềm. Các ion protein này được gia tốc trong ống Time-of-Flight, di chuyển tùy thuộc vào tỷ lệ phân tích phổ m/z để sàng lọc các hợp chất hữu cơ có hoạt tính sinh học từ dịch chiết vi khuẩn và được ghi nhận bởi detector, tạo thành phổ khối. Mỗi loài vi khuẩn có mẫu phổ đặc trưng, cho phép phân biệt giữa các loài và nhiều trường hợp còn ở mức chủng.

Cơ sở dữ liệu này phải bao gồm đủ số lượng chủng phân lập của mỗi loài, đối với các chủng hiếm, mới, biến dị dễ gặp tình trạng không định danh được, định danh được hoặc không định danh được đến chi.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Mẫu nghiên cứu

Chín mẫu đất và rễ lúa được thu thập từ nhiều địa điểm khác nhau trên ruộng lúa tại khu vực ruộng lúa thuộc vùng ven Cần Thơ.



Hình 2.1: Mẫu rễ lúa và đất được thu thập

2.1.2. Hoá chất, thiết bị

Các ống Eppendorf 2 ml; 1,5 ml; 0,5 ml; các ống falcon 15 ml, 50 ml; pipet các loại 10 µl, 100 µl, 1000 µl; đĩa petri, cốc đong, ống đong, chai đựng hoá chất; một số dụng cụ khác như giá, rổ các loại. Các loại hóa chất sử dụng pha môi trường, thực hiện thí nghiệm được mua từ các hãng nổi tiếng như Sigma, Merk... của các nước như Mỹ, Đức, Canada, Trung Quốc...

Các thiết bị được sử dụng:

Tên thiết bị	Hãng sản xuất
Box cây vi sinh clean beach	Việt Nam
Cân phân tích AB 240	Sartorius (Thụy Sĩ)
Lò vi sóng	Samsung (Korea)
Máy đo pH	Metrohm (Thụy Sĩ)
Máy lắc nuôi cấy	Certomat HK (Germany)
Máy li tâm lạnh Miikro 22R	Hettich (Germany)
Máy ly tâm	Sorvall Legend XTR (Japan)

Môi trường nuôi cấy

MT1: Môi trường LB lỏng dùng để nuôi cấy và hoạt hóa chủng vi khuẩn, thành phần môi trường bao gồm (g/L) (Bertani, 1951): 1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 0.1% glucose pH điều chỉnh pH về 7.0 với 1N NaOH.

MT2: Môi trường LB thạch agar (có bổ sung thêm bột agar)

MT3: Môi trường lỏng và môi trường thạch PDA.

MT4: Môi trường LGI dùng để phân lập, nuôi cấy và nghiên cứu các đặc tính của vi khuẩn. Thành phần môi trường LGI (g/l) bao gồm: Sucrose 5%, K_2HPO_4 0,2%, KH_2SO_4 0.6%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2%, $CaCl_2 \cdot H_2O$ 0,02%, Na_2MoO_4 0.002%, bromthymol blue (5g L trong 0.2 N KOH), $FeCl_3$ 0.01%, agar 2%, 4 ml vitamin (vitamin H + vitamin B6) [55].

Môi trường Burk (MT5) được ứng dụng làm môi trường chọn lọc đặc thù trong quy trình phân lập và tăng sinh các nhóm vi khuẩn cố định nitơ tự do từ đất. Công thức môi trường (g/L) bao gồm: 1% glucose (nguồn carbon), KH_2PO_4 0,08%, K_2HPO_4 0,02%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,02%, $CaSO_4$ 0,01%, $FeSO_4$ 0,0005%, agar 2%. Đặc điểm cốt lõi của môi trường này là sự vắng mặt hoàn toàn của các nguồn đạm vô cơ, do đó chỉ những vi sinh vật sở hữu hệ thống enzyme nitrogenase có khả năng chuyển hóa nitơ khí quyển mới có thể tồn tại và hình thành khuẩn lạc [56, 57].

MT6: Môi trường NFB (Nitrogen-free Bromothymol Blue) được thiết lập như một hệ thống môi trường bán lỏng chuyên biệt để tuyển chọn các vi khuẩn cố định đạm vùng rễ. Với hàm lượng agar thấp (0,15–0,2%), môi trường tạo ra gradient oxy lý tưởng cho các nhóm vi sinh vật vi hiếu khí. Thành phần môi trường (g/L) bao gồm: malic acid 5,0 g; NaCl 0,1 g; K_2HPO_4 0,5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g; KH_2PO_4 0,4 g; $FeCl_3$ 0,01 g; $CaCl_2$ 0,02 g; Na_2MoO_4 0,002 g và chỉ thị bromothymol blue 0,005. Sự hiện diện của molybden (Mo) là yếu tố vi lượng then chốt cấu thành nên trung tâm hoạt động của enzyme nitrogenase [58].

Môi trường CMC (MT7) được thiết lập nhằm đánh giá khả năng sinh enzyme cellulase của các chủng vi sinh vật thông qua quá trình thủy phân dẫn xuất cellulose tan. Thành phần môi trường (g/L) bao gồm: carboxymethyl cellulose (CMC) 10,0 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g; K_2HPO_4 1,0 g; $(NH_4)_2SO_4$ 1,0 g; NaCl 0,5 g; $CaCl_2$ 0,1 g và agar 20,0 g. Trong công thức này, CMC đóng vai trò là nguồn carbon và cơ chất duy nhất để kích hoạt sự biểu hiện gen mã hóa cellulase. Giá trị pH được điều chỉnh tối ưu

trong khoảng 6,8–7,0 nhằm tạo điều kiện thuận lợi nhất cho sự sinh trưởng của vi khuẩn vùng rễ [59].

MT8: Môi trường Sữa gầy (Skim Milk Agar) được sử dụng như một giá thể đặc hiệu để đánh giá năng lực bài tiết enzyme protease ngoại bào của vi sinh vật. Nguyên lý của phương pháp dựa vào sự thủy phân cơ chất casein - thành phần protein chính tạo nên độ đục của sữa. Khi vi khuẩn tổng hợp protease, các liên kết peptide trong casein bị bẻ gãy, tạo thành các đoạn peptide ngắn và acid amin hòa tan, dẫn đến sự hình thành vòng vô sắc bao quanh khuẩn lạc. Thành phần môi trường (g/L) bao gồm: Sữa gầy 100,0 g, NaCl 5,0 g, peptone 5,0 g và agar (15,0–20,0) g. Giá trị pH được duy trì ổn định ở mức 6,8–7,0 để tối ưu hóa hoạt tính enzyme [60].

MT9: Môi trường tinh bột (Starch Agar) được sử dụng như một giá thể đặc hiệu để đánh giá khả năng tiết enzyme amylase ngoại bào của vi sinh vật. Nguyên lý của phương pháp dựa trên khả năng thủy phân các liên kết alpha-1,4 và alpha-1,6-glycoside trong phân tử tinh bột. Khi vi khuẩn tổng hợp amylase, tinh bột sẽ bị phân cắt thành các đường đơn và dextrin hòa tan, tạo ra một vùng phân giải (halo zone) quanh khuẩn lạc, có thể quan sát rõ sau khi nhuộm với dung dịch iodine. Thành phần môi trường (g/L) bao gồm: Tinh bột hòa tan (10,0), peptone 5,0 g, beef extract (3,0), NaCl (5,0) và agar (15,0–20,0) với pH tối ưu đạt 6,8–7,0 [61].

2.2. PHƯƠNG PHÁP

2.2.1. Phân lập chủng vi khuẩn có hoạt tính sinh NH_4^+ từ mẫu đất và rễ lúa

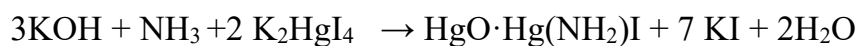
Đối tượng nghiên cứu bao gồm mẫu đất vùng rễ và rễ lúa phục vụ mục tiêu phân lập vi khuẩn cố định đạm được thu thập tại nhiều sinh cảnh khác nhau thuộc khu vực ngoại vi thành phố Cần Thơ. Các mẫu sau khi được thu thập bằng dụng cụ vô trùng sẽ được để trong túi nhựa và ghi rõ mã mẫu, địa điểm, thời gian lấy mẫu, tránh phơi nắng trực tiếp. Để lạnh trong thùng xốp và vận chuyển về phòng thí nghiệm sau 36 giờ và sau đó được bảo quản ở 4°C trong tủ lưu trữ mẫu.

Tiếp đến mẫu được tiến hành xử lý bằng phương pháp cơ học các bước thí nghiệm được tiến hành như sau, để tăng tính đồng nhất và tăng hiệu quả pha loãng chia làm 9 mẫu đất, 3g đất mỗi mẫu thêm vào 27 ml H_2O . Lắc hỗn hợp này trong máy lắc 200 vòng/phút trong 2 giờ. Dịch chiết sau khi thu hồi được tiến hành pha loãng dung dịch theo cấp số mũ 10^{-7} , 10^{-8} và 10^{-9} . Tại mỗi nồng độ, mẫu được chia làm hai lộ trình phân lập song song. Ở lộ trình thứ nhất, 50 μl dịch huyền phù được chuyển vào bình tam giác chứa 3 ml môi trường LGI bán lỏng, sau đó thực hiện nuôi cấy lắc với tốc độ 200 vòng/phút. Ở lộ trình thứ hai, một lượng tương đương (50 μL) được phân phối và cấy trải đều trên bề mặt đĩa thạch LGI đặc. Toàn bộ các đơn vị thí

nghiệm được duy trì trong tủ ẩm ở nhiệt độ 32°C trong thời gian 4 ngày để theo dõi sự hình thành khuẩn lạc và vòng phân giải đặc trưng. Sau thời gian ủ, lấy 50 µl lớp váng sinh trưởng từ môi trường bán lỏng, cấy trải lên đĩa thạch chứa môi trường PDA nhằm tăng sinh chủng. Tiếp tục ủ ở 32°C trong 4 ngày. Các khuẩn lạc hình thành trên đĩa thạch LGI được tách riêng và chuyển vào các bình chứa 3 mL môi trường LGI bán lỏng, sau đó ủ ở 32°C. Tiếp theo, lấy 50 µL dịch nuôi cấy, cấy trải lên đĩa thạch chứa môi trường LGI đặc và tiếp tục ủ ở 32°C trong 4 ngày. Sau thời gian ủ nhiệt, quá trình đánh giá cảm quan được thực hiện nhằm phân loại các nhóm vi khuẩn dựa trên biểu hiện hình thái trên môi trường thạch. Việc sàng lọc tập trung vào các chủng có kiểu hình ổn định và mang những đặc điểm nhận diện tiêu biểu của các nhóm vi sinh vật mục tiêu. Các chủng được lựa chọn sẽ trải qua bước thuần khiết chủng để đảm bảo độ tin cậy về mặt di truyền và sinh hóa trước khi đưa vào các thử nghiệm khảo sát hoạt tính tiếp theo.

2.2.2. Phân tích định lượng khả năng sinh NH₄⁺ của chủng vi khuẩn phân lập

Tổng số 14 chủng vi khuẩn sau khi phân lập được tiến hành đánh giá định lượng khả năng giải phóng NH₄⁺ thông qua phản ứng màu đặc trưng với thuốc thử Nessler. Về mặt hóa học, thuốc thử này là một phức chất của thủy ngân (II) iodide (HgI₂) hoặc kali iodide (KI) trong môi trường kiềm mạnh (NaOH hoặc KOH). Sự hiện diện của ammonia trong dịch nuôi cấy sẽ tương tác với thuốc thử Nessler để hình thành phức chất màu vàng cam đặc trưng. Cường độ màu của phức chất này tỉ lệ thuận với nồng độ amoni và được xác định chính xác bằng phương pháp đo quang phổ hấp thụ (spectrophotometry) tại dải bước sóng 410–425 nm. Màu sắc đậm dần từ vàng sang vàng cam/nâu đỏ cùng với sự tăng nồng độ amoniac [62]. Phản ứng tổng thể được thể hiện trong phương trình.



Phương pháp Nessler có thể phát hiện nồng độ amoniac ở giới hạn phát hiện tương đương với phương pháp indophenol xanh (0,025 - 5,0 mg L⁻¹ NH₃-N), nhưng với quy trình nhanh hơn [62]. Do độ nhạy của phương pháp này với thời gian phản ứng, việc đo mẫu màu bằng máy quang phổ được khuyến nghị thực hiện khoảng 10–30 phút sau khi trộn dung dịch mẫu với thuốc thử Nessler để có kết quả chính xác. Tuy nhiên phương pháp Nessler sử dụng hóa chất chứa thủy ngân, độc hại và có hại. Do đó, thuốc thử và các mẫu liên quan cần được xử lý, bảo quản và thải bỏ đúng cách.

Tiến hành xây dựng đường chuẩn với chất gốc là NH₄Cl, thành phần thuốc thử gồm (50 g K-Na Tartarate, 100 ml H₂O), thuốc thử Nessler gồm có (10 g HgI₂, 7g KI, 16 g NaOH, 10 ml H₂O) với tổng thể tích phản ứng là 100 ml. Nhằm thiết lập mối

quan hệ giữa cường độ màu và nồng độ amoni, từ đó xác định chính xác lượng NH_4^+ do các chủng vi khuẩn sinh ra, đảm bảo tính so sánh và độ tin cậy của kết quả. Mười bốn chủng vi khuẩn được tiến hành nuôi tăng sinh trong môi trường LGI lỏng sau khi phân lập. Sau thời gian nuôi cấy, dung dịch huyền phù vi khuẩn được tiến hành ly tâm lạnh tại 6000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ 4°C nhằm tách chiết phần dịch nổi. Tiếp theo, dịch trong được phối trộn với dung dịch đệm K-Na và thuốc thử Nessler, để phản ứng ổn định trong vòng 5 phút. Thành phần trong ống phản ứng gồm có (1ml mẫu + 200ul K-Na + 200ul thuốc thử Nessler).

Giá trị mật độ quang (OD) của hỗn hợp được ghi nhận tại bước sóng 415 nm. Dựa trên giá trị hấp thụ quang học thu được, hàm lượng NH_4^+ sinh ra bởi các chủng vi khuẩn được nội suy từ phương trình đường chuẩn tương ứng $y = ax + b$.

Kết quả này là cơ sở định lượng quan trọng để sàng lọc và lựa chọn những chủng có hiệu suất cố định đạm vượt trội nhất trong tổng số 14 dòng phân lập.

2.2.3. Định danh vi khuẩn sinh NH_4^+

Quy trình định danh loài được thực hiện dựa trên nền tảng phân tích trình tự gen đặc trưng. Ban đầu, DNA tổng số được tách chiết từ sinh khối vi khuẩn có hoạt tính sinh học, tuân thủ nghiêm ngặt phương pháp thực nghiệm của Gevers et al. Tiếp đến, vùng gene 16S rRNA được khuếch đại chọn lọc bằng phản ứng chuỗi polymerase (PCR). Các đoạn DNA sau khi đọc trình tự sẽ được đối chiếu với cơ sở dữ liệu quốc tế GenBank để xác định vị trí phân loại chính xác của chủng vi sinh vật nghiên cứu. [63].

Trình tự gen mã hóa 16S rRNA sau khi giải mã được tiến hành đối chiếu với các trình tự mẫu (reference sequences) lưu trữ trên hệ thống dữ liệu NCBI. Dựa trên các chỉ số về độ bao phủ (query cover) và độ tương đồng (identity percentages), định tính về loài của vi khuẩn được xác định một cách khách quan. Phương pháp tiếp cận dựa trên dữ liệu phân tử này giúp loại bỏ các sai sót cảm quan từ hình thái, đảm bảo tính chính xác tuyệt đối trong việc nhận diện các chủng vi khuẩn phân lập.

Phản ứng PCR nhằm khuếch đại gen 16S rRNA được tiến hành sử dụng cặp mồi phổ rộng 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 926R (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'). Hỗn hợp phản ứng (tổng thể tích 25 μL) gồm: dung dịch đệm PCR nồng độ $1\times$, MgCl_2 2,5 mM, dNTPs 0,2 mM, mỗi mồi ở nồng độ 0,4 μM , 1 U enzyme Taq DNA polymerase và 50–100 ng DNA khuôn.

Điều kiện chu trình nhiệt được thiết lập như sau: biến tính DNA ở 95°C trong 5 phút; Sau đó là 30 chu kỳ, biến tính ở 95°C trong 30 giây, giai đoạn bắt cặp ở 55°C

trong 30 giây và kéo dài ở 72°C trong 1 phút; cuối cùng là bước kéo dài sợi DNA thực hiện ở 72°C trong 7 phút.

2.2.4. Phương pháp điện di DNA trên gel agarose

Điện di là phương pháp phân tích vật lý để kiểm tra độ tinh sạch và kích thước của các sản phẩm khuếch đại. Tận dụng đặc tính tích điện âm tự nhiên của DNA, kỹ thuật này giúp các đoạn nucleic acid xuyên qua các lỗ hổng của thạch agarose về phía cực dương. Kết quả là các đoạn DNA được sắp xếp thành các vạch đặc trưng, cho phép xác định chính xác sự hiện diện của gen mục tiêu (như 16S rRNA) bằng cách đối chiếu với thang chuẩn (DNA Ladder).

Trong thí nghiệm này, gel agarose 0,8% được chuẩn bị bằng cách hòa tan agarose trong nước và đun sôi. Sau khi dung dịch agarose đạt nhiệt độ 50–60°C, nó được đổ vào khay gel đã gắn sẵn rãnh lược. Khi gel đông cứng (khoảng 30 phút), rãnh lược được tháo ra, và gel được đặt vào bể điện di. Tiếp theo, đệm TAE 1X được đổ vào bể sao cho ngập bề mặt gel khoảng 2 mm.

Mẫu DNA được chuẩn bị bằng cách trộn 5 μ L DNA với 1 μ L loading dye, sau đó nạp vào các giếng trên gel. Quá trình điện di được tiến hành ở 100V với dòng điện 60–80 mA. Khi vệt màu bromophenol blue di chuyển đến vị trí thích hợp (khoảng 30 phút), quá trình điện di được dừng lại. Để quan sát DNA, gel được nhuộm bằng ethidium bromide (EtBr, 10 μ g/mL) trong 10 phút, sau đó rửa sạch bằng nước. Dưới ánh sáng UV, các đoạn DNA hiện lên dưới dạng các vạch sáng. Hình ảnh điện di được ghi lại bằng hệ thống Bio-Rad sử dụng tia UV có bước sóng 320 nm.

2.2.5. Tinh sạch sản phẩm PCR

Sử dụng bộ kit Gene JET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) để tinh sạch sản phẩm PCR và bảo quản ở -20°C. Sau bước này, sản phẩm được gắn vào vector pJET1.2/blunt (Thermo Scientific), sau đó chuyển vào tế bào *E. coli* DH10B bằng kỹ thuật sốc nhiệt. Các khuẩn lạc sau khi biến nạp được nuôi cấy trên môi trường LB có bổ sung ampicillin. Plasmid được thu nhận bằng bộ kit tách chiết (miniprep) và kiểm tra sự gắn chèn thông qua xử lý với các enzyme cắt giới hạn XhoI và XbaI.

Plasmid mang gen đích tiếp tục được gửi giải trình tự tại cơ sở dịch vụ bằng hệ thống phân tích di truyền ABI PRISM 3100 Avant (Applied Biosystems). Trình tự thu được được xử lý bằng phần mềm BioEdit, sau đó đối chiếu với cơ sở dữ liệu GenBank thông qua công cụ BLASTn (NCBI) nhằm xác định loài vi khuẩn dựa trên mức độ tương đồng trình tự.

Giải trình tự nucleotide được thực hiện trên hệ thống máy giải trình tự tự động tại Viện Sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Sau khi thu nhận, dữ liệu trình tự thô được xử lý và chuẩn hóa bằng phần mềm MEGA X để tính toán hệ số tương đồng và xây dựng cây phát sinh chủng loại (phylogenetic tree). Bên cạnh đó, thuật toán BLAST trên cơ sở dữ liệu NCBI được ứng dụng làm công cụ đối chiếu chủ đạo nhằm xác định mức độ tương đồng di truyền giữa các chủng phân lập với các trình tự mẫu quốc tế.

2.2.6. Xác định các yếu tố đơn lẻ của môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến khả năng sinh NH_4^+ của chủng vi khuẩn

2.2.6.1. Yếu tố môi trường và thời gian nuôi cấy

Ba loại môi trường nuôi cấy được lựa chọn để phân lập và tăng sinh chủng vi khuẩn được lựa chọn lần lượt là môi trường Burk, Nfb và LGI. Chủng vi khuẩn sau khi được phân lập sẽ được cấy vào đĩa thạch đã được khử trùng hấp sấy sau đó cấy chủng vào lần lượt các lọ thủy tinh chứa 3 loại môi trường với mỗi ống có thể tích là 30 ml dịch nuôi. Tiếp đến bọc các ống bằng giấy bạc đã được khử trùng và nuôi cấy ủ lactic ở 30°C trong 48h. Sau đó tiếp giống chủng của từng loại môi trường vào các ba bình tam giác theo tỉ lệ 1:10 và nuôi trong ba môi trường ở nhiệt độ 30°C và đo hoạt tính sinh NH_4^+ của chúng tại các mốc thời gian lần lượt là 12 giờ, 24 giờ, 36 giờ, 48 giờ, 60 giờ và 72 giờ để lựa chọn được mốc thời gian và môi trường nuôi cấy mà ở đó hoạt tính sinh NH_4^+ là cao nhất.

2.2.6.2. Ảnh hưởng của yếu tố nhiệt độ, pH

Sau khi xác định được môi trường cơ bản và thời gian sinh trưởng thích hợp, chủng vi khuẩn tiềm năng được nuôi cấy khảo sát tại 7 mốc pH khác nhau (5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0) kết hợp với các điểm nhiệt độ dao động từ 25°C đến 37°C . Bằng cách theo dõi biến động hàm lượng NH_4^+ tích lũy trong các bình nuôi cấy, nghiên cứu định vị được điểm giao thoa giữa pH và nhiệt độ mà tại đó hoạt tính enzyme nitrogenase đạt hiệu suất cao nhất.

2.2.6.3. Định tính hoạt tính enzyme amylase, protease, cellulase

Khả năng tiết enzyme ngoại bào (amylase, protease và cellulase) của các chủng vi sinh vật được khảo sát bước đầu thông qua phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch được đục lỗ.

Các loại cơ chất được chuẩn bị tương ứng với từng enzyme mục tiêu: đĩa thạch chứa tinh bột dùng để phát hiện amylase, đĩa thạch có bổ sung casein nhằm đánh giá protease, và môi trường chứa carboxymethyl cellulose (CMC) để kiểm tra

hoạt tính cellulase. Sau khi khử trùng, ba loại môi trường cơ chất được đổ vào đĩa petri và để nguội cho đông đặc. Bề mặt thạch sau đó được tạo các giếng nhỏ vô trùng đường kính khoảng 8 mm. Dịch enzyme thô (thu được sau khi ly tâm) được cho vào các giếng với thể tích 100 μL . Các đĩa được ủ ở nhiệt độ thích hợp 37°C trong 48 giờ để enzyme khuếch tán và tác động lên cơ chất. Sau thời gian ủ, sự phân giải cơ chất được quan sát thông qua vùng trong hoặc vùng biến đổi màu xung quanh giếng: Với amylase, sau thời gian ủ phủ Lugol chứa iod lên bề mặt thạch, khu vực không xuất hiện màu xanh tím cho thấy tinh bột đã bị thủy phân. Với protease, sự xuất hiện vòng sáng quanh giếng trên môi trường chứa casein phản ánh quá trình phân giải protein. Với cellulase, đĩa thạch được nhuộm bằng Congo red rồi rửa bằng dung dịch NaCl; vùng mất màu biểu thị cellulose đã bị phân hủy.

2.2.7. Định lượng yếu tố sinh trưởng IAA

Khả năng sản sinh indole-3-acetic acid (IAA) của các dòng vi khuẩn được định lượng thông qua phép đo màu dựa trên nguyên lý của Gordon và Weber (1951). Quy trình bao gồm việc thiết lập hệ số tương quan từ đường chuẩn IAA gốc và nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường có sự diện của tryptophan. Sau thời gian ủ, dịch chiết nuôi cấy được cho phản ứng với thuốc thử (thường là Salkowski) để tạo phức màu hồng đặc trưng. Cường độ hấp thụ quang học của hỗn hợp phản ứng là chỉ số trực tiếp phản ánh hiệu suất tổng hợp IAA, giúp sàng lọc các chủng có tiềm năng thúc đẩy tăng trưởng thực vật mạnh mẽ [64] khả năng sản xuất IAA của vi khuẩn được đánh giá thông qua quy trình nuôi cấy hai giai đoạn.

Ở giai đoạn thứ nhất, các chủng vi khuẩn được hoạt hóa trong môi trường LGI lỏng chứa trong ống penicillin và nuôi ở 35°C trong 24 giờ để thu nhận dịch giống.

Ở giai đoạn thứ hai, dịch giống được cấy chuyển vào các bình tam giác chứa môi trường LGI không bổ sung nguồn nitơ và được bổ sung L-tryptophan ở các nồng độ khác nhau gồm 0, 100, 200, 500 và 700 mg/L. Các bình được nuôi lắc ở 35°C trong 24 giờ nhằm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ tiền chất tryptophan đến khả năng sinh tổng hợp axit indole-3-acetic (IAA) của các chủng vi khuẩn.

Sau thời gian nuôi cấy, lấy 5 mL dịch nuôi cấy và ly tâm ở 8.000 vòng/phút trong 5 phút để loại bỏ sinh khối tế bào. Phần dịch nổi không chứa tế bào được sử dụng để định lượng IAA. Cụ thể, lấy 1 mL dịch nổi cho phản ứng với thuốc thử Fe-HClO₄ theo tỷ lệ 1:2 hoặc với thuốc thử Fe-H₂SO₄ theo tỷ lệ 1:4.

Để xây dựng đường chuẩn, dung dịch IAA gốc có nồng độ 100 mg/L được pha loãng thành dãy chuẩn từ 0 đến 5 mg/L. Sau khi trộn với thuốc thử, các mẫu được ủ trong tối khoảng 15 phút. Sự xuất hiện màu hồng chứng tỏ có sự hiện diện của IAA trong

mẫu. Cường độ màu được xác định bằng cách đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 530 nm bằng máy quang phổ. Hàm lượng IAA tích lũy trong dịch nuôi cấy được xác định dựa trên đường chuẩn IAA. Kết quả thu được cho phép đánh giá ảnh hưởng của các nồng độ tryptophan khác nhau và xác định nồng độ tryptophan tối ưu cho quá trình sinh tổng hợp IAA của từng chủng vi khuẩn [65].

2.2.8. Đánh giá mức độ biểu hiện gen sinh NH_4^+ của chủng vi khuẩn

Nghiên cứu sử dụng kỹ thuật RT-PCR để khảo sát sự biến thiên trong biểu hiện gen của vi khuẩn phục vụ mục tiêu cố định đạm. Quá trình bắt đầu với việc thu hồi tế bào vi khuẩn từ môi trường lỏng bằng ly tâm sơ cấp. Tiếp đến, RNA tổng số được chiết tách cẩn thận nhằm phản ánh chính xác trạng thái phiên mã tại thời điểm khảo sát. Các phân tử RNA này sau đó được chuyển đổi thành DNA bổ sung (cDNA) trước khi đưa vào phản ứng PCR định lượng. Phương pháp này cho phép nhận diện mức độ hoạt động của các cụm gen chức năng (như hệ gen *nif*) trong việc chuyển hóa nitơ tự do thành NH_4^+ .

Quy trình tách chiết RNA tổng số được thực hiện bằng bộ kit PHUSA Total RNA Extraction (Phù Sa Genomics, Việt Nam) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đầu tiên, 1 mL dịch nuôi cấy vi khuẩn được thu hoạch bằng cách ly tâm ở tốc độ 12.500 vòng/phút trong 5 phút. Tế bào sau đó được huyền phù trong 500 μL dung dịch ly giải PSAR1 và ủ tại nhiệt độ phòng trong 10 phút để phá vỡ màng tế bào. Sau khi bổ sung các tác nhân kết tủa protein (PSAR2 và PSAR3), hỗn hợp được ly tâm để phân tách pha. Phần dịch nổi chứa RNA (400 μL) được thu hồi cẩn thận và tiến hành kết tủa bằng dung dịch PSAR4. Khối kết tủa RNA sau đó được làm sạch bằng dung dịch rửa PSAR5 trước khi hòa tan hoàn toàn trong 50 μL dung dịch đệm PSAR6. Cuối cùng, độ tinh sạch và hàm lượng RNA được đánh giá thông qua chỉ số (A260/A280) và kỹ thuật điện di trên gel agarose [66]. Hàm lượng cDNA được tổng hợp từ 5 μL RNA tổng số thông qua hệ phản ứng phiên mã ngược tiêu chuẩn. Thành phần chi tiết cho mỗi phản ứng 20 μL bao gồm: 4 μL đệm GoScript™ 5X, 1,2 μL MgCl_2 (25 mM), 0,5 μL hỗn hợp nucleoside triphosphate (dNTPs 10 mM) và 1 μL mồi Hexamer (50 mM). Hoạt tính xúc tác được đảm bảo bởi 1 μL enzyme GoScript™ Reverse Transcriptase. Toàn bộ quá trình pha chế được thực hiện trong điều kiện vô trùng với nước không chứa DNase/RNase, tạo môi trường tối ưu cho việc chuyển đổi RNA thành cDNA phục vụ cho các phân tích định lượng gen sau này. Cài đặt chu kỳ nhiệt trên máy PCR 42°C/60 phút, bất hoạt enzyme ở 75°C/10 phút. Cuối cùng tiến hành phân tích biểu hiện gen, gen mã hóa enzyme glutamine synthetase liên quan đến quá trình đồng hóa NH_4^+ , bằng phương pháp PCR với cDNA và kiểm tra trên gel

agarose 0.8%. Hai cặp mồi được sử dụng để phân tích biểu hiện gen có trình tự đặc hiệu cho phản ứng lần lượt là: Cặp mồi 1: nifH-F (5'-cagaagatcctgattgtaggg-3') và nifH-R (5'-gttgccgcgtacatggccatc-3'). Cặp mồi 2: nifA-F (5'-cgcaccgctcctcgcgctcg-3') và nifA-R (5'-atgccgaattcccatgcaagc-3'). Quy trình nhiệt được set 35 chu kì với nhiệt độ gắn mồi là 55°C. Sau khi hoàn thành sản phẩm sẽ được tiến hành điện di trên gel agarose 0,8% để đánh giá mức độ biểu hiện gen.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập các chủng vi khuẩn từ các mẫu đất và rễ lúa ở Cần Thơ

3.1.1. Tạo bộ sưu tập chủng vi khuẩn từ các mẫu đất và rễ lúa ở Cần Thơ

Tổng 38 chủng vi khuẩn đã được phân lập từ mẫu đất và rễ lúa được thu thập từ nhiều địa điểm khác nhau trên ruộng lúa tại khu vực ruộng lúa thuộc vùng ven thành phố Cần Thơ. Các mẫu được lựa chọn nhằm đảm bảo sự đa dạng về nguồn gốc và điều kiện sinh trưởng tự nhiên tại các vị trí khác nhau trên ruộng lúa từ đó tăng khả năng phát hiện các chủng vi khuẩn có đặc tính hữu ích.

Sau khi thu thập, các mẫu đất lúa được hòa và nuôi tăng sinh trong môi trường LGI lỏng. Trải qua 24 giờ tăng sinh, dịch môi trường được pha loãng theo hệ số thích hợp và được trải đều trên mặt đĩa thạch chứa môi trường LGI agar và môi trường PDA agar. Ủ mẫu trong tủ âm 32°C trong 4 ngày, các khuẩn lạc được làm thuần và kiểm tra hình thái chung. Kết quả cho thấy các khuẩn lạc thu được có hình dạng hình tròn, bề mặt lồi, trơn nhẵn và có độ bóng nhất định. Thông tin chi tiết về kết quả này được thể hiện trong Bảng 3.1.

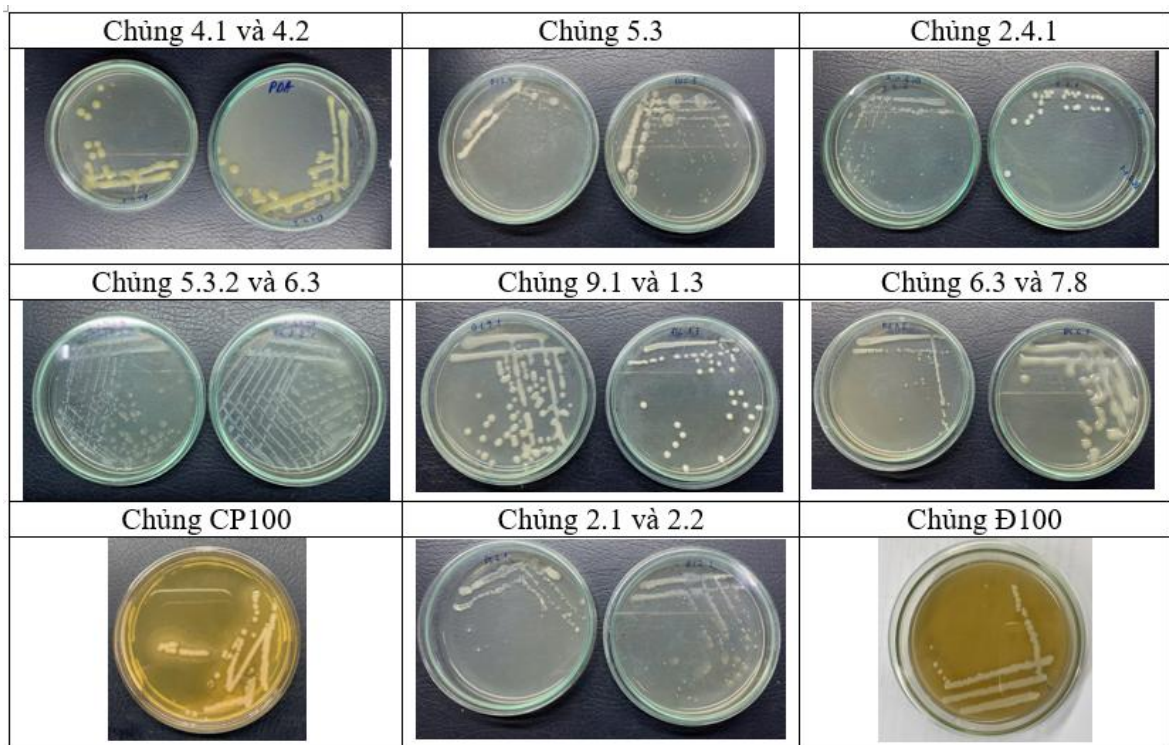
Bảng 3.1. Hình thái khuẩn sau quá trình phân lập tại các môi trường khác nhau.

Mẫu	Kí hiệu (chủng phân lập)	PDA <i>agar</i>	LGI <i>agar</i>	Hình thái khuẩn lạc của chủng
ĐL1	1.1	+	-	Tròn, trắng ngà, bóng, lồi, trơn bóng
	1.2	+	-	Tròn, trắng sữa, bóng, lồi, trơn láng
	1.3	+	-	Tròn, trắng sữa, bóng, trơn bóng
	1.4 (10 ⁻⁷)	-	+	Tròn, trắng đục, bóng, lồi, trơn bóng
	1.5(10 ⁻⁹)	-	+	Tròn, trắng sữa, bóng, trơn láng
ĐL2	2.1	+	-	Tròn, trắng sữa, bóng, trơn láng
	2.2	+	-	Tròn, trắng sữa, lồi, trơn bóng
	2.3	+	-	Tròn, nhẵn, trắng sữa, bìa nguyên
	2.4	+	-	Tròn, bóng, trơn láng có màng bọc
	3.1	+	-	Tròn, bóng, trắng sữa, bóng
	3.2	+	-	Tròn, trắng ngà, bóng, trơn bóng
	3.3	+	-	Tròn, trắng sữa, bóng, lồi, trơn láng

ĐL3	3.4 (10^{-7})	-	+	Tròn, trắng sữa, bóng, lồi tron bóng
	3.5 (10^{-7})	-	+	Tròn, trắng đục, bóng, lồi tron bóng
ĐL4	4.1	+	-	Tròn, trắng sữa, bóng, phẳng tron
	4.2	+	-	Tròn, trắng sữa, bóng, tron láng
ĐL5	5.1	+	-	Tròn, trắng sữa, lồi, tron bóng
	5.2	+	-	Tròn, nhẵn, trắng sữa, bìa nguyên
	5.3	+	-	Tròn, bóng, trắng sữa, tron láng
	5.4 (10^{-8})	-	+	Tròn, bóng, trắng sữa, bóng
ĐL6	6.1	+	-	Tròn, trắng ngà, bóng, lồi, tron bóng
	6.2	+	-	Tròn, trắng sữa, bóng, lồi, tron láng
	6.3	+	-	Tròn, trắng sữa, bóng, lồi tron bóng
	6.4	+	-	Tròn, trắng đục, bóng, lồi, tron bóng
	6.5 (10^{-7})	-	+	Tròn, trắng sữa, bóng, tron láng
ĐL7	7.1	+	-	Tròn, trắng sữa, phẳng, tron láng
	7.2	+	-	Tròn, trắng sữa, lồi, tron bóng
	7.3	+	-	Tròn, nhẵn, trắng sữa, bìa nguyên
	7.4	+	-	Tròn, bóng, có màng bao bọc
ĐL8	8.1	+	+	Tròn, bóng, trắng sữa, bóng
	8.2 (10^{-9})	+	+	Tròn, trắng ngà, bóng, lồi tron bóng
ĐL9	9.1	+	-	Tròn, trắng sữa, bóng, lồi, tron láng
	9.2	+	-	Tròn, trắng sữa, bóng, lồi, tron bóng
	9.3	+	-	Tròn, trắng đục, bóng, lồi, tron bóng
	9.4	+	-	Tròn, trắng sữa, bóng, tron láng
	9.5	+	-	Tròn, trắng sữa, bóng, tron láng
ĐL10	CP100	+	+	Tròn, trắng sữa, lồi, tron bóng
	Đ100	+	+	Tròn, nhẵn, trắng sữa, bìa nguyên

ĐL: mẫu đất lúa

Quá trình làm thuần chủng được thực hiện nghiêm ngặt trên môi trường LGI thạch bằng phương pháp cấy vạch để thu được các dòng thuần chủng. Kỹ thuật này đóng vai trò then chốt trong việc tách biệt các vi khuẩn mục tiêu khỏi quần thể tạp nhiễm, tạo tiền đề vững chắc cho các thử nghiệm sinh hóa và di truyền. Riêng trường hợp chủng 2.4 do có hình thái khuẩn lạc chưa biệt hóa rõ ràng, một chu kỳ nuôi cấy lặp lại đã được triển khai để xác định chính xác kiểu hình. Dựa trên kết quả khảo sát hình thái chi tiết của 38 chủng, chúng tôi đã sàng lọc ra 14 chủng đại diện mang các đặc trưng kiểu hình ưu tú nhất để đưa vào nội dung thực nghiệm tiếp theo (Hình 3.1).



Hình 3.1: Hình ảnh khuẩn lạc được chọn sau phân lập trên đĩa LGI thạch

Các chủng thuần được kiểm tra dựa trên nhiều tiêu chí khác nhau để xác định chính xác đặc điểm sinh học và phân loại chúng. Trước tiên, đặc điểm hình thái khuẩn lạc được quan sát trên môi trường thạch LGI để xác định các yếu tố như hình dạng, kích thước, màu sắc và bề mặt khuẩn lạc.

3.1.2. Đánh giá khả năng sinh NH_4^+ của 14 chủng vi khuẩn

Sau khi phân lập, 38 chủng vi khuẩn được kiểm tra khả năng sinh NH_4^+ . NH_4Cl pha loãng về nồng độ 0.1mg/L với dải nồng độ thu được từ 0.001-0.04 (mg N/L) để xây dựng đường chuẩn có phương trình: $y = 95.704x - 0.0461$ có giá trị $R^2 = 0.9985$. Sau 24 giờ nuôi cấy lắc ở môi trường LGI lỏng ở nhiệt độ 35°C, hàm lượng sinh NH_4^+ của các chủng vi khuẩn dựa trên đường chuẩn được trình bày chi tiết dưới bảng sau (Bảng 3.2).

Bảng 3.2. Đánh giá khả năng sinh NH_4^+ của chủng vi khuẩn đã phân lập

Chủng	Nồng độ OD	Hàm lượng sinh NH_4^+
7.8.2	0.12	0.174
2.1.2	0.187	0.244
2.4.2	0.023	0.072
4.1	0.01	0.059
7.8.1	0.247	0.306
6.3	0.161	0.216
9.1	0.048	0.098
5.3.2	0.113	0.166
2.1.1	0.158	0.213
5.1.3	0.005	0.043
1.3	0.097	0.331
2.4.1	0.414	0.481
CP100	0.409	0.476
Đ100	0.360	0.424

Việc định lượng nồng độ NH_4^+ giải phóng từ các chủng vi sinh vật nhằm sàng lọc những dòng có hiệu suất cố định đạm tối ưu. Kết quả thực nghiệm này đóng vai trò là cơ sở khoa học cốt lõi cho lộ trình phát triển các chế phẩm phân bón hữu cơ vi sinh có tính ứng dụng cao và bền vững với môi trường. Qua phân tích, các chủng 2.4.1, 1.3, CP100 và Đ100 có tổng hợp NH_4^+ vượt trội, nổi bật hoàn toàn trong quần thể 14 chủng tiêu biểu và 38 chủng được phân lập ban đầu.

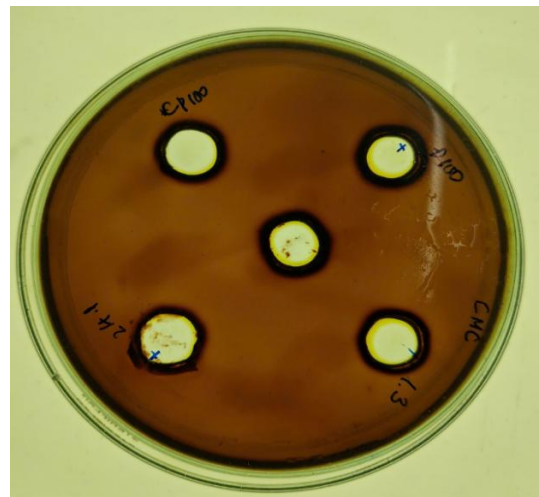
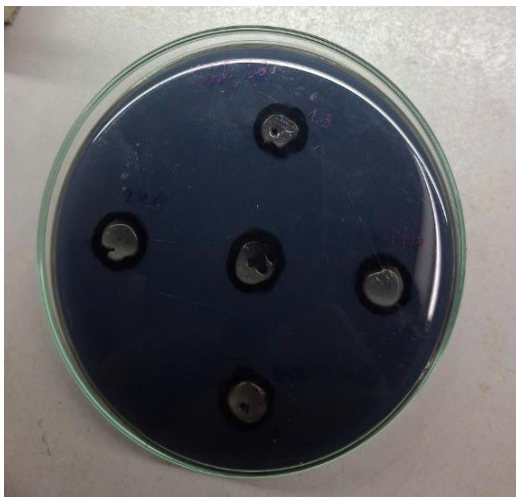
3.1.3. Đánh giá khả năng sản sinh enzyme của chủng vi khuẩn

Phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch đã được áp dụng để khảo sát hoạt tính enzyme ngoại bào của các dòng vi khuẩn tiềm năng. Bốn chủng có khả năng sinh NH_4^+ cao (2.4.1, 1.3, CP100 và Đ100) được cấy vào các lỗ thạch trên môi trường chứa cơ chất tương ứng. Hiệu suất phân giải được xác định chính xác thông qua việc quan sát và đo đạc các quang sáng phân giải xuất hiện xung quanh vị trí nạp mẫu sau thời gian ủ tối ưu.



Hình 3.2: Khả năng sinh protease của các chủng vi khuẩn phân lập

Khả năng sinh protease ngoại bào của chủng *Bacillus* phân lập được xác định rõ nét qua hiện tượng xuất hiện vòng sáng bao quanh vị trí giếng trên môi trường chuyên biệt (Hình 3.2) sau 12 giờ ủ ở 37°C trên đĩa sữa gầy. Kết quả này chỉ ra rằng chủng vi khuẩn có khả năng tham gia tích cực vào quá trình phân hủy xác bã hữu cơ giàu protein trong đất lúa. Bằng cách can thiệp vào chu trình nitơ sinh học, chủng *Bacillus* giúp duy trì nguồn cung amoni ổn định, hỗ trợ quá trình dinh dưỡng khoáng của cây trồng một cách bền vững và an toàn.



Hình 3.3: Khả năng phân giải tinh bột và cellulose của các chủng vi khuẩn phân lập

Đối với các cơ chất là tinh bột và CMC, các chủng vi khuẩn phân lập không thể hiện khả năng phân giải đặc trưng sau chu kỳ nuôi cấy 12 giờ (Hình 3.2). Việc không xuất hiện các quang sáng trong suốt xung quanh khuẩn lạc minh chứng cho sự thiếu hụt các hệ enzyme ngoại bào tương ứng là amylase và cellulase. Điều này chỉ

ra tính biệt hóa trong hoạt tính sinh hóa của chúng, khi chúng tập trung vào khả năng cố định đạm và phân giải protein hơn là chuyển hóa các nguồn carbon phức tạp này.

3.1.4. Định danh các chủng có hoạt tính sinh NH_4^+

Việc sử dụng gen 16S rRNA trong định danh vi khuẩn được lựa chọn vì đây là một chỉ thị di truyền có khả năng phản ánh quan hệ tiến hóa giữa các chủng một cách đáng tin cậy. Gen này tồn tại ổn định trong toàn bộ giới vi khuẩn do liên quan trực tiếp đến cấu trúc và chức năng của ribosome - một thành phần không thể thiếu trong tế bào.

Điểm đáng chú ý là trình tự của gen không hoàn toàn đồng nhất mà được cấu trúc bởi các đoạn có mức độ biến đổi khác nhau. Sự xen kẽ giữa vùng ổn định và vùng biến thiên tạo điều kiện vừa để so sánh ở phạm vi rộng, vừa đủ độ phân giải để nhận diện sự khác biệt giữa các nhóm gần nhau.

Dựa trên nền tảng dữ liệu gen đồ sộ hiện nay, việc xác định vị trí phân loại của các chủng vi khuẩn bằng trình tự 16S rRNA mang lại độ tin cậy vượt trội. Phương pháp đối chiếu mức độ tương đồng trình tự nucleotide cho phép nhận diện chủng ở cấp độ phân tử, loại bỏ các rào cản về tính biến dị của đặc điểm sinh hóa dưới tác động của môi trường. Đây là công cụ hữu hiệu để tối ưu hóa quy trình phân loại, đảm bảo tính đồng nhất và khả năng tái lập của các kết quả nghiên cứu.

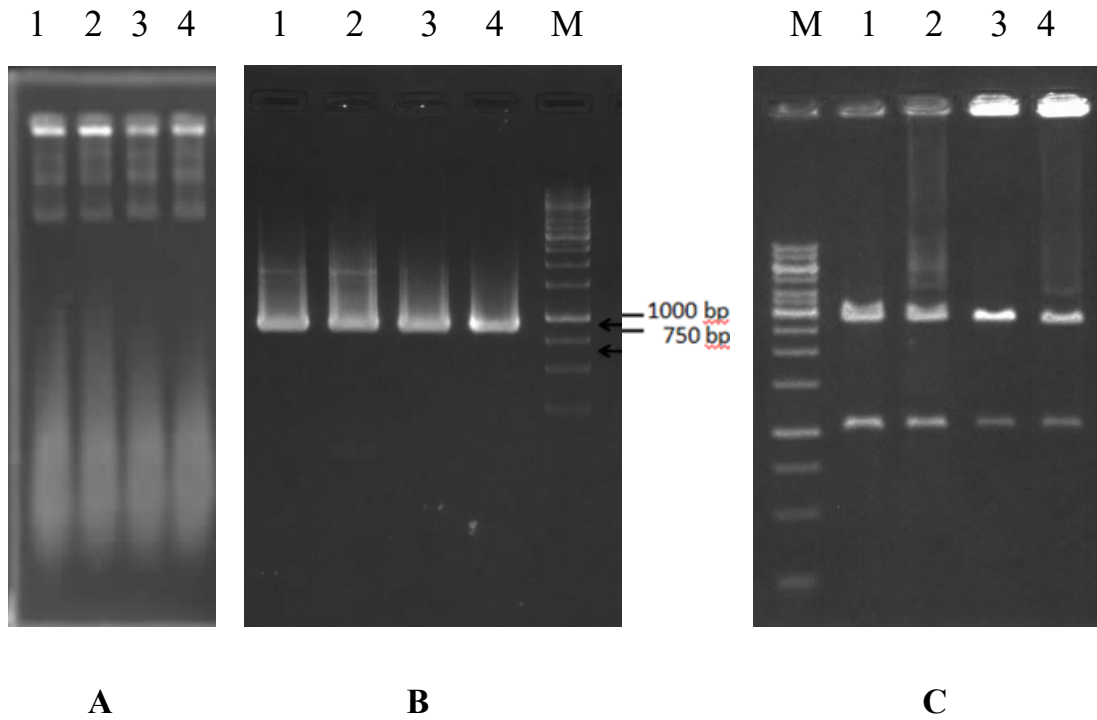
Với những đặc điểm trên, phân tích 16S rRNA trở thành một lựa chọn phù hợp trong định danh vi khuẩn, đặc biệt trong các nghiên cứu yêu cầu độ chính xác cao và khả năng so sánh với dữ liệu đã công bố.

Sau khi đánh giá sơ bộ về hình thái và định lượng năng lực tổng hợp amoni, các chủng vi khuẩn sở hữu hoạt tính vượt trội đã được lựa chọn để tiến hành định danh phân tử. Việc khai thác trình tự gen 16S rRNA là một vùng gen bảo thủ và có tính đặc trưng loài cao đã giúp xác định chính xác danh tính của chúng.

Thông qua quá trình kiểm tra chất lượng bằng điện di gel agarose nồng độ 0,8%, mẫu DNA thu được cho thấy các băng vạch sắc nét chứng tỏ độ sạch cao. Phản ứng PCR mục tiêu, sử dụng tổ hợp mồi 9F/926R, đã khuếch đại thành công vùng gen mong muốn. Sự hiện diện của sản phẩm PCR với kích thước ước tính 917 bp trên bản gel là minh chứng cho tính đặc hiệu của phản ứng, tạo tiền đề cho quy trình giải trình tự và định danh phân tử.

Kết quả phân tích plasmid tái tổ hợp bằng phương pháp cắt giới hạn với *XhoI* và *XbaI* cho thấy các dòng vi khuẩn biến nạp đều mang đoạn gen mục tiêu. Kích thước các đoạn DNA sau khi cắt hoàn toàn phù hợp với dự đoán lý thuyết, bao gồm khung vector pJET1.2 (3000 bp) và đoạn chèn 16S rRNA (917 bp). Sự tương thích

về kích thước và độ sắc nét của các băng điện di cho thấy quá trình gắn chèn đạt hiệu quả cao, đảm bảo độ tin cậy cho việc lưu giữ và nhân bản trình tự gen của các chủng nghiên cứu.



Hình 3.4: Điện di đồ phân tích DNA tổng số của chủng phân lập (A); Sản phẩm PCR của gen 16S rRNA (C); 1, 2, 3, 4: chủng 2.4.1, 1.3, CP100, Đ100: M: Marker.

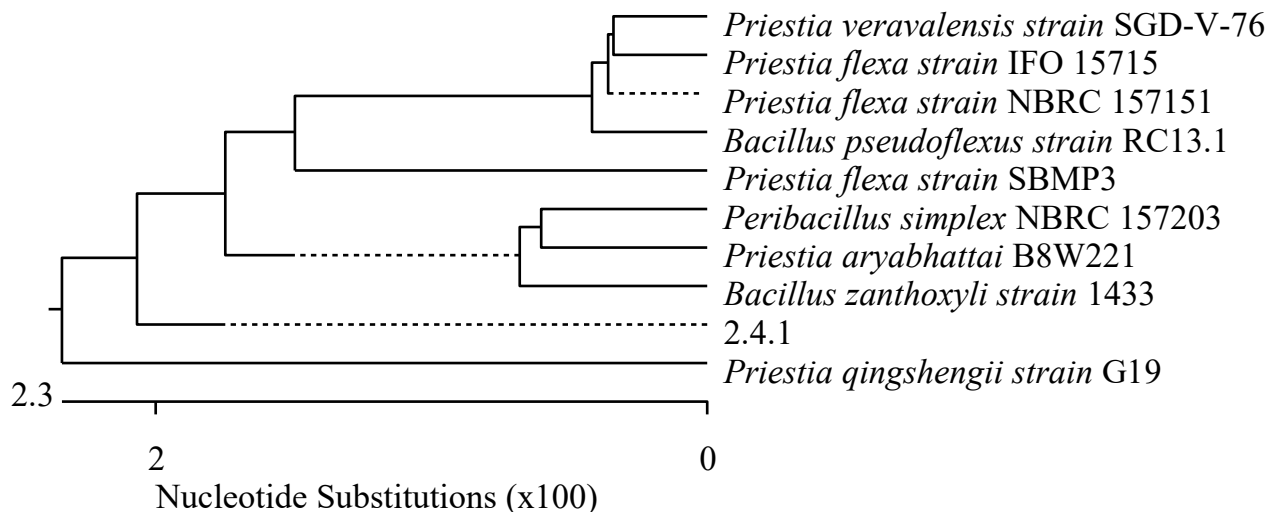
Trình tự nucleotide vùng gen 16S rRNA của các chủng 2.4.1, 1.3, CP100 và Đ100 đã được tiến hành so sánh với kho dữ liệu di truyền toàn cầu thông qua công cụ BLAST (NCBI). Kết quả phân tích cho thấy sự tương thích di truyền đặc biệt cao ở chủng 2.4.1, với mức độ tương đồng vượt ngưỡng 97% khi so sánh với các trình tự chuẩn của loài *Bacillus zanthoxyli*. Các mã số truy cập tham chiếu trên GenBank bao gồm: NR_164882.1, NR_115953.1, NR_133978.1, NR_118382.1, NR_113800.1, NR_024691.1, NR_115603.1, NR_178610.1, NR_178383.1 và NR_118442.1. Chỉ số này khẳng định vị trí phân loại của chủng 2.4.1 thuộc chi *Bacillus* và có quan hệ họ hàng rất gần với loài *B. zanthoxyli* (Bảng 3.3)

Bảng 3.3. Mức độ tương đồng của của đoạn gen 16S rRNA từ chủng 2.4.1 so với các chủng trên GenBank

STT	Các loài vi khuẩn từ ngân hàng dữ liệu gene của NCBI	Mã số ngân hàng gene	Mức độ tương đồng (%)
1	<i>Bacillus zanthoxyli</i> strain 1433	NR_164882.1	99,63
2	<i>Priestia aryabhatai</i> B8W22	NR_115953.1	99,63

3	<i>Priestia qingshengii</i> strain G19	NR_133978.1	99,02
4	<i>Priestia flexa</i> strain SBMP3	NR_118382.1	98,66
5	<i>Priestia flexa</i> strain NBRC 15715	NR_113800.1	98,29
6	<i>Priestia flexa</i> strain IFO 15715	NR_024691.1	98,29
7	<i>Peribacillus simplex</i> NBRC 15720	NR_115603.1	98,39
8	<i>Priestia veravalensis</i> strain SGD-V-76	NR_178610.1	97,92
9	<i>Bacillus pseudoflexus</i> strain RC1	NR_178383.1	97,92
10	<i>Priestia aryabhatai</i> B8W22	NR_118442.1	99,61

Từ kết quả trên ta thấy chủng 2.4.1 có độ tương đồng 99% với *Bacillus zanthoxyli* strain 1433; *Priestia aryabhatai* B8W22; *Priestia qingshengii* strain G19; và tương đồng 98% so với các chủng *Priestia flexa* strain SBMP3; *Priestia flexa* strain NBRC 15715; *Peribacillus simplex* NBRC 15720; *Priestia flexa* strain IFO 15715; *Priestia veravalensis* strain SGD-V-76; *Bacillus pseudoflexus* strain RC1. Do vậy, chủng 2.4.1 là chủng thuộc loài *Bacillus zanthoxyli* và được đặt tên là *Bacillus zanthoxyli* 2.4.1.



Hình 3.5: Cây phát sinh chủng loài của chủng vi khuẩn 2.4.1 và các chủng tham chiếu từ ngân hàng gen.

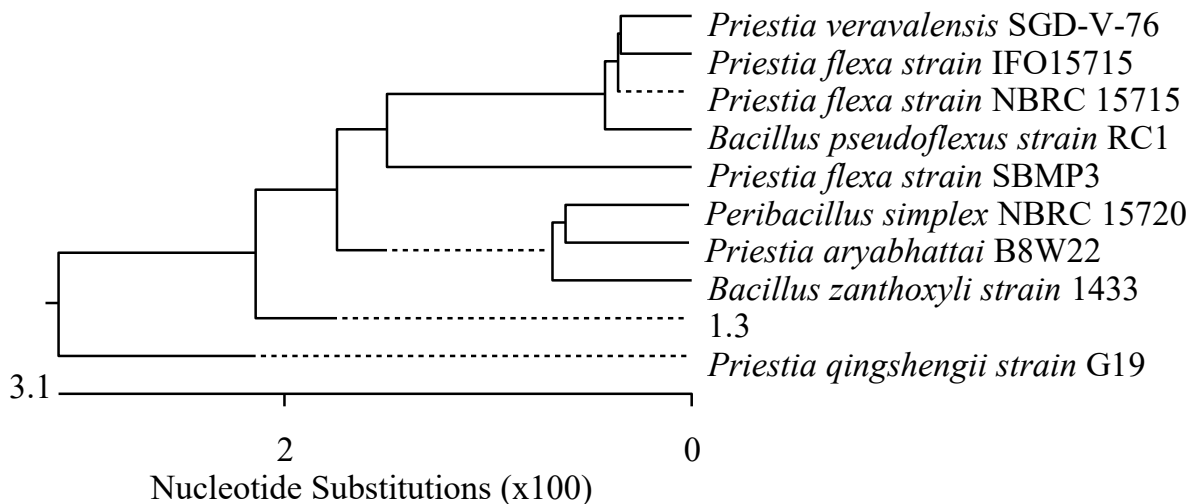
Kết quả phân tích trình tự gen 16S rRNA của chủng 1.3 thông qua công cụ so sánh BLAST đã xác lập mối quan hệ di truyền mật thiết với các đại diện thuộc chi *Bacillus*. Đặc biệt, trình tự nucleotide của chủng nghiên cứu bộc lộ mức độ đồng nhất vượt ngưỡng 99% khi so sánh với các trình tự chuẩn của loài *Bacillus zanthoxyli* trên hệ thống GenBank (điển hình là các mã số truy cập: NR_164882.1, NR_115953.1, NR_133978.1, NR_118382.1, NR_113800.1, NR_024691.1, NR_178610.1,

NR_115603.1, NR_178383.1 và NR_118442.1). Chỉ số tương đồng xấp xỉ tuyệt đối này cho phép khẳng định chủng 1.3 là một đại diện tiêu biểu của loài *B. zanthoxyli* (Bảng 3.4).

Bảng 3.4. Mức độ tương đồng của của đoạn gen 16S rRNA từ chủng 1.3 so với các chủng trên GenBank

STT	Các loài vi khuẩn từ ngân hàng dữ liệu gene của NCBI	Mã số ngân hàng gene	Mức độ tương đồng (%)
1	<i>Bacillus zanthoxyli</i> strain 1433	NR_164882.1	99,44
2	<i>Priestia aryabhatai</i> B8W22	NR_115953.1	99,44
3	<i>Priestia qingshengii</i> strain G19	NR_133978.1	98,88
4	<i>Priestia flexa</i> strain SBMP3	NR_118382.1	98,33
5	<i>Priestia flexa</i> strain NBRC 15715	NR_113800.1	97,91
6	<i>Priestia flexa</i> strain IFO15715	NR_024691.1	97,91
7	<i>Priestia veravalensis</i> SGD-V-76	NR_178610.1	97,63
8	<i>Peribacillus simplex</i> NBRC 15720	NR_115603.1	97,49
9	<i>Bacillus pseudoflexus</i> strain RC1	NR_178383.1	97,49
10	<i>Priestia aryabhatai</i> B8W22	NR_118442.1	99,40

Kết quả ở Bảng 3.4 cho thấy chủng 1.3 có mức độ tương đồng 99% với *Bacillus zanthoxyli* 1433; *Priestia aryabhatai* B8W22; *Priestia qingshengii* strain G19; và tương đồng 98% so với các chủng *Priestia flexa* strain SBMP3; *Priestia flexa* strain NBRC 15715; *Peribacillus simplex* NBRC 15720; *Priestia flexa* strain IFO 15715; *Priestia veravalensis* strain SGD-V-76; *Bacillus pseudoflexus* strain RC1. Do vậy, chủng 1.3 có thể là một chủng thuộc loài *Priestia aryabhatai* 1.3.

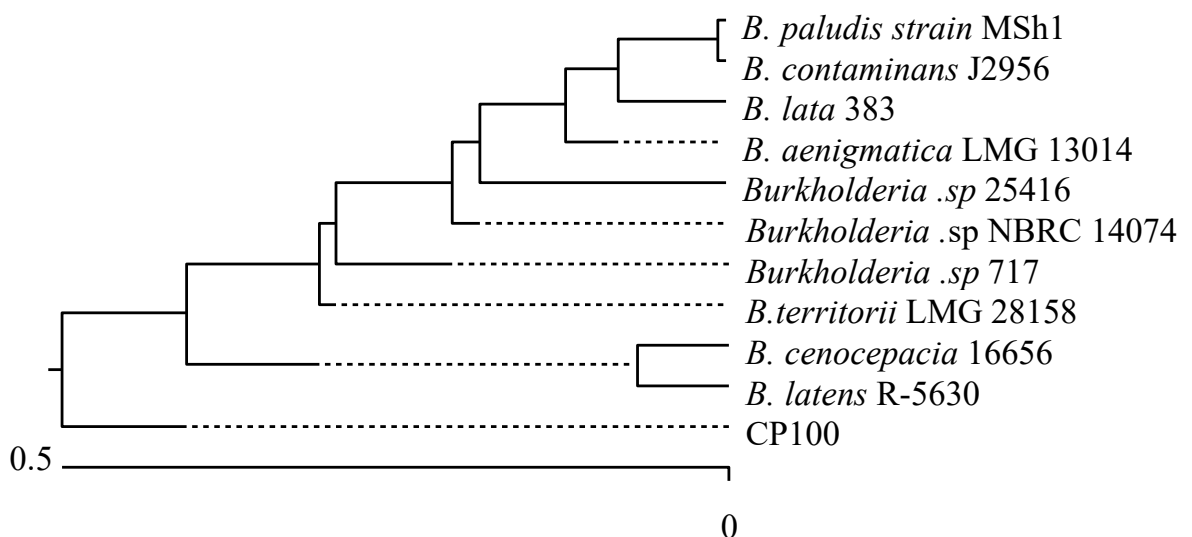


Hình 3.6: Cây phát sinh chủng loài của chủng vi khuẩn 1.3 và các chủng tham chiếu từ ngân hàng gen

Trình tự nucleotide vùng gen 16S rRNA của chủng CP100 đã được tiến hành đối soát với kho dữ liệu di truyền quốc tế thông qua công cụ BLAST (NCBI). Kết quả phân tích ghi nhận mức độ đồng nhất vượt ngưỡng 99% khi so sánh với các trình tự chuẩn của chi *Burkholderia sp.* hiện có trên GenBank. Các mã số truy cập tham chiếu điển hình bao gồm: NR_029209.1, NR_042632.1, NR_136496.1, NR_174230.1, NR_178850.1, NR_102890.1, NR_104978.1, NR_113645.1, NR_114491.1 và NR_025013.1. Các thông số chi tiết về độ tương đồng được tổng hợp cụ thể tại Bảng 3.5

Bảng 3.5. Mức độ tương đồng của của đoạn gen 16S rRNA từ chủng CP100 so với các chủng trên GenBank

STT	Các vi khuẩn từ cơ sở dữ liệu gene NCBI	Mã số ngân hàng gene	Mức độ tương đồng (%)
1	<i>Burkholderia .sp</i> 717	NR_029209.1	99,73
2	<i>B. latens</i> R-5630	NR_042632.1	99,59
3	<i>B.territorii</i> LMG 28158	NR_136496.1	99,46
4	<i>B. aenigmatica</i> LMG 13014	NR_174230.1	99,46
5	<i>B. paludis strain</i> MSh1	NR_178850.1	99,46
6	<i>B. lata</i> 383	NR_102890.1	99,46
7	<i>B. contaminans</i> J2956	NR_104978.1	99,46
8	<i>Burkholderia .sp</i> NBRC 14074	NR_113645.1	99,32
9	<i>Burkholderia .sp</i> 25416	NR_114491.1	99,46
10	<i>B. cenocepacia</i> 16656	NR_025013.1	99,32



Hình 3.7: Cây phát sinh chủng loài của chủng vi khuẩn CP100 và các chủng tham chiếu từ ngân hàng gen

Từ kết quả trên ta thấy chủng CP100 có độ tương đồng trên 99,6% với *Burkholderia .sp*717; *B. latens* R-5630; và tương đồng 99.46% với *B. territorii* LMG 28158; *B. aenigmatica* LMG 13014; *B. paludis strain* MSh1; *Burkholderia lata* 383; *B. contaminans* J2956; *Burkholderia .sp* 25416; tương đồng 99.32% với chủng *B. cenocepacia* LMG 16656 và chủng *Burkholderia .sp* NBRC 14074. Do vậy có thể đây là một chủng thuộc loài *Burkholderia sp.* Chủng CP100 Được đặt tên là *Burkholderia sp.* CP100.

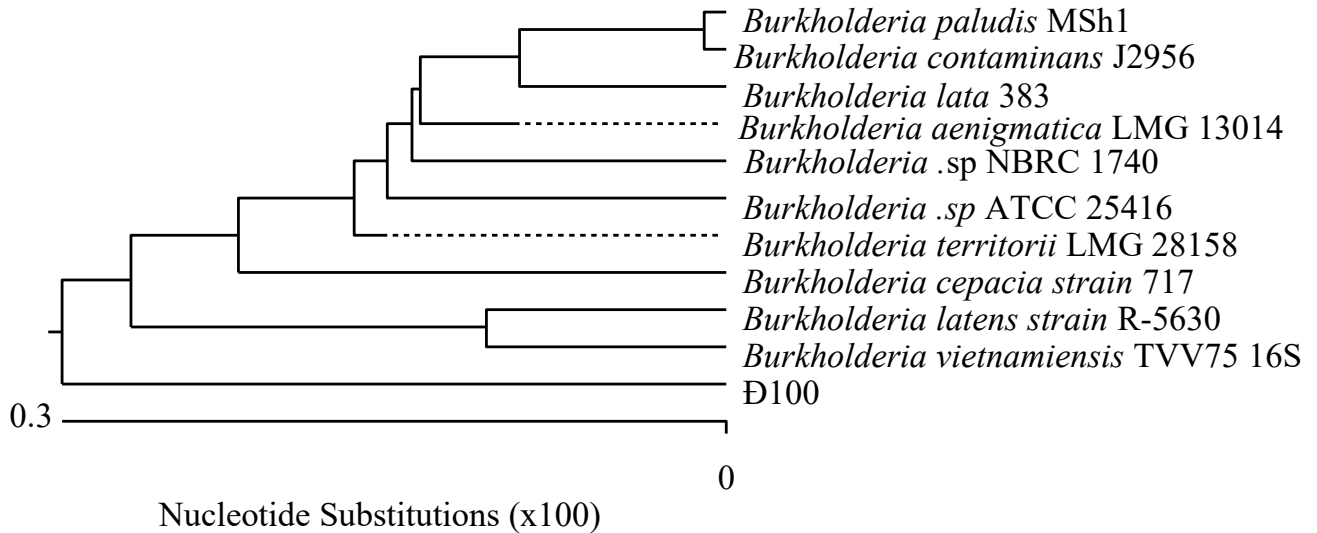
Kết quả so sánh trình tự nucleotide vùng gen 16S rRNA của chủng Đ100 với cơ sở dữ liệu quốc tế thông qua công cụ BLAST đã xác lập mối quan hệ di truyền mật thiết với chi *Burkholderia*. Hình ảnh phân tích (Hình 3.4) cho thấy chủng Đ100 bộc lộ mức độ đồng nhất vượt ngưỡng 99% khi so sánh với các trình tự chuẩn trên GenBank, điển hình là các mã số truy cập: NR_029209.1, NR_042632.1, NR_136496.1, NR_174230.1, NR_178850.1, NR_102890.1, NR_104978.1, NR_113645.1, NR_114491.1 và NR_118872.1. Chỉ số tương đồng xấp xỉ tuyệt đối này khẳng định vị trí phân loại của chủng Đ100 thuộc nhóm vi khuẩn cố định đạm tiềm năng.

Bảng 3.6. Mức độ tương đồng của của đoạn gen 16S rRNA từ chủng Đ100 so với các chủng trên GenBank

ST T	Các vi khuẩn từ cơ sở dữ liệu gene NCBI	Mã số ngân hàng gene	Mức độ tương đồng (%)
1	<i>Burkholderia cepacia strain</i> 717	NR_029209.1	99,76
2	<i>Burkholderia latens strain</i> R-5630	NR_042632.1	99,63
3	<i>Burkholderia territorii</i> LMG 28158	NR_136496.1	99,51
4	<i>Burkholderia aenigmatica</i> LMG 13014	NR_174230.1	99,51
5	<i>Burkholderia paludis</i> MSh1	NR_178850.1	99,51
6	<i>Burkholderia lata</i> 383	NR_102890.1	99,51
7	<i>Burkholderia contaminans</i> J2956	NR_104978.1	99,51
8	<i>Burkholderia .sp</i> NBRC 14074	NR_113645.1	99,39
9	<i>Burkholderia .sp</i> ATCC 25416	NR_114491.1	99,51
10	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> TVV75 16S	NR_118872.1	99,51

Từ kết quả trên ta thấy chủng Đ100 có độ tương đồng trên 99,6% với *Burkholderia .sp* 717; *B. latens* R-5630; và tương đồng 99.51% với *B. territorii* .

LMG 28158; *B. aenigmatica* .LMG 13014; *B. paludis* MSh1; *B. lata* 383; *B. contaminans* J2956; *Burkholderia* .sp 25416; *Burkholderia vietnamiensis* TVV75 16S, tương đồng 99.39% với chủng *Burkholderia* .sp NBRC 14074. Do vậy ta có thể kết luận đây là một chủng thuộc loài *Burkholderia* .sp. Chủng Đ100 được đặt tên là *Burkholderia* .sp Đ100.



Hình 3.8: Cây phát sinh chủng loài của chủng vi khuẩn Đ100 và các chủng tham chiếu từ ngân hàng gen

3.2. Nghiên cứu đặc điểm của điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh NH_4^+ của chủng vi khuẩn 2.4.1

3.2.1. Khảo sát môi trường và thời gian thích hợp đến khả năng sinh NH_4^+

Khả năng sinh NH_4^+ của vi khuẩn không cố định mà phụ thuộc vào điều kiện nuôi cấy và thời điểm đánh giá. Thành phần môi trường đóng vai trò như một tín hiệu điều khiển, quyết định việc phân phối dòng năng lượng giữa quá trình tăng sinh sinh khối và quá trình chuyển hóa nitơ. Sự gia tăng nồng độ NH_4^+ chỉ đạt mức tối đa khi các nhu cầu về dinh dưỡng và sinh thái được đáp ứng đồng bộ. Ở các điều kiện không tối ưu, chiến lược ưu tiên duy trì sự sống sẽ gây ra sự sụt giảm trong việc bài tiết các sản phẩm trung gian của chu trình nitơ, phản ánh tính linh hoạt trong thích nghi sinh tồn của vi khuẩn.

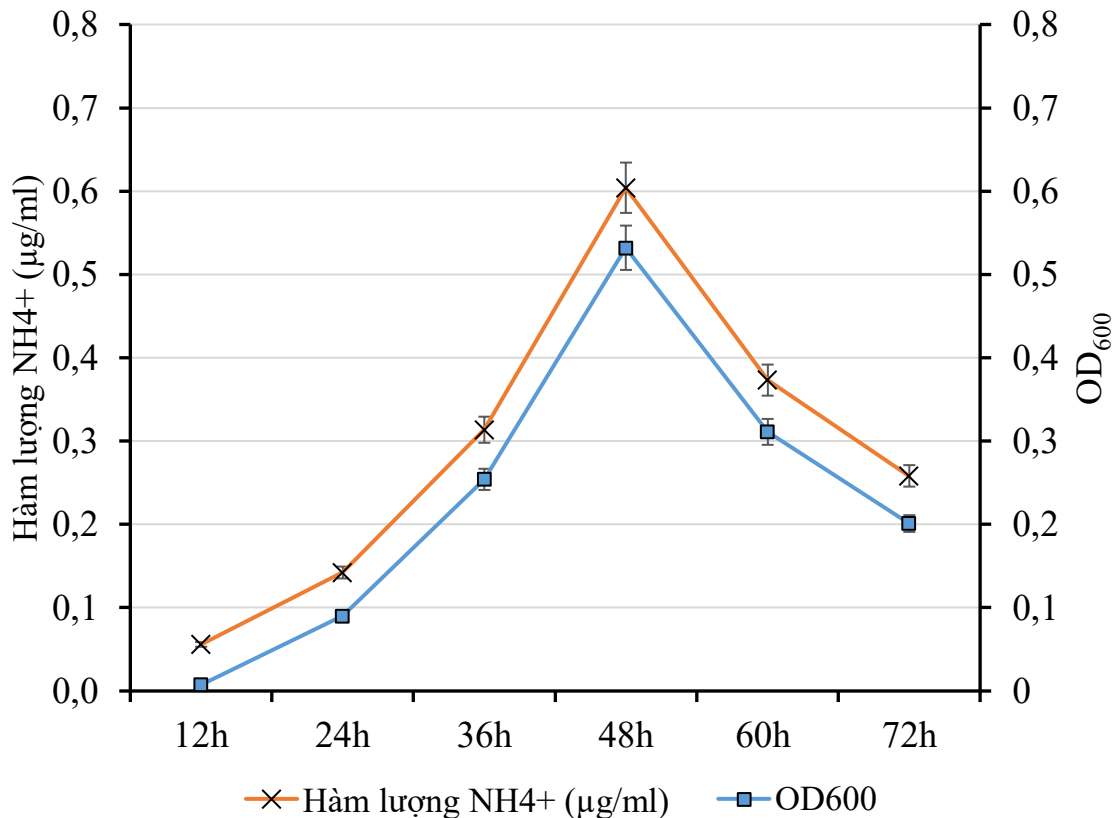
Bên cạnh đó, thời gian nuôi cấy quyết định trạng thái hoạt động của tế bào. Ở những giai đoạn khác nhau, cường độ chuyển hóa không giống nhau, dẫn đến sự khác biệt về lượng NH_4^+ tạo ra. Vì vậy, việc theo dõi theo thời gian giúp xác định được thời điểm mà quá trình này diễn ra rõ rệt nhất.

Do đó, khảo sát đồng thời cả môi trường và thời gian là cần thiết để tìm ra điều kiện tối ưu, qua đó đánh giá chính xác khả năng sinh NH_4^+ của vi khuẩn.

Dữ liệu khảo sát khả năng sinh NH_4^+ của chủng 2.4.1 trong điều kiện nuôi cấy tại 35°C trên các môi trường LGI, Burk và NFB được tổng hợp tại Hình 3.9, 3.10 và 3.11.

Môi trường LGI (Liquid Glucose Ivo) chủ yếu được sử dụng để phân lập và chọn lọc các vi khuẩn cố định nitơ từ các mẫu môi trường. Môi trường này được thiết kế đặc biệt không chứa bất kỳ nguồn nitơ kết hợp nào, tạo ra điều kiện chọn lọc mà chỉ những vi sinh vật có khả năng cố định nitơ trong không khí mới có thể phát triển. Nhờ đó, nó ức chế hiệu quả sự phát triển của các vi khuẩn không cố định nitơ, đồng thời thúc đẩy sự sinh trưởng của các loài vi khuẩn mục tiêu có khả năng cố định nitơ, chẳng hạn như những loài liên quan đến rễ cây.

Ngoài ra, môi trường LGI còn cung cấp các nguồn cacbon và khoáng chất thiết yếu, đảm bảo rằng sự thiếu hụt nitơ chính là yếu tố chọn lọc quan trọng. Vì vậy, môi trường này được ứng dụng rộng rãi trong các nghiên cứu vi sinh để thu nhận các chủng vi khuẩn cố định nitơ thuần khiết và hỗ trợ nghiên cứu về các vi khuẩn thúc đẩy sinh trưởng thực vật, góp phần vào nền nông nghiệp bền vững.

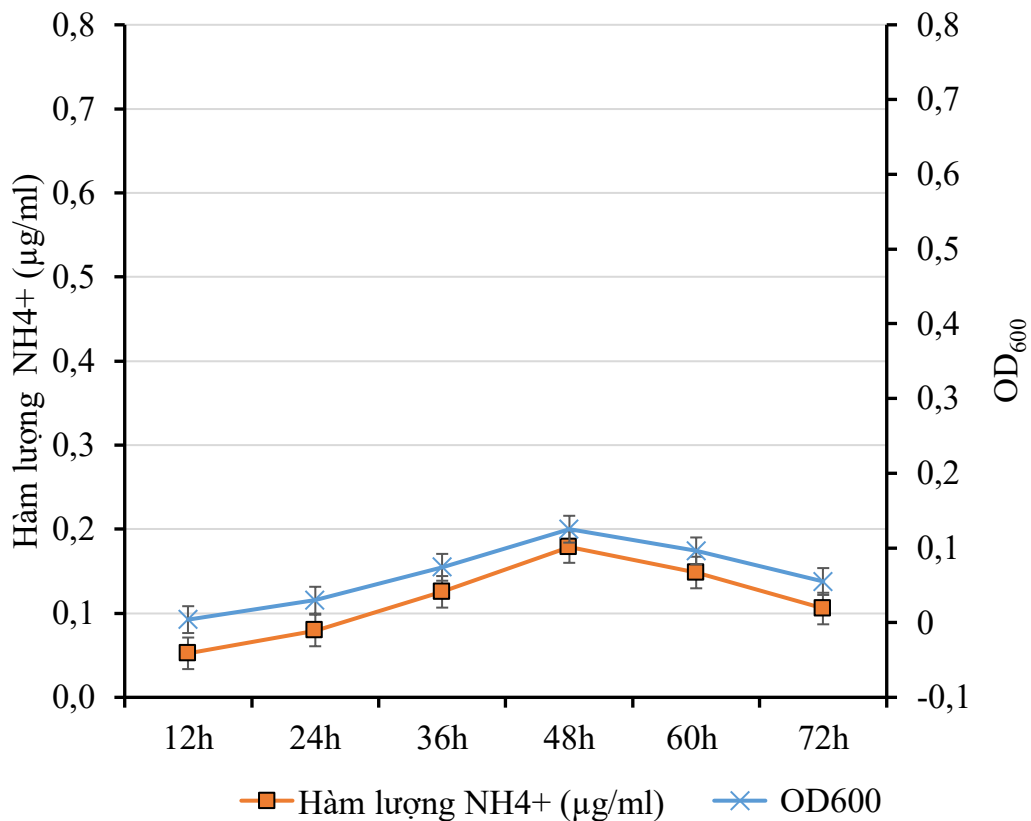


Hình 3.9: Khả năng sinh NH_4^+ của chủng vi khuẩn 2.4.1 trên môi trường LGI

Với môi trường Burk là môi trường được sử dụng rộng rãi để phân lập và nghiên cứu các vi sinh vật cố định nitơ nhờ thành phần không chứa nitơ, tạo ra áp lực

chọn lọc mạnh mẽ cho sự phát triển của các vi sinh vật cố định nitơ (diazotroph). Bằng cách loại bỏ các nguồn nitơ kết hợp, môi trường này hạn chế sự phát triển của các vi khuẩn không cố định nitơ, chỉ cho phép những sinh vật có khả năng chuyển hóa nitơ trong khí quyển thành dạng có thể sử dụng sinh học phát triển.

Đồng thời, môi trường vẫn cung cấp các khoáng chất thiết yếu và nguồn cacbon phù hợp, hỗ trợ hoạt động trao đổi chất trong khi duy trì sự thiếu hụt nitơ như yếu tố chọn lọc chính. Đặc điểm này khiến môi trường Burk đặc biệt hữu ích trong việc thu nhận các chủng vi khuẩn cố định nitơ sống tự do, cũng như trong nghiên cứu các đặc tính sinh lý của chúng và tiềm năng ứng dụng trong việc cải thiện độ phì nhiêu của đất và phát triển nông nghiệp xanh.

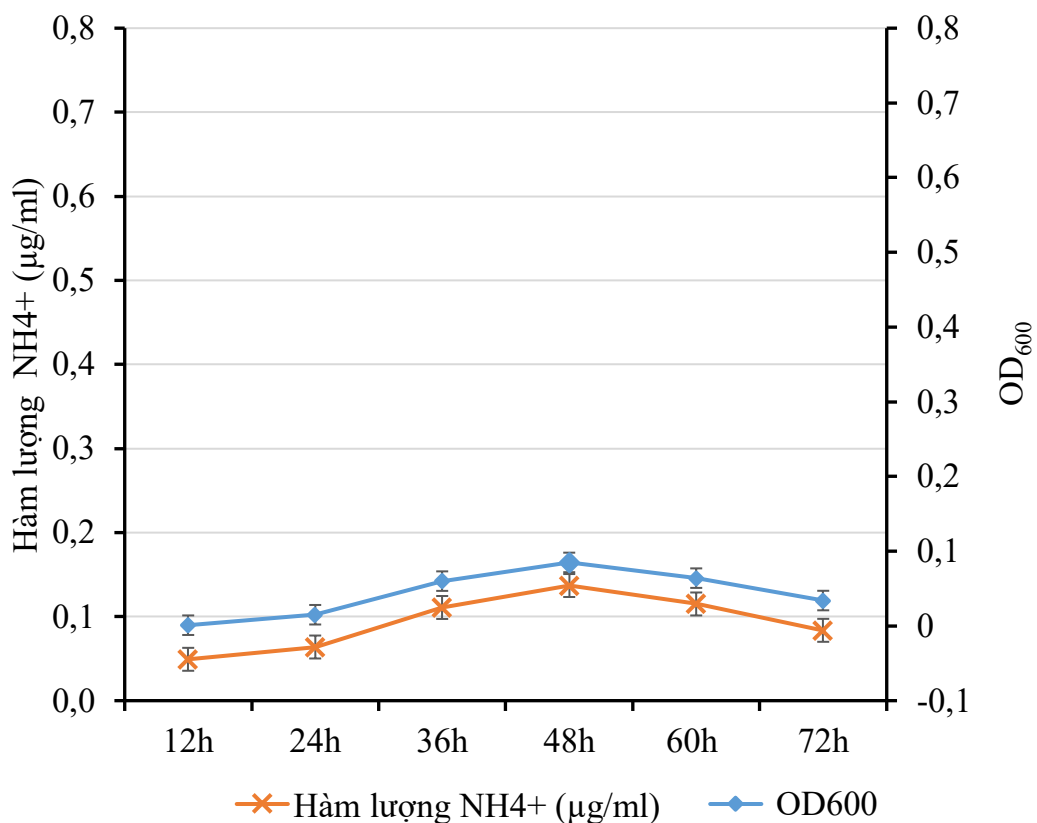


Hình 3.10: Khả năng sinh NH₄⁺ của chủng vi khuẩn 2.4.1 trên môi trường BURK.

Môi trường NFB (Nitrogen-Free Bromothymol blue) thường được sử dụng để phân lập và sàng lọc các vi khuẩn cố định nitơ trong điều kiện chọn lọc được tạo ra do không có nguồn nitơ kết hợp. Trong môi trường này, chỉ những vi sinh vật có khả năng sử dụng nitơ trong khí quyển mới có thể duy trì sự phát triển, trong khi các quần thể không cố định nitơ bị ức chế đáng kể.

Môi trường cung cấp một nguồn cacbon thích hợp và các nguyên tố khoáng thiết yếu nhằm hỗ trợ hoạt động của tế bào, đồng thời đảm bảo rằng sự sẵn có của nitơ vẫn là yếu tố hạn chế chính. Việc bổ sung bromothymol blue làm chất chỉ thị pH cho phép theo dõi trực quan các quá trình trao đổi chất, vì sự thay đổi màu sắc phản ánh những biến đổi liên quan đến hoạt động của vi khuẩn.

Nhờ những đặc điểm này, môi trường NFB được xem là một công cụ hiệu quả để làm giàu, phát hiện và nghiên cứu các vi khuẩn cố định nitơ, đặc biệt là những vi khuẩn liên quan đến rễ cây, cũng như để đánh giá tiềm năng đóng góp của chúng đối với các hệ thống nông nghiệp bền vững.



Hình 3.11: Khả năng sinh NH₄⁺ của chủng vi khuẩn 2.4.1 trên môi trường NFB.

Trong ba môi trường được khảo sát, LGI cho khả năng tạo NH₄⁺ cao nhất, tiếp đến là Burk, trong khi NFB cho giá trị thấp nhất. Kết quả này cho thấy thành phần dinh dưỡng của môi trường nuôi cấy có tác động đáng kể đến hoạt động cố định nitơ của vi khuẩn.

Qua quan sát biểu đồ, có thể thấy rõ sự tương tác giữa đặc tính sinh lý của vi khuẩn và thành phần hóa lý của môi trường nuôi cấy. Kết quả này phản ánh năng lực chuyển hóa nitơ biệt hóa của chủng 2.4.1 dưới tác động của các nguồn carbon và khoáng vi lượng khác nhau có trong ba loại môi trường khảo sát.

Dữ liệu cho thấy nồng độ NH_4^+ trong cả ba môi trường đều tăng dần theo thời gian, đạt đỉnh sau 48 giờ nuôi cấy rồi giảm xuống. Điều này gợi ý rằng mốc 48 giờ là thời điểm tối ưu để thu nhận NH_4^+ từ chủng vi khuẩn 2.4.1.

Qua quan sát biểu đồ, có thể thấy rõ sự tương tác giữa đặc tính sinh lý của vi khuẩn và thành phần hóa lý của môi trường nuôi cấy. Kết quả này phản ánh năng lực chuyển hóa nitơ biệt hóa của chủng 2.4.1 dưới tác động của các nguồn carbon và khoáng vi lượng khác nhau có trong ba loại môi trường khảo sát.

Dữ liệu cho thấy nồng độ NH_4^+ trong cả ba môi trường đều tăng dần theo thời gian, đạt đỉnh sau 48 giờ nuôi cấy rồi giảm xuống. Điều này gợi ý rằng mốc 48 giờ là thời điểm tối ưu để thu nhận NH_4^+ từ chủng vi khuẩn 2.4.1.

Trong ba môi trường được khảo sát, LGI cho khả năng tạo NH_4^+ cao nhất, tiếp đến là Burk, trong khi NFB cho giá trị thấp nhất. Kết quả này cho thấy thành phần dinh dưỡng của môi trường nuôi cấy có tác động đáng kể đến hoạt động cố định nitơ của vi khuẩn.

Theo Ito et al., 2024, sự gia tăng hàm lượng NH_4^+ trong khoảng 0 - 48 giờ nhiều khả năng gắn với hoạt tính cao của enzyme nitrogenase trong pha sinh trưởng, khi các gen *nif* được biểu hiện mạnh để xúc tác quá trình chuyển hóa N_2 thành NH_4^+ [67]. Đồng thời, một số nghiên cứu gần đây Mus et al., 2022; Barron et al., 2024 cũng chỉ ra rằng khả năng giải phóng NH_4^+ ra môi trường phụ thuộc vào cơ chế điều hòa di truyền, đặc biệt là hệ *NifH - NifA* và trạng thái dinh dưỡng của tế bào [68, 69]. Sau mốc 48 giờ, hàm lượng NH_4^+ có xu hướng giảm, có thể do cơ chế điều hòa ngược khi NH_4^+ tích lũy trong môi trường. Nghiên cứu của Xu et al. 2024 [70] cho thấy sự hiện diện của nguồn nitơ dễ hấp thu có thể làm giảm hoạt tính nitrogenase thông qua điều hòa chuyển hóa nội bào. Bên cạnh đó Zhang et al., 2023 sự bổ sung NH_4^+ vào môi trường đã được chứng minh có thể nhanh chóng ức chế biểu hiện các gen *nif* liên quan đến cố định nitơ [71]. Điều này giải thích cho xu hướng giảm hàm lượng NH_4^+ sau khi đạt cực đại trong thí nghiệm.

3.2.2. Khảo sát nhiệt độ và pH thích hợp để sinh NH_4^+

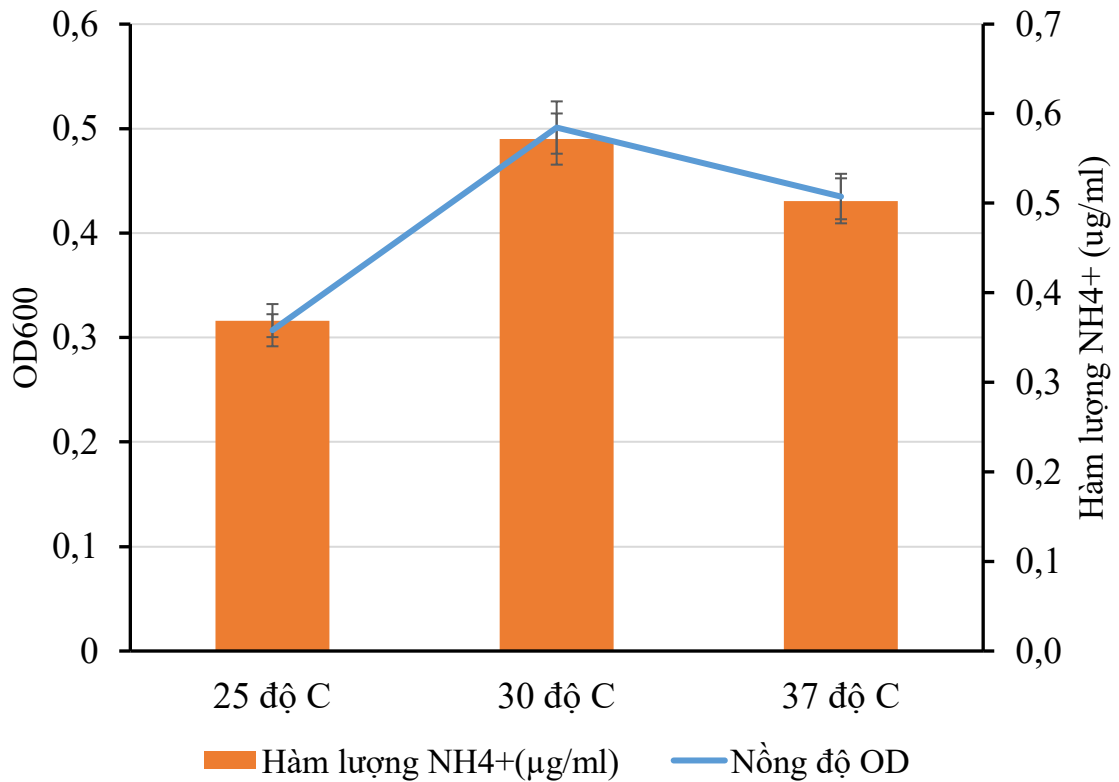
Khả năng sinh NH_4^+ của vi khuẩn chịu ảnh hưởng đáng kể từ các yếu tố môi trường, trong đó pH và nhiệt độ là hai thông số cơ bản cần được xem xét. pH không chỉ chi phối trạng thái của các chất trong môi trường mà còn tác động trực tiếp đến hoạt động của các hệ enzyme liên quan đến chuyển hóa nitơ. Khi pH nằm trong khoảng phù hợp, các phản ứng diễn ra thuận lợi hơn; ngược lại, sự lệch khỏi khoảng này có thể làm giảm hiệu quả chuyển hóa.

Nhiệt độ không chỉ chi phối tốc độ phản ứng mà còn quyết định trạng thái hoạt động của hệ thống vận chuyển nội bào. Ở mức nhiệt độ tối ưu cho từng chủng, các hoạt động enzymatic liên quan đến quá trình chuyển hóa diễn ra ổn định, đảm bảo tính liên tục của chu trình sống. Ngược lại, những biến động nhiệt ngoài dải thích nghi sẽ gây ra các áp lực sinh lý, làm chậm tốc độ phản ứng hoặc gây ức chế chọn lọc các enzyme nhạy cảm với nhiệt, từ đó làm giảm hiệu quả tổng thể của các quá trình sinh học.

Do đó, việc khảo sát đồng thời pH và nhiệt độ giúp xác định được điều kiện mà vi khuẩn vừa thích nghi tốt vừa thể hiện rõ khả năng sinh NH_4^+ , từ đó làm cơ sở cho việc tối ưu hóa quá trình nuôi cấy và ứng dụng sau này

Để xác định các thông số nuôi cấy tối ưu, chủng vi khuẩn 2.4.1 đã được khảo sát trong môi trường LGI dạng lỏng dưới sự tác động đa yếu tố của nhiệt độ và độ pH. Thí nghiệm được thiết lập tại ba ngưỡng nhiệt độ khác nhau (25°C , 30°C và 37°C) nhằm đánh giá biến động về năng lực tổng hợp NH_4^+ sau 48 giờ nuôi ủ. Các dữ liệu thực nghiệm thu được, minh chứng cho sự tương tác giữa điều kiện lý hóa và hoạt tính sinh học của chủng, được tổng hợp chi tiết tại Hình 3.10.

Kết quả Hình 3.12 chỉ ra rằng nhiệt độ tác động tương đối lớn đến khả năng sinh NH_4^+ của chủng 2.4.1. Cụ thể, ở 30°C , hàm lượng NH_4^+ đo được đạt mức cao nhất sau 48 giờ nuôi cấy, trong khi ở 25°C và 37°C giá trị này thấp hơn. Điều này cho thấy 30°C là điều kiện nhiệt độ phù hợp nhất cho sinh trưởng cũng như hoạt động cố định nitơ của chủng nghiên cứu.

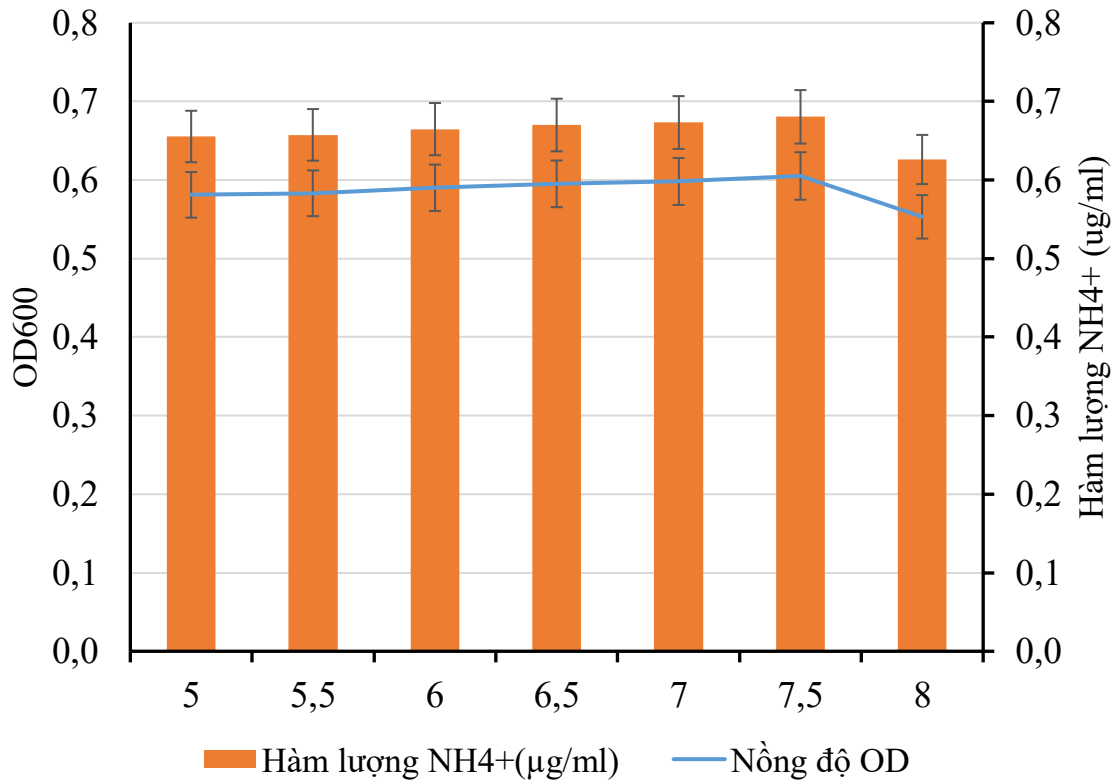


Hình 3.12: Khả năng sinh NH₄⁺ của chủng 2.4.1 tại ba mức nhiệt độ

Việc gia tăng hàm lượng NH₄⁺ ở 30°C có thể liên quan đến hoạt của enzyme nitrogenase trong khoảng nhiệt độ không cao đã khảo sát, khi cấu trúc protein được duy trì ổn định và các quá trình trao đổi chất diễn ra phù hợp. Ngược lại, ở 25°C, tốc độ sinh trưởng và hoạt tính enzyme giảm, dẫn đến khả năng tạo NH₄⁺ thấp hơn. Trong khi đó, ở 37°C, enzyme có thể bị suy giảm hoạt tính hoặc biến tính một phần, làm giảm hiệu quả của quá trình cố định nitơ.

Sự phù hợp giữa kết quả nghiên cứu này và các báo cáo chuyên ngành cho thấy một đặc điểm chung của nhóm vi khuẩn cố định đạm tự do là ưu tiên phát triển trong khoảng nhiệt độ từ 28°C đến 32°C. Đáng chú ý, Zhang và cộng sự (2026) đã chứng minh rằng áp lực nhiệt ngoài dải tối ưu gây ra những tác động tiêu cực trực tiếp đến phức hệ nitrogenase. Khi nhiệt độ tăng cao quá mức, khả năng khử N₂ thành NH₄⁺ bị kìm hãm rõ rệt, phản ánh cơ chế tự bảo vệ hoặc sự đình trệ trong quá trình chuyển hóa năng lượng của tế bào vi khuẩn [71] ghi nhận hoạt tính nitrogenase giảm đáng kể khi nhiệt độ vượt quá ngưỡng tối ưu, trong khi Mus et al. (2022) [72] sự biến động nhiệt độ không chỉ tác động đến sinh trưởng mà còn chi phối trực tiếp đến phát biểu di truyền của các locus gen *nif*. Môi trường nhiệt độ không tối ưu gây ra những sai lệch trong quy trình tổng hợp các protein cấu thành phức hệ nitrogenase, từ đó làm suy giảm năng lực khử N₂. Kết quả này khẳng định rằng hiệu suất cố định đạm

là một hàm số phụ thuộc vào sự tương tác giữa nhiệt độ và khả năng kích hoạt bộ gen chuyên biệt của vi sinh vật.



Hình 3.13: Khả năng sinh NH₄⁺ của chủng 2.4.1 tại các điểm pH

Tổng hợp các dữ liệu thực nghiệm nêu trên, có thể xác định 30°C là ngưỡng nhiệt độ tối ưu, thúc đẩy mạnh mẽ quá trình sinh tổng hợp NH₄⁺ của chủng vi khuẩn 2.4.1. Kết quả này không chỉ khẳng định đặc tính sinh lý của chủng mà còn thiết lập thông số kỹ thuật nền tảng để triển khai các khảo sát chuyên sâu về sự tương tác giữa độ pH và các thành phần dinh dưỡng khác. Việc chuẩn hóa mức nhiệt này là bước đệm quan trọng để tối ưu hóa hiệu suất cố định nitơ trong các hệ thống nuôi cấy quy mô lớn hơn

Thí nghiệm đánh giá tác động của pH (Hình 3.13) trên nền nhiệt 30°C ghi nhận chủng vi khuẩn 2.4.1 duy trì khả năng sinh NH₄⁺ tương đối ổn định trong toàn bộ dải khảo sát. Mặc dù hàm lượng NH₄⁺ ghi nhận tại pH 7,5 có phần ưu thế hơn sau chu kỳ 48 giờ, nhưng các sai biệt này không đạt mức ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Điều này chỉ ra rằng hệ thống enzyme nitrogenase và các con đường chuyển hóa liên quan của chủng 2.4.1 có độ bền vững cao trước sự biến thiên của nồng độ ion H⁺, cho thấy tiềm năng ứng dụng của chủng trên nhiều loại nền đất có độ chua hoặc kiềm khác nhau.

Kết quả này đồng thời phản ánh khả năng thích nghi của vi khuẩn 2.4.1 trong dải pH khá rộng (5,0–8,0), trong đó vùng pH trung tính đến hơi kiềm (khoảng 7,0–7,5) có xu hướng thuận lợi hơn cho sinh trưởng và hoạt động cố định nitơ. Điều này có thể liên quan đến sự ổn định của enzyme nitrogenase cũng như hệ enzyme nội bào khi pH ở gần mức trung tính. Nhận định trên phù hợp với các nghiên cứu gần đây, khi cho thấy hoạt tính cố định nitơ của nhiều vi khuẩn tự do tương đối ổn định trong vùng pH trung tính [73] ghi nhận rằng nitrogenase duy trì hoạt tính tốt trong khoảng pH 6,5–7,5 và chỉ suy giảm rõ khi pH vượt ra ngoài giới hạn này. Tương tự, Mus et al. (2022) [72] cũng chỉ ra rằng pH chủ yếu tác động gián tiếp thông qua trạng thái sinh trưởng của tế bào, thay vì ảnh hưởng trực tiếp mạnh đến cơ chế cố định nitơ. Từ đó có thể thấy, mặc dù pH 7,5 cho giá trị NH_4^+ cao nhất, nhưng trong phạm vi khảo sát, pH không phải là yếu tố quyết định đối với khả năng sinh NH_4^+ của chủng vi khuẩn 2.4.1. Điều này có ý nghĩa thực tiễn khi ứng dụng chủng vi khuẩn, do không yêu cầu kiểm soát pH quá nghiêm ngặt.

3.2.3. Ảnh hưởng của nhân tố magie đến khả năng sinh NH_4^+

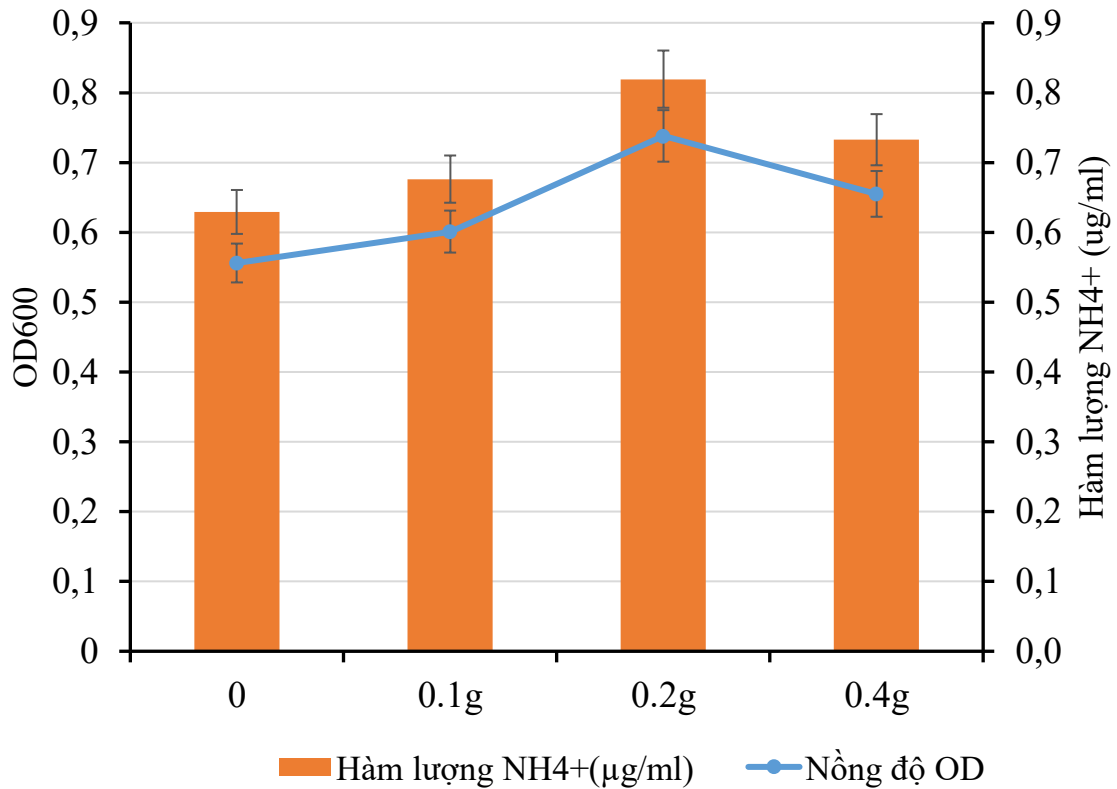
Tác động của Magie đối với chủng vi khuẩn nghiên cứu được chú trọng khảo sát bởi đây là thành phần cốt lõi duy trì sự ổn định của các đại phân tử sinh học. Ion Mg^{2+} đóng vai trò như một 'cầu nối' tĩnh điện giúp ổn định cấu trúc nucleic acid và màng tế bào trước các áp lực môi trường. Bên cạnh chức năng cấu trúc, Magie còn là nhân tố điều tiết tốc độ của các phản ứng trao đổi chất, đảm bảo các lộ trình chuyển hóa carbon và nitơ diễn ra nhịp nhàng, trực tiếp ảnh hưởng đến hiệu suất giải phóng amoni của chủng.

Trong quá trình sinh NH_4^+ , vi khuẩn cần duy trì sự cân bằng nội bào và đảm bảo các phản ứng chuyển hóa hoạt động hiệu quả. Magie tham gia vào việc hỗ trợ các hệ enzyme và điều hòa dòng chuyển hóa, do đó sự thay đổi nồng độ Mg có thể làm biến đổi mức độ tạo NH_4^+ .

Việc khảo sát yếu tố này giúp xác định khoảng nồng độ mà tại đó vi khuẩn vừa duy trì trạng thái sinh lý ổn định vừa thể hiện rõ khả năng chuyển hóa nitơ. Từ đó, có thể làm rõ vai trò của Mg trong quá trình này và lựa chọn điều kiện phù hợp cho nuôi cấy và ứng dụng thực tiễn.

Ảnh hưởng của nồng độ Magie đến động thái sinh NH_4^+ của chủng 2.4.1 sau 48 giờ nuôi ủ tại 37°C và pH 7,5 được tổng hợp ở Hình 3.14. Việc sử dụng kỹ thuật nuôi lắc giúp tối ưu hóa quá trình trao đổi khí, từ đó làm rõ hơn vai trò của yếu tố vi lượng này trong việc thúc đẩy các quá trình sinh học nội bào. Dữ liệu tại Hình 3.14

phản ánh ngưỡng đáp ứng của vi khuẩn đối với Magie, phục vụ cho việc hoàn thiện công thức môi trường nuôi cấy chuyên biệt.



Hình 3.14: Khả năng sinh NH₄⁺ của chủng 2.4.1 ảnh hưởng bởi yếu tố tối magie

Kết quả cho thấy nồng độ Mg có ảnh hưởng đáng kể đến khả năng sinh NH₄⁺ của chủng vi khuẩn 2.4.1. Cụ thể, tại mức bổ sung 0,2 g, hàm lượng NH₄⁺ đạt cao nhất, trong khi khi giảm hoặc tăng vượt mức này, khả năng tạo NH₄⁺ đều suy giảm.

Magie là nguyên tố vi lượng thiết yếu, tham gia vào nhiều quá trình sinh học như ổn định cấu trúc ribosome, hoạt hóa enzyme và duy trì cân bằng ion nội bào. Đối với vi khuẩn cố định nitơ, Mg²⁺ đóng vai trò hỗ trợ gián tiếp cho hoạt động của enzyme nitrogenase thông qua việc tham gia vào các quá trình chuyển hóa năng lượng và vận chuyển điện tử. Hiệu quả cố định nitơ phụ thuộc chặt chẽ vào hệ thống cung cấp năng lượng và dòng điện tử cho nitrogenase, trong đó các ion kim loại giữ vai trò quan trọng [74].

Ngoài ra, các nghiên cứu Mohr et al., (2022) về sinh học vi khuẩn cố định đạm cũng chỉ ra rằng sự sẵn có của các nguyên tố khoáng, bao gồm các ion kim loại, ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu suất cố định nitơ thông qua việc điều hòa enzyme và cofactor nội bào [75]. Các kết quả trên đã làm sáng tỏ cơ chế đáp ứng của vi khuẩn đối với nồng độ Magie trong môi trường nuôi cấy. Tại mức bổ sung tối ưu (0,2 g/L), Mg²⁺

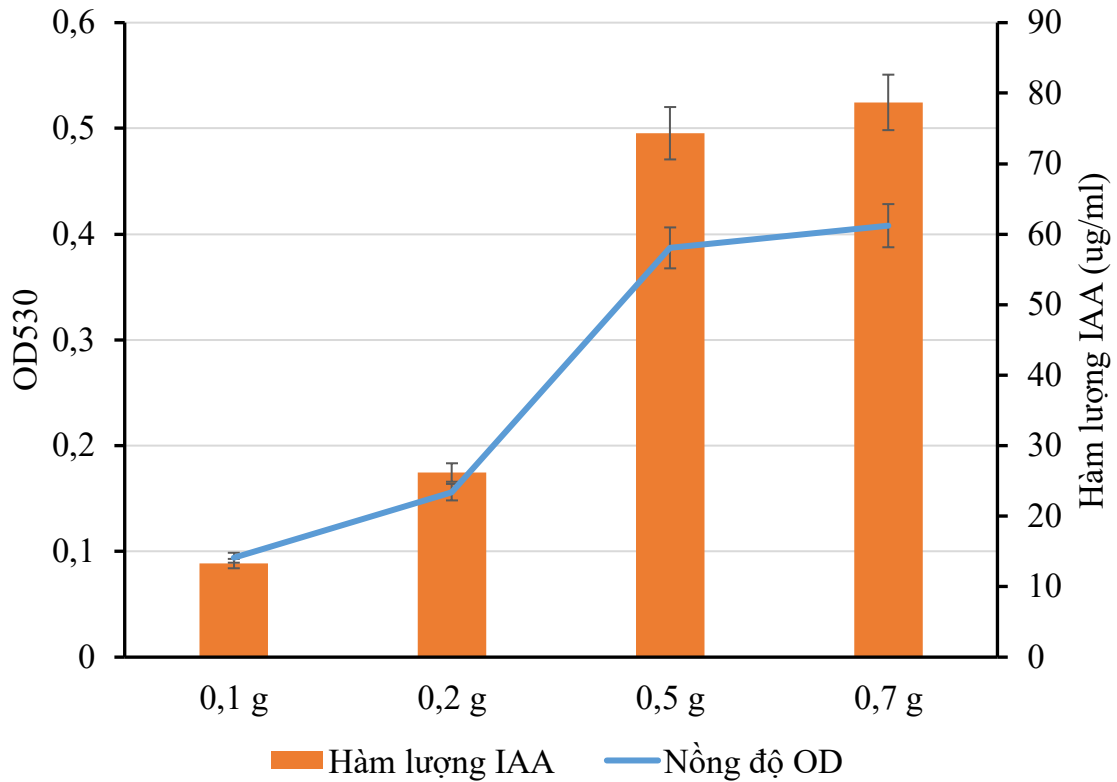
đóng vai trò là nhân tố giới hạn được đáp ứng đầy đủ, giúp thúc đẩy đồng bộ các hoạt động sinh trưởng và chuyển hóa năng lượng, từ đó tối đa hóa hiệu suất giải phóng NH_4^+ . Nghiên cứu cho thấy nồng độ Magie đóng vai trò như một 'van điều tiết' đối với chu trình chuyển hóa nitơ của chủng vi khuẩn. Khi hàm lượng Magie quá thấp, các phản ứng phụ thuộc ATP bị giới hạn, làm tê liệt khả năng khử N_2 của tế bào. Tuy nhiên, việc lạm dụng nồng độ ion quá cao lại tạo ra độc tính nhất định, gây rối loạn áp suất thẩm thấu và kìm hãm hoạt tính của các protein vận chuyển. Hệ quả là quá trình tổng hợp amoni bị gián đoạn, minh chứng cho việc vi khuẩn chỉ đạt hiệu suất sinh học cao nhất trong một 'cửa sổ' nồng độ khoáng xác định. Xu hướng này phù hợp với nhận định của Leroux et al., (2024) cho rằng hiệu suất cố định nitơ chịu ảnh hưởng mạnh bởi trạng thái cân bằng dinh dưỡng và điều kiện môi trường vi sinh [76]. Từ đó có thể xác định rằng hàm lượng Mg 0,2 g là điều kiện thích hợp để tối ưu hóa khả năng sinh NH_4^+ của chủng vi khuẩn 2.4.1 trong điều kiện thí nghiệm.

3.3. Đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn có khả năng sinh NH_4^+

3.3.1. Khả năng sinh IAA của chủng 2.4.1

Nghiên cứu đánh giá năng lực tổng hợp indole-3-acetic acid (IAA) của chủng 2.4.1 nhằm xác lập giá trị tiềm năng của vi khuẩn này trong việc thúc đẩy sinh trưởng thực vật. Là một phytohormone thuộc nhóm auxin, IAA đóng vai trò then chốt trong việc điều phối quá trình kéo dài tế bào, phân nhánh rễ và tối ưu hóa diện tích hấp thụ dưỡng chất. Do đó, khả năng bài tiết IAA không chỉ là một chỉ số định danh sinh học mà còn phản ánh cơ chế kích thích sinh học gián tiếp, giúp cây trồng phát triển hệ rễ khỏe mạnh và tăng cường khả năng chống chịu với các điều kiện bất lợi từ môi trường.

Bên cạnh khả năng chuyển hóa nitơ, việc xác định thêm khả năng sinh IAA giúp nhìn nhận chủng vi khuẩn theo hướng toàn diện hơn, không chỉ dừng ở một chức năng riêng lẻ. Điều này đặc biệt quan trọng trong bối cảnh ứng dụng vi sinh vật vào nông nghiệp, nơi các đặc tính bổ trợ thường mang lại hiệu quả rõ rệt hơn khi kết hợp với nhau.



Hình 3.15: Khả năng sinh IAA của chủng 2.4.1

Khảo sát khả năng tiết Auxin (IAA) của chủng 2.4.1 mang ý nghĩa chiến lược trong việc xác lập các chỉ số sinh thái học của dòng vi sinh vật này. Thông tin thu được không chỉ làm phong phú thêm hệ thống đặc điểm di truyền và chuyển hóa, mà còn trực tiếp định vị giá trị thương mại và tiềm năng ứng dụng thực tế. Việc chứng minh được khả năng sinh IAA ổn định sẽ biến chủng 2.4.1 thành một ứng viên tiềm năng cho các giải pháp canh tác xanh, hỗ trợ hệ rễ phát triển tối ưu trong những điều kiện thổ nhưỡng khác nhau.

Đặc tính kích thích sinh trưởng của dòng khuẩn *Bacillus* 2.4.1 được làm rõ thông qua năng lực bài tiết phytohormone IAA. Kết quả thực nghiệm ghi nhận một mối tương quan thuận giữa nồng độ tiền chất L-tryptophan và hiệu suất tổng hợp IAA trong môi trường nuôi cấy. Đáng chú ý, ở nghiệm thức không có sự hiện diện của L-tryptophan, hoạt tính sinh IAA của tế bào bị hạn chế tối đa, dẫn đến nồng độ sản phẩm cuối cùng rất thấp. Sự gia tăng đột ngột hàm lượng IAA khi có bổ sung cơ chất khẳng định rằng L-tryptophan đóng vai trò là 'nguyên liệu' then chốt kích hoạt bộ máy enzyme chuyển hóa của chủng 2.4.1; trong khi đó, ở nồng độ 100–500 mg/L, hàm lượng IAA tăng mạnh và đạt giá trị 786 mg/L ở nồng độ L-tryptophan 700 mg/L (Hình 3.15). Tuy nhiên, mức tăng từ 500 lên 700 mg/L là không lớn, cho thấy xu hướng bão hòa.

Kết quả này chứng tỏ L-tryptophan đóng vai trò là tiền chất quan trọng trong con đường sinh tổng hợp IAA ở vi khuẩn. Nhiều nghiên cứu Spaepen và Vanderleyden, (2011) đã chỉ ra rằng phần lớn vi khuẩn sinh IAA thông qua các con đường phụ thuộc tryptophan, trong đó L-tryptophan được chuyển hóa thành IAA qua các trung gian như indole-3-pyruvate hoặc indole-3-acetamide [23]. Các nghiên cứu gần đây Ameen et al., 2021; Duca et al., 2014 cũng khẳng định việc bổ sung tryptophan vào môi trường nuôi cấy có thể làm tăng đáng kể khả năng sinh IAA của vi khuẩn vùng rễ (*rhizobacteria*) [77, 78]. Việc hàm lượng IAA tăng mạnh đến ngưỡng 500 mg/L và sau đó tăng chậm có thể do sự giới hạn của hệ enzyme hoặc cơ chế điều hòa nội bào khi nồng độ cơ chất cao. Xu hướng này đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu Patten *et al.*, (2002), khi sự tích lũy IAA hoặc các chất trung gian có thể gây ức chế ngược đến quá trình sinh tổng hợp [27]. Tổng hợp các dữ liệu thực nghiệm, có thể khẳng định chủng vi khuẩn 2.4.1 sở hữu cơ chế sinh tổng hợp IAA phụ thuộc chặt chẽ vào sự hiện diện của L-tryptophan. Trong các dải nồng độ khảo sát, mức bổ sung 500 mg/L được xác định là ngưỡng cơ chất tối ưu, thúc đẩy hiệu suất tạo Auxin đạt giá trị cao nhất. Kết quả này không chỉ làm rõ đặc tính sinh hóa của chủng mà còn cung cấp thông số kỹ thuật nền tảng để chuẩn hóa quy trình sản xuất các chế phẩm kích thích sinh trưởng thực vật từ dòng khuẩn này.

3.3.2. Biểu hiện của gen của chủng có khả năng sinh NH_4^+

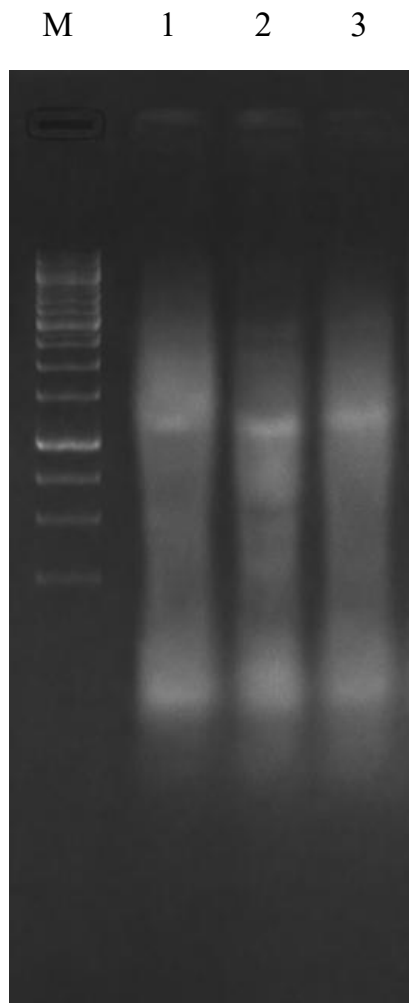
Để hiểu rõ khả năng tạo NH_4^+ của vi khuẩn, cần lựa chọn những dấu hiệu di truyền có thể phản ánh được cả quá trình diễn ra bên trong tế bào. Trong số đó, *nifH* và *nifA* được sử dụng vì chúng cho phép quan sát hai khía cạnh khác nhau của cùng một hệ thống.

Sự biến động trong biểu hiện của *nifH* thường đi kèm với thay đổi trong mức độ chuyển hóa nitơ, nên có thể xem đây là một chỉ báo cho cường độ hoạt động thực tế của quá trình sinh NH_4^+ . Khi gen này tăng biểu hiện, khả năng tạo sản phẩm cuối cũng có xu hướng thay đổi tương ứng.

Trong khi đó, *nifA* lại phản ánh trạng thái “sẵn sàng hoạt động” của hệ thống. Thay vì gắn với một bước cụ thể, nó cho thấy vi khuẩn đang bật hay tắt các cơ chế liên quan đến cố định nitơ trong những điều kiện nhất định.

Khi đặt hai gen này trong cùng một phân tích, có thể nhìn thấy đồng thời cả mức độ vận hành và cách hệ thống được kiểm soát. Điều này giúp việc đánh giá không chỉ dừng ở kết quả quan sát mà còn gắn với cách mà vi khuẩn điều chỉnh hoạt động của mình để tạo ra NH_4^+ .

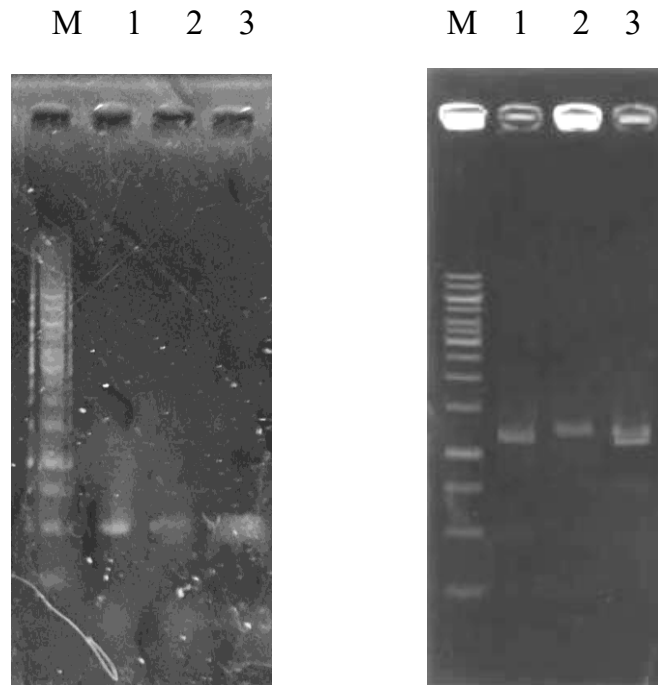
Nhằm đánh giá mức độ biểu hiện của cụm gen liên quan đến quá trình cố định nitơ, bao gồm gen cấu trúc mã hóa enzyme nitrogenase (*nifH*, 436 bp) và gen điều hòa sinh tổng hợp (*nifA*, 1310 bp), quy trình phân tích phân tử đã được thiết lập chặt chẽ. Sau bước tách chiết RNA tổng số bằng bộ kit chuyên dụng, quá trình tổng hợp cDNA được thực hiện thông qua phản ứng phiên mã ngược với môi Oligo(dT) (hoặc polyA).



Hình 3.16: Điện di RNA tổng số. 1: *Bacillus zanthoxyli* 2.4.1; 2: *Burkholderia* sp. CP100; 3: *Burkholderia* sp. Đ100.

Tiếp theo, các đoạn cDNA mục tiêu được khuếch đại bằng phản ứng PCR với các cặp môi đặc hiệu cho *nifH* và *nifA*. Sản phẩm sau khuếch đại được kiểm tra độ tinh sạch và kích thước thông qua kỹ thuật điện di trên gel agarose 0,8% để xác định sự hiện diện của các băng vạch tương ứng.

Kết quả Hình 14 cho thấy, cho thấy cả ba chủng (*Bacillus zanthoxyli* 2.4.1, *Burkholderia* sp. CP100 và *Burkholderia* sp. Đ100) đều biểu hiện hai gen *nifA* và *nifH*.



Hình 3.17: Điện di RNA tổng số (A); gen *nifH* (B); gen *nifH* (C); M: Marker 1: *Bacillus zanthoxyli* 2.4.1; 2: *Burkholderia* sp. CP100; 3: *Burkholderia* sp. Đ100.

Trong đó, *nifA* là gen điều hòa trung tâm, đóng vai trò hoạt hóa phiên mã các gen trong cụm *nif*, trong khi *nifH* mã hóa tiểu đơn vị enzyme nitrogenase trực tiếp tham gia vào quá trình khử N_2 thành NH_4^+ . Việc ghi nhận các sản phẩm phiên mã của cụm gen *nif* (bao gồm cả gen điều hòa và gen cấu trúc) cho phép kết luận về trạng thái hoạt động tích cực của phức hệ nitrogenase trong tế bào. Hiện tượng biểu hiện hiệp đồng của *nifA* và *nifH* phù hợp với các học thuyết di truyền học vi sinh vật, khẳng định rằng sự kích hoạt gen điều hòa cấp cao (*nifA*) là tiền đề tất yếu để khởi động quá trình tổng hợp các tiểu đơn vị của enzyme nitrogenase. Điều này cho thấy chủng 2.4.1 có khả năng đáp ứng tốt với các tín hiệu môi trường thuận lợi để tối ưu hóa hiệu suất cố định đạm [79]. Đồng thời, nghiên cứu của [38] cũng chỉ ra rằng biểu hiện của các gen *nif*, đặc biệt là *nifH*, là gen quan trọng cho hoạt động của nitrogenase và quá trình cố định nitơ. Từ đó có thể nhận định rằng cả ba chủng vi khuẩn đều có khả năng tham gia vào quá trình cố định nitơ trong điều kiện khảo sát, tạo cơ sở cho việc khai thác và ứng dụng các chủng này trong các giai đoạn khảo sát sau này.

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. KẾT LUẬN

Đã phân lập được 14 chủng vi khuẩn từ mẫu đất và rễ lúa tại thành phố Cần Thơ và vùng lân cận. Có bốn chủng vi sinh vật có khả năng sinh NH_4^+ cao, cho thấy tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực phân bón sử dụng trong nông nghiệp.

Bốn chủng vi khuẩn có khả năng sinh NH_4^+ đã được xác định danh tính bằng phương pháp so sánh trình tự gen 16S rRNA và được đặt tên như sau: *Bacillus zanthoxyli* 2.4.1, *Priestia aryabhatai* 1.3, *Burkholderia* .sp CP100 và *Burkholderia* .sp Đ100. Trong đó chủng *Bacillus zanthoxyli* 2.4.1 còn có khả năng sản sinh IAA, là chất kích thích sinh trưởng thực vật.

Đã khảo sát đặc điểm sinh học chủng *Bacillus zanthoxyli strain* 2.4.1 với thời gian là 48 giờ, nhiệt độ 30°C và pH khoảng 5 - 8 cho khả năng sinh NH_4^+ của chủng vi khuẩn *Bacillus zanthoxyli strain* 2.4.1 là tốt nhất. Chủng này cũng có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng IAA với hàm lượng đạt 786 mg/L.

Các chủng *Bacillus zanthoxyli* 2.4.1, *Burkholderia* sp. CP100 và *Burkholderia* .sp Đ100 đều biểu hiện cụm gen quan trọng trong quá trình sinh NH_4^+ là *nifH* và *nifA*.

4.2. KIẾN NGHỊ

Tiến hành các nghiên cứu sâu hơn về đặc điểm sinh lý, sinh hóa và di truyền của chủng vi khuẩn đã phân lập, đặc biệt là cơ chế chuyển hóa nitơ và khả năng tạo NH_4^+ trong các điều kiện môi trường khác nhau.

Thực hiện các thí nghiệm ở quy mô nhà lưới, mô hình bán công nghiệp hoặc ngoài đồng ruộng để đánh giá tính ổn định, hiệu quả sinh NH_4^+ và khả năng thích nghi của chủng vi khuẩn trong điều kiện thực tế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ha, T.T.T., et al., *Characterization and identification of nitrogenfixing bacteria isolated from agricultural soil*. Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering, 2018. **60**(3): p. 48-54.
2. Tung, H.T., *Analysis of Agroecological Transition at the National Level The Emergence and Institutionalization of Agroecology in Viet Nam*. 2021, July.
3. Hr, S., *The chemistry of soil organic nitrogen: a review*. Biol. Fertil. Soils, 1998. **26**: p. 1-5.
4. Kumar, S., et al., *MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms*. Molecular biology and evolution, 2018. **35**(6): p. 1547-1549.
5. Mazid, M. and T.A. Khan, *Future of bio-fertilizers in Indian agriculture: an overview*. International Journal of Agricultural and Food Research, 2014. **3**(3): p. 10-23.
6. Wang, X., et al., *Biocontrol and plant growth-promoting activity of rhizobacteria from C hinese fields with contaminated soils*. Microbial Biotechnology, 2015. **8**(3): p. 404-418.
7. Aasfar, A., et al., *Nitrogen fixing Azotobacter species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability*. Frontiers in microbiology, 2021. **12**: p. 628379.
8. Chowdhury, S.P., et al., *Biocontrol mechanism by root-associated Bacillus amyloliquefaciens FZB42—a review*. Frontiers in microbiology, 2015. **6**: p. 780.
9. Robson, R.L. and J.R. Postgate, *Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation*. Annual Reviews in Microbiology, 1980. **34**(1): p. 183-207.
10. Peoples, M.B., D.F. Herridge, and J.K. Ladha, *Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production?* Plant and soil, 1995. **174**(1): p. 3-28.
11. Steenhoudt, O. and J. Vanderleyden, *Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects*. FEMS microbiology reviews, 2000. **24**(4): p. 487-506.
12. Bloom, A.J., *The increasing importance of distinguishing among plant nitrogen sources*. Current opinion in plant biology, 2015. **25**: p. 10-16.
13. Hemerly, A. *Genetic controls of biomass increase in sugarcane by association with beneficial nitrogen-fixing bacteria*. in *Plant and Animal Genome XXIV Conference. Plant and Animal Genome, during month of January*. 2016.
14. Quốc, L.C., N.T. Đơn, and C.N. Điệp, *Tuyển chọn và nhận diện vi khuẩn cố định đạm (có khả năng hòa tan lân và kali) phân lập từ vật liệu phong hóa của vùng núi đá hoa cương tại núi cấm, tỉnh an giang*. Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ, 2012(24a): p. 60-69.
15. Được, T.T. and N.H. Hiệp, *Phân lập và nhận diện vi khuẩn cố định đạm từ đất vùng rẫy cây bắp ở Đồng bằng sông Cửu Long*. Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ, 2022. **58**(2): p. 160-171.
16. Ladha, J.K., et al., *Biological nitrogen fixation and prospects for ecological intensification in cereal-based cropping systems*. Field Crops Research, 2022. **283**: p. 108541.
17. Raymond, J., et al., *The natural history of nitrogen fixation*. Molecular biology and evolution, 2004. **21**(3): p. 541-554.
18. Kim, J. and D. Rees, *Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein*. Science, 1992. **257**(5077): p. 1677-1682.
19. Ruvkun, G.B. and F.M. Ausubel, *A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes*. Nature, 1981. **289**(5793): p. 85-88.

20. Fischer, H.-M., *Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia*. Microbiological reviews, 1994. **58**(3): p. 352-386.
21. Dixon, R. and D. Kahn, *Genetic regulation of biological nitrogen fixation*. Nature Reviews Microbiology, 2004. **2**(8): p. 621-631.
22. Iniguez, A.L., Y. Dong, and E.W. Triplett, *Nitrogen fixation in wheat provided by Klebsiella pneumoniae 342*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2004. **17**(10): p. 1078-1085.
23. Spaepen, S. and J. Vanderleyden, *Auxin and plant-microbe interactions*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2011. **3**(4): p. a001438.
24. Glick, B.R., *Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world*. Microbiological research, 2014. **169**(1): p. 30-39.
25. Mayak, S., T. Tirosh, and B.R. Glick, *Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers*. Plant science, 2004. **166**(2): p. 525-530.
26. Spaepen, S., J. Vanderleyden, and R. Remans, *Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling*. FEMS microbiology reviews, 2007. **31**(4): p. 425-448.
27. Patten, C.L. and B.R. Glick, *Role of Pseudomonas putida indoleacetic acid in development of the host plant root system*. Applied and environmental microbiology, 2002. **68**(8): p. 3795-3801.
28. Nett, R.S., et al., *Elucidation of gibberellin biosynthesis in bacteria reveals convergent evolution*. Nature Chemical Biology, 2017. **13**(1): p. 69-74.
29. Miethke, M. and M.A. Marahiel, *Siderophore-based iron acquisition and pathogen control*. Microbiology and molecular biology reviews, 2007. **71**(3): p. 413-451.
30. Kuan, K.B., et al., *Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions*. PloS one, 2016. **11**(3): p. e0152478.
31. Hashem, A., et al., *Induction of osmoregulation and modulation of salt stress in Acacia gerrardii Benth. by arbuscular mycorrhizal fungi and Bacillus subtilis (BERA 71)*. BioMed Research International, 2016. **2016**(1): p. 6294098.
32. Radhakrishnan, R., A. Hashem, and E.F. Abd Allah, *Bacillus: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments*. Frontiers in physiology, 2017. **8**: p. 293128.
33. Trần Van, V., et al., *Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of Burkholderia vietnamiensis on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam*. Plant and Soil, 2000. **218**(1): p. 273-284.
34. Singh, R.K., N. Malik, and S. Singh, *Impact of rhizobial inoculation and nitrogen utilization in plant growth promotion of maize (Zea mays L.)*. Bioscience, 2013. **5**(1): p. 8-14.
35. Vial, L., et al., *The various lifestyles of the Burkholderia cepacia complex species: a tribute to adaptation*. Environmental microbiology, 2011. **13**(1): p. 1-12.
36. Muthukumarasamy, R., et al., *Isolation of bacterial strains possessing nitrogen-fixation, phosphate and potassium-solubilization and their inoculation effects on sugarcane*. Indian J. Exp. Biol, 2017. **55**: p. 161-170.
37. Kyaw, E., et al., *Isolation, characterization and rapid composting of cellulolytic nitrogen-fixing Bacteria for biofertilizer preparation*. Int J Plant Biol Res, 2018. **6**(4): p. 1095.
38. Richard, P.O., A.O. Adekanmbi, and A.A. Ogunjobi, *Screening of bacteria isolated from the rhizosphere of maize plant (Zea mays L.) for ammonia production and nitrogen fixation*. African Journal of Microbiology Research, 2018. **12**(34): p. 829-834.

39. Nohwar, N., R. Khandare, and N. Desai, *Isolation and characterization of salinity tolerant nitrogen fixing bacteria from Sesbania sesban (L) root nodules*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019. **21**: p. 101325.
40. Yu, F., et al., *Recombineering Pseudomonas protegens CHA0: an innovative approach that improves nitrogen fixation with impressive bactericidal potency*. Microbiological research, 2019. **218**: p. 58-65.
41. Wang, M., et al., *Effect of the nitrogen-fixing bacterium Pseudomonas protegens CHA0-ΔretS-nif on garlic growth under different field conditions*. Industrial Crops and Products, 2020. **145**: p. 111982.
42. Zhang, X., et al., *Isolation, identification and characterization of nitrogen fixing endophytic bacteria and their effects on cassava production*. PeerJ, 2022. **10**: p. e12677.
43. Huy, L.Q., *Báo cáo thực trạng sử dụng đất nông nghiệp và định hướng chuyển đổi xanh trong nông nghiệp Việt Nam*. Ủy ban Khoa học, Công nghệ và Môi trường của Quốc hội, 2025.
44. Tam, H.M., D.T.N. Thanh, and C.N. Diệp, *Functional and molecular characterization of plant growth promoting bacteria associated with sugarcane cultivated in Tay Ninh Province, Vietnam*. GSC Biol Pharm Sci, 2020. **11**(02): p. 265-277.
45. Lê, T.M.T., et al., *PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN NỘI SINH CỐ ĐỊNH ĐẠM TRONG CÂY ĐÌNH LẮNG (Polyscias fruticosa L. Harms)*. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, 2022. **20**(7): p. 863-872.
46. Nghĩa, N.K., et al., *Phân lập và tuyển chọn một số dòng vi khuẩn có khả năng hòa tan lân từ đất canh tác nhân tại tỉnh Vĩnh Long*. Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ, 2025. **61**(6): p. 210-221.
47. CHI, N.T.Y., N.L.K. MINH, and Q.V.C. THI, *Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wild rice (Oryza rufipogon) in the Mekong Delta, Vietnam*. Biodiversitas: Journal of Biological Diversity, 2025. **26**(3).
48. Phong, N.T., C.H.T. Chân, and P.T.B. Nguyên, *Hiệu quả của vi khuẩn cố định đạm Burkholderia vietnamiensis BV2 trên giống lúa IR50404 trồng ở Bình Minh-Vĩnh Long*. Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ, 2024. **60**: p. 366-373.
49. Hiệp, N.H. and N.T.M. Khanh, *Phân lập và nhận diện một số chủng vi khuẩn cố định nitơ trên cây bắp*. Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ, 2010(16a): p. 151-156.
50. Trần, T.Đ., et al., *Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn sinh tổng hợp phytase ngoại bào*. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, 2013. **11**(4): p. 558-564.
51. Thao, N.T.P. and N.K. Nghĩa, *Phosphate solubilization, indole-3-acetic acid synthesis and nitrogen fixation ability of various indigenous microorganism communities from different agriecosystem habitats*. CTU Journal of Innovation and Sustainable Development, 2018(Special issue on Agriculture): p. 39-48.
52. Nguyễn Huỳnh An, T., N. Trần Chí, and X. Lý Ngọc Thanh, *Ảnh hưởng của vi khuẩn cố định đạm và các mức bón phân đạm đến sinh trưởng, năng suất và hấp thu đạm của cây Bắp (Zea mays L.)*. 2022.
53. Tú, G.C. and V.L.H. Trang, *Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn chịu mặn tại huyện Cần Giờ, thành phố Hồ Chí Minh có hoạt tính cố định đạm và hòa tan lân*. Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ, 2024. **60**: p. 438-447.
54. Croxatto, A., G. Prod'hom, and G. Greub, *Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology*. FEMS microbiology reviews, 2012. **36**(2): p. 380-407.

55. Nagalla, A., et al., *Evaluating the growth performance of two Azotobacter spp. in liquid glucose broth and tryptic peptone broth as inoculum for the production of bio-fertilizers*. Tropical Agricultural Research, 2017. **28**(3).
56. Burk, D. and H. Lineweaver, *The influence of fixed nitrogen on Azotobacter*. Journal of Bacteriology, 1930. **19**(6): p. 389-414.
57. Jensen, H., *The azotobacteriaceae*. Bacteriological Reviews, 1954. **18**(4): p. 195-214.
58. Dobereiner, J. and J.M. Day, *Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites*. 1976.
59. Teather, R.M. and P.J. Wood, *Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen*. Applied and environmental microbiology, 1982. **43**(4): p. 777-780.
60. Cappuccino, J.G. and N. Sherman, *Microbiology: a laboratory manual*. 2005: Pearson/Benjamin Cummings San Francisco.
61. Atlas, R.M., *Handbook of microbiological media*. 2004: CRC press.
62. Utomo, W., H. Wu, and Y. Ng, *Quantification methodology of ammonia produced from electrocatalytic and photocatalytic nitrogen/nitrate reduction*. Energies (Basel) **16**: 27. 2022.
63. Gevers, D., G. Huys, and J. Swings, *Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of Lactobacillus species*. FEMS microbiology letters, 2001. **205**(1): p. 31-36.
64. Gordon, S.A. and R.P. Weber, *Colorimetric estimation of indoleacetic acid*. Plant physiology, 1951. **26**(1): p. 192.
65. Thanh, Đ.T.N., N.T.X. My, and C.N. Điệp, *Sự sản xuất IAA và siderophore của các dòng vi khuẩn liên hiệp thực vật và ảnh hưởng lên sự tăng trưởng của cây bắp (Zea mays L.) trồng trong chậu*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ Phần A: Khoa học Tự nhiên, Công nghệ và Môi trường, 2016. **46**: p. 59-67.
66. Lin, S., et al., *Recombinant glutamine synthetase originating from high ammonium-assimilating Bacillus subtilis effectively reduces NH₃ emissions and enhances the conversion into amino acids in liquid manure*. Environment International, 2025: p. 109844.
67. Ito, Y., et al., *Improvement of the nitrogenase activity in Escherichia coli that expresses the nitrogen fixation-related genes from Azotobacter vinelandii*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2024. **728**: p. 150345.
68. Mus, F., et al., *Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes*. Applied and environmental microbiology, 2016. **82**(13): p. 3698-3710.
69. Menge, D.N., et al., *Nitrogen fixation and fertilization have similar effects on biomass allocation in nitrogen-fixing plants*. Ecology and Evolution, 2024. **14**(9): p. e70309.
70. Xu, Q., et al., *Nitrogen inhibition of nitrogenase activity involves the modulation of cytosolic invertase in soybean nodule*. Journal of Genetics and Genomics, 2024. **51**(12): p. 1404-1412.
71. Zhang, W., et al., *Molecular mechanism and agricultural application of the NifA–NifL system for nitrogen fixation*. International journal of molecular sciences, 2023. **24**(2): p. 907.
72. Mus, F., et al., *Genetic determinants of ammonium excretion in nifL mutants of Azotobacter vinelandii*. Applied and Environmental Microbiology, 2022. **88**(6): p. e01876-21.
73. Liu, X., et al., *Nitrogen fixation and diazotroph diversity in groundwater systems*. The ISME Journal, 2023. **17**(11): p. 2023-2034.

74. Addison, H., et al., *Two distinct ferredoxins are essential for nitrogen fixation by the iron nitrogenase in Rhodobacter capsulatus*. Mbio, 2024. **15**(3): p. e03314-23.
75. Mohr, J.F., et al., *Hydroxypyridinones in nitrogen-fixing bacterial cultures: a metal buffer for molybdenum and simulation of natural conditions*. Metallomics, 2022. **14**(8): p. mfac055.
76. Leroux, J., P.B. Beauregard, and J.-P. Bellenger, *Azotobacter vinelandii N₂ fixation increases in co-culture with the PGPR Bacillus subtilis in a nitrogen concentration-dependent manner*. Applied and Environmental Microbiology, 2024. **90**(12): p. e01528-24.
77. Suthar, J. and S. Shamsi, *The occurrence and abundance of infective stages of zoonotic nematodes in selected edible fish sold in Australian fish markets*. Microbial pathogenesis, 2021. **154**: p. 104833.
78. Paetzel, M., *Structure and mechanism of Escherichia coli type I signal peptidase*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2014. **1843**(8): p. 1497-1508.
79. Wagner, S.C., *Biological nitrogen fixation*. Nature education knowledge, 2011. **3**(10): p. 15.

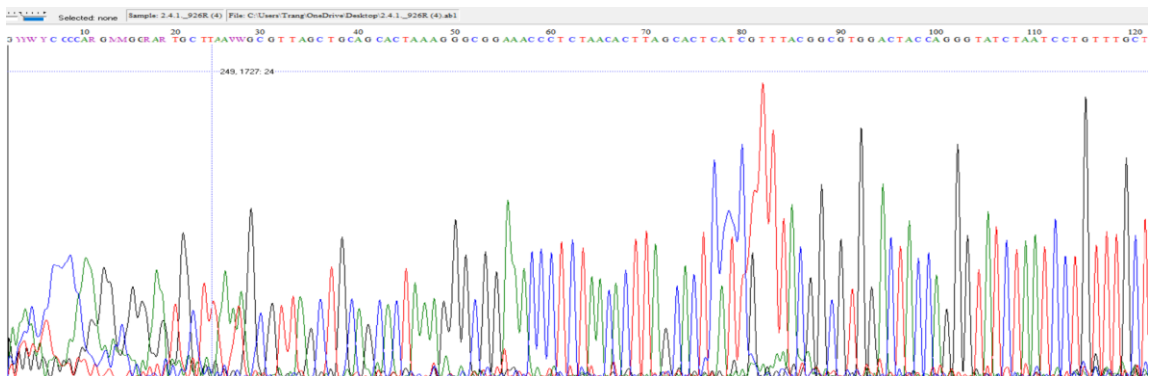
PHỤ LỤC

Bảng 1: Khả năng sinh NH_4^+ của chủng vi khuẩn 2.4.1

Nồng độ L tryptophan (mg L^{-1})	Nồng độ OD ($\text{OD}=530\text{nm}$)	Hàm lượng sinh ra IAA
0	0.0015	0.003
100	0.094	13.2708
200	0.156	26.1875
500	0.387	74.3125
700	0.408	78.6875

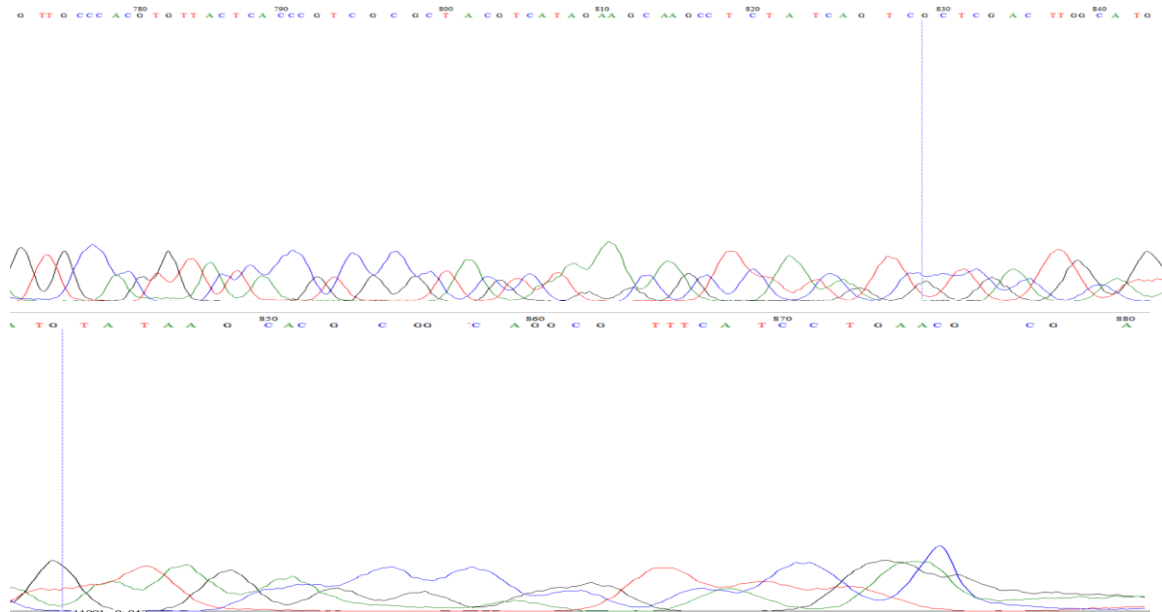
Trình tự nucleotide của phân đoạn 16S rRNA của chủng **2.4.1_926R**:

ACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG
GGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAG
GATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGGTTTCGGCTATCACTTACAGA
TGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGGTAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATG
CATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGAGCAAC
GCCGCGGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAGAAACTCTGTTGTTTAGGGAAGA
ACAAAGTACRGTAGTAAGTCTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAGCCCACGGCT
TCCACGTGTAGCGGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGACACCAGTGC GAAGGCGGCT
TTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTCCGCCCTTT
AGTGCTGCAGCTAACGCTATTAAAGCAGG



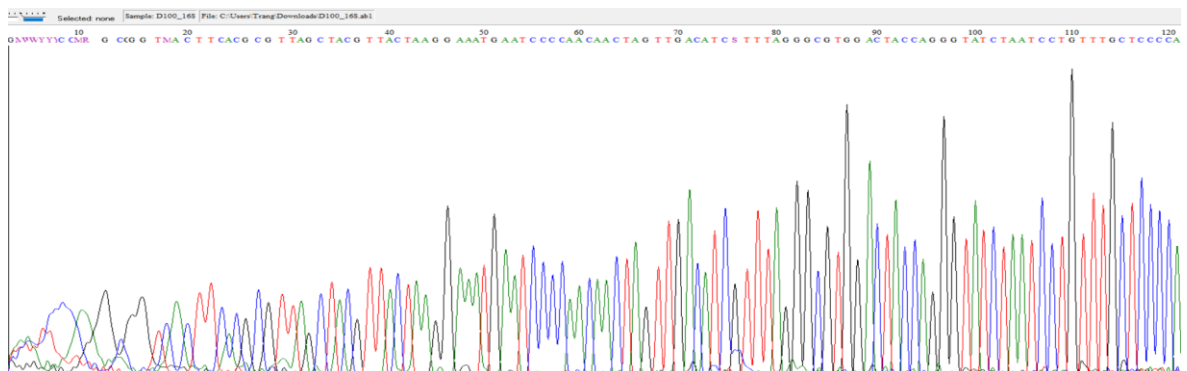






Trình tự nucleotide của phân đoạn 16S rRNA của chủng D100_16S.ab1:

TGCCAAGTCGAACGGCAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGT
 GAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATT
 AATACCGCATAACGATCCACGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATAG
 GGTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTGAAGGCCTACCAAGGCGACGA
 TCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT
 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCA
 ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTCGGGTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAGAAAT
 CCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAA
 CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGC AAGCGTTAATCGGAATTA CTG
 GCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGGCTAAGACCGATGTGAAATCCCGGGCTCAAC
 CTGGGA ACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTC
 CACGTGTAGCAGTGA AATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGC
 CCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACGGATTAGA
 TACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCCCTT
 AGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTGACCCGC





Trình tự nucleotide của phân đoạn 16S rRNA của chủng **CP100_16F.ab1**:

TGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTG
 AGTAATACATCGGAACATGTCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTA
 ATACCGCATAACGATCCACGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATAGG
 GTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGAT
 CAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGC
 AATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGA
 AATCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGC
 TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTA
 CTGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTCTAAGACCGATGTGAAATCCCGGGCTCA
 ACCTGGGAAGTGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAAT
 TCCACGTGTAGCAGTCAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCA
 GCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACGGATTA
 GATACCCTG

