

Đánh giá tiềm năng ứng dụng của *Azospirillum isscasi* có khả năng cố định đạm và sinh indole-3-acetic acid phân lập từ đất trồng lúa tại tỉnh Thái Nguyên
Nguyễn Mạnh Tuấn¹, Nguyễn Việt Hưng², Dương Thị Khuyên¹, Trần Văn Chí^{1*}

¹Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên,
phường Quyết Thắng, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam

²Học viện Dân tộc, xã Quang Minh, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 5/5/2026; ngày chuyển phản biện 7/5/2026;
ngày nhận phản biện 27/5/2026; ngày chấp nhận đăng 12/6/2026

Tóm tắt:

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tuyển chọn các chủng vi khuẩn bản địa có khả năng cố định đạm và sinh indole-3-acetic acid (IAA) cao từ đất trồng lúa ở một số xã miền núi tại Thái Nguyên. Từ 45 mẫu đất, đã phân lập được 16 chủng vi khuẩn tiềm năng, qua đó sơ tuyển được 3 chủng có hoạt tính cố định đạm và sinh IAA vượt trội, trong đó chủng NL2026 được đánh giá tốt nhất, thể hiện qua hiệu lực tăng cường của chúng đối với cây lúa sau 7 ngày gieo, với hàm lượng amoni tích lũy và sinh IAA lần lượt là 76,7 và 176,85 µg/ml giúp cây lúa có chiều dài rễ và chiều dài thân cao hơn so với đối chứng tương ứng là 50 và 17,41%. Trình tự gen 16S rRNA của chủng NL2026 so với các chủng chuẩn trên EzBioCloud có mức độ tương đồng 98,94% với *Azospirillum isscasi* C340-1^T, cùng nhánh với *Azospirillum isscasi* C340-1^T trên sơ đồ phả hệ nên được đặt tên là *Azospirillum isscasi* NL2026. Nuôi cấy chủng NL2026 trên môi trường Ashby ở 35°C, pH 6,5 với tốc độ lắc 150 vòng/phút cho khả năng tăng sinh khối mạnh nhất (đạt 8,94 log₁₀ CFU/ml). Với hoạt tính đã thể hiện, chủng NL2026 rất có tiềm năng ứng dụng trong nghiên cứu sản xuất chế phẩm để góp phần xây dựng nền nông nghiệp xanh và bền vững.

Từ khóa: *Azospirillum*, cố định đạm, đất trồng lúa, môi trường Ashby, sinh indole-3-acetic acid.

Chỉ số phân loại: 4.6

Evaluating the potential application of *Azospirillum isscasi* with nitrogen-fixing and indole-3-acetic acid-producing activities isolated from rice paddy soil in Thai Nguyen Province

Manh Tuan Nguyen¹, Viet Hung Nguyen², Thi Khuyen Duong¹, Van Chi Tran^{1*}

¹University of Agriculture and Forestry, Thai Nguyen University,
Quyet Thang Ward, Thai Nguyen Province, Vietnam

²Vietnam Academy for Ethnic Minorities, Quang Minh Commune, Hanoi, Vietnam

Received 5 May 2026; revised 27 May 2026; accepted 12 June 2026

*Tác giả liên hệ: Email: tranvanchi@tuaf.edu.vn

Abstract:

This study aimed to select indigenous bacterial strains with high nitrogen-fixing and indole-3-acetic acid (IAA) producing capacities from paddy soils collected in several mountainous communes of Thai Nguyen province. From 45 soil samples, 16 promising bacterial strains were isolated. Three strains with superior nitrogen fixation and IAA production were initially selected. Among these, strain NL2026 being the best, demonstrated by its enhanced efficacy on rice plants after 7 days of sowing. This strain exhibited an ammonium accumulation capacity of (76.7 $\mu\text{g/ml}$) and IAA production (176.85 $\mu\text{g/ml}$), and enhanced root length and shoot length of rice plants by 50 and 17.41%, respectively, compared to the control. The 16S rRNA gene sequence of strain NL2026, compared to standard strains on EzBioCloud, shows a 98.94% similarity to *Azospirillum isscasi* C340-1T, belonging to the same phylogenetic tree as *Azospirillum isscasi* C340-1T, named as *Azospirillum isscasi* NL2026. Cultivation of NL2026 in Ashby medium at 35°C, pH 6.5, with a shaking speed of 150 rpm resulted in optimal growth (reaching a maximum density of 8.94 $\log_{10}$ CFU/ml). Given its demonstrated bioactivities, strain NL2026 shows considerable potential for application in the development of biofertiliser products, contributing to the advancement of green and sustainable agriculture.

Keywords: *Azospirillum*, Ashby medium, indole-3-acetic acid production, nitrogen fixation, paddy soil.

Classification number: 4.6

1. Đặt vấn đề

Lúa là cây lương thực chủ lực tại Thái Nguyên, vào đầu những năm 2000, năng suất lúa của tỉnh còn ở mức tương đối thấp so với trung bình cả nước. Nhờ áp dụng tiến bộ khoa học kỹ thuật, mười năm trở lại đây, năng suất lúa đã bắt đầu tăng trưởng rõ rệt (đạt 5,5 tấn/ha) [1]. Cùng với yếu tố giống và biện pháp kỹ thuật, phân bón hóa học đóng vai trò quan trọng, trong đó phân đạm (N) là thành phần chiếm tỷ lệ cao nhất [2]. Tuy nhiên, việc lạm dụng phân đạm hóa học trong canh tác đã gián tiếp làm tăng quá trình khai thác tài nguyên hóa thạch tạo ra một lượng lớn khí nhà kính [3] gây ảnh hưởng đến môi trường sống, đồng thời trực tiếp xuất hiện nhiều mối nguy tiềm ẩn, như giảm độ phì và đa dạng sinh học của đất, ô nhiễm nguồn nước và ảnh hưởng đến sức khỏe của cộng đồng [4]. Trong khi đó, nguồn N_2 trong khí quyển rất dồi dào (chiếm tới 78%) nhưng cây trồng lại không thể sử dụng trực tiếp được [5]. Theo Y. Bashan và cs (1990) [6], nhiều loại vi khuẩn trong đất có thể cố định nitơ tự do thành đạm sinh học nhờ enzyme nitrogenase. Do đó, công tác nghiên cứu ứng dụng vi khuẩn có khả năng cố định đạm sinh học cho cây trồng có ý nghĩa

cấp thiết, vừa góp phần ổn định năng suất cây trồng, vừa thân thiện với môi trường và bảo vệ sức khỏe con người [7].

Indole-3-acetic acid (IAA) là phytohormone tăng trưởng thực vật, hoạt chất này nếu được tăng cường từ vi sinh vật sẽ giúp bộ rễ của cây lúa phát triển, đồng thời tăng số nhánh hữu hiệu và cải thiện năng suất từ 10-30% so với đối chứng [8]. Ngoài ra, IAA còn góp phần tăng khả năng chống chịu của cây lúa đối với stress như hạn, mặn và sâu bệnh nhờ cải thiện cấu trúc và chức năng của hệ rễ [9]. Đã có những công bố báo cáo rằng, ở một số chủng vi khuẩn, ngoài hoạt tính cố định đạm sinh học còn có khả năng tạo ra chất điều tiết sinh trưởng IAA và các hợp chất hữu cơ khác có lợi cho cây trồng [10, 11]. Nhóm vi khuẩn thể hiện đồng thời hai hoạt tính trên khá đa dạng, nhưng tập trung chủ yếu ở các chi như *Azospirillum*, *Gluconacetobacter* [12], *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Burkholderia* [13] và *Pseudomonas* [14].

Trong bối cảnh canh tác lúa thâm canh hiện nay phụ thuộc lớn vào phân đạm hóa học với hiệu suất sử dụng thấp (chỉ khoảng 30-50%), phần còn lại bị thất thoát do bay hơi, rửa trôi hoặc phát thải khí nhà kính, gây ô nhiễm môi trường và suy thoái đất [15], việc khai thác các vi sinh vật có khả năng cố định N_2 khí quyển thành dạng amoni dễ hấp thu đồng thời sinh điều tiết sinh trưởng IAA cho cây trồng là giải pháp sinh học có nhiều lợi ích, góp phần giảm thiểu sự phụ thuộc vào phân hóa học. Công tác tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng đồng thời cố định đạm và sinh tổng hợp indole-3-acetic acid vì vậy được xem là một hướng tiếp cận quan trọng nhằm phát triển các chế phẩm vi sinh và phân bón hữu cơ vi sinh phục vụ sản xuất lúa bền vững.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Các chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitơ và sinh IAA từ đất trồng lúa được thu thập tại một số xã miền núi thuộc tỉnh Thái Nguyên; Giống lúa thuần J02 được cung cấp bởi Chi cục Trồng trọt và Bảo vệ thực vật, tỉnh Thái Nguyên.

2.2. Thành phần môi trường sử dụng

Môi trường Ashby phân lập vi khuẩn cố định đạm gồm: 20,0 g/l mannitol; 0,2 g/l K_2HPO_4 ; 0,2 g/l $MgSO_4$; 0,2 g/l NaCl; 0,1 g/l K_2SO_4 ; 5,0 g/l $CaCO_3$ [16]. Môi trường nuôi cấy để xác định khả năng sinh IAA gồm môi trường Ashby +0,1% (w/v) L-tryptophan [17].

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thu mẫu đất

Mẫu đất lúa được thu thập tại 9 xã miền núi thuộc tỉnh Thái Nguyên (sau sát nhập), bao gồm: Tràng Xá, Ba Bể, Chợ Rã, Ngân Sơn, Nà Phặc, Chợ Đồn, Nà Rì, Thanh Mai và Nghiên Loan - mỗi xã thu 5 mẫu (tổng là 45 mẫu). Mẫu đất được thu

tại vùng rễ cây lúa (độ sâu 15 cm), mỗi điểm lấy khoảng 100 g đất, loại bỏ tạp chất thô, cho vào túi vô trùng và bảo quản ở 4°C cho đến khi phân tích. Việc lấy mẫu và xử lý mẫu được thực hiện theo TCVN 7538-6:2010 [18].

2.3.2. Phân lập vi khuẩn có khả năng cố định đạm

Vi khuẩn cố định đạm được phân lập từ mẫu đất trên môi trường Ashby theo mô tả của N.T.T. Hang và cs (2015) [16]. 10 g đất hòa với 90 ml nước cất vô trùng và tiếp tục được pha loãng đến nồng độ 10^{-6} , sau đó lấy 0,1 ml dịch đã pha loãng trải đều trên bề mặt môi trường thạch Ashby và ủ ở 30°C trong 3-7 ngày. Các khuẩn lạc riêng rẽ xuất hiện trên thạch đĩa được lựa chọn và tiếp tục cấy chuyển nhiều lần trên cùng môi trường để thuần khiết, phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.3.3. Xác định hàm lượng amoni tích lũy của vi khuẩn

Khả năng cố định đạm của các chủng mới phân lập được đánh giá thông qua sự tích lũy NH_4^+ trong môi trường nuôi cấy theo mô tả của N.T.T. Hang và cs (2015) [16]. Chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường Ashby ở 30°C, lắc 120 vòng/phút trong 7 ngày, dịch nuôi được cho phản ứng với thuốc thử Nessler và đo mật độ quang bằng máy quang phổ UV-Vis ở bước sóng 425 nm. Xác định hàm lượng NH_4^+ dựa trên đường chuẩn được xây dựng từ dung dịch NH_4^+ chuẩn đã xử lý tương tự với thuốc thử Nessler với phương trình hồi quy thực nghiệm $y = 0,0124x - 0,0037$ ($R^2=0,997$).

2.3.4. Xác định khả năng sinh IAA của vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường Ashby có bổ sung L-tryptophan (0,1%, w/v) ở 30°C, lắc 120 vòng/phút trong 7 ngày. Sau nuôi cấy, dịch nuôi được thu nhận và xác định khả năng sinh tổng hợp IAA theo phương pháp của E. Glickmann và cs (1995) [17]. Dịch nuôi cấy được phản ứng với thuốc thử Salkowski tạo phức màu hồng, mật độ quang được đo ở bước sóng 530 nm. Xác định hàm lượng IAA dựa trên đường chuẩn xây dựng từ dung dịch IAA chuẩn với phương trình hồi quy thực nghiệm $y = 0,0134x + 0,1591$ ($R^2=0,9998$).

2.3.5. Đánh giá hiệu lực tăng cường của các chủng vi khuẩn lên cây lúa trong ống nghiệm

Sử dụng quy trình theo mô tả của L.T.A. Hong và cs (2025) [19], hạt lúa giống được khử trùng bề mặt bằng cách ngâm 3 phút trong dung dịch cồn 70 độ, sau đó loại bỏ cồn và chuyển hạt giống vào bình chứa dung dịch hydrogen peroxide 3% và ngâm thêm 3 phút rồi rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần. Tiếp tục ngâm hạt trong nước cất vô trùng và ủ ở 30°C trong 2 ngày để hạt nảy mầm, khi chiều dài mầm đạt 1 cm thì đem gieo. Các chủng vi khuẩn được nuôi lắc 120 vòng/phút trên môi trường Ashby lỏng ở 30°C, trong 7 ngày. Đất màu được sàng kỹ để loại bỏ tạp chất, cân chính xác 50 g cho vào ống falcon dung tích 50 cm³ và đem khử trùng ở 121°C trong 15 phút. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn

chỉnh với đối chứng. (CT1) là ống nghiệm gieo hạt không bổ sung dịch vi khuẩn, chỉ bổ sung nước, các CT còn lại được bổ sung 100 μ l dịch nuôi đã chuẩn bị ở trên, mỗi ống nghiệm gieo 01 hạt giống và liên tục giữ mức nước xấp bề mặt. Các chỉ tiêu theo dõi sau 7 ngày gieo cấy gồm: Chiều dài rễ (cm); chiều dài thân (cm).

2.3.6. Định danh chủng tuyển chọn bằng sinh học phân tử

Chủng vi khuẩn tuyển chọn được hoạt hóa trong môi trường dịch thể Ashby ở 30°C, lắc 120 vòng/phút trong 72 giờ. Tách chiết DNA tổng số theo mô tả của J. Sambrook và cs (2001) [20]. Trình tự gen 16S rRNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi 27F và 1492R, thành phần phản ứng và điều kiện chu trình nhiệt theo mô tả của A. Klindworth và cs (2013) [21]. Sản phẩm PCR sau đó được giải trình tự trên hệ thống Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer sử dụng bộ kit BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 (Macrogen, Hàn Quốc). Dữ liệu trình tự thu được được so sánh với cơ sở dữ liệu EzBioCloud, đồng thời phân tích bằng phần mềm MEGA version 12 [22] nhằm xác định vị trí phân loại của chủng.

2.3.7. Khảo sát các thông số trong nuôi cấy chủng tuyển chọn

Các thông số liên quan đến việc nuôi cấy của chủng vi khuẩn tuyển chọn được khảo sát bao gồm nhiệt độ, pH môi trường và tốc độ lắc khi nuôi trên môi trường Ashby với chỉ tiêu đánh giá là mật độ tế bào được xác định thông qua giá trị mật độ quang (OD_{600}). Ảnh hưởng của nhiệt độ được khảo sát trong khoảng 20-40°C (bước nhảy 5°C) với tốc độ lắc 120 vòng/phút. Nhiệt độ cho mật độ tế bào cao nhất được lựa chọn cho các thí nghiệm xác định pH môi trường phù hợp. pH môi trường được điều chỉnh trong khoảng 5,0-7,5 (bước nhảy 0,5) (khoảng pH khảo sát bao trùm giá trị pH trung bình tại các điểm lấy mẫu, dao động từ 5,5-7,0). Giá trị pH cho sinh trưởng cao nhất được sử dụng để khảo sát ảnh hưởng của tốc độ lắc. Tốc độ lắc được khảo sát trong khoảng 90-240 vòng/phút.

2.3.8. Xử lý số liệu

Dữ liệu thí nghiệm được xử lý bằng Microsoft Excel và phân tích thống kê bằng JASP version 0.95.4.0.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có hoạt tính cố định đạm và tổng hợp IAA

Từ 45 mẫu đất trồng lúa thu tại 9 xã miền núi của tỉnh Thái Nguyên, sử dụng môi trường không đạm (Ashby) phân lập được 16 chủng vi khuẩn. Các chủng vi khuẩn mới phân lập được có khả năng sống trên môi trường không đạm cho phép kết luận sơ bộ rằng chúng có khả năng cố định đạm [23]. Hoạt tính cố định đạm, sinh IAA của các chủng được thể hiện tại bảng 1.

Bảng 1. Khả năng cố định đạm và sinh IAA các chủng mới phân lập.

Ký hiệu chủng	Địa phương thu mẫu đất phân lập	Hàm lượng amoni tích lũy ($\mu\text{g/ml}$)	Khả năng sinh IAA ($\mu\text{g/ml}$)	Ký hiệu chủng	Địa phương thu mẫu đất phân lập	Hàm lượng amoni tích lũy ($\mu\text{g/ml}$)	Khả năng sinh IAA ($\mu\text{g/ml}$)
MG2025	Mỏ Gà - Trảng Xá	32,5 ^g $\pm$ 0,241	80,56 ⁱ $\pm$ 0,413	NT2026	Nà Tùm - Chợ Đồn	24,8 ^e $\pm$ 0,202	43,52 ^f $\pm$ 0,256
NK2025	Nà Kiêng - Ba Bể	75,9 ^k $\pm$ 0,701	168,33 ^m $\pm$ 0,814	PK2026	Phía Khao - Chợ Đồn	22,0 ^{cd} $\pm$ 0,411	36,11 ^d $\pm$ 0,398
PN2025	Pác Ngòi - Ba Bể	41,3 ⁱ $\pm$ 0,481	143,52 ^l $\pm$ 0,341	KC2024	Khuổi Cò - Nà Ri	78,6 ^l $\pm$ 0,862	175,3 ⁿ $\pm$ 0,904
NM2023	Nà Mẩn - Chợ Rã	30,6 ^f $\pm$ 0,253	65,74 ^h $\pm$ 0,561	PD2024	Pò Đuổng - Nà Ri	38,2 ^h $\pm$ 0,143	106,48 ^k $\pm$ 0,514
PN2023	Pác Nghè - Chợ Rã	21,4 ^e $\pm$ 0,316	36,11 ^d $\pm$ 0,167	BL2025	Boóc Lây - Thanh Mai	18,3 ^a $\pm$ 0,264	25,0 ^a $\pm$ 0,114
TY2025	Tân Ý I - Ngân Sơn	36,9 ^h $\pm$ 0,145	102,78 ^j $\pm$ 0,344	KV2026	Khâu Nền - Nghiên Loan	20,6 ^{bc} $\pm$ 0,302	32,41 ^c $\pm$ 0,356
PS2025	Phiêng Sảng - Nà Phặc	52,4 ⁱ $\pm$ 0,716	54,63 ^s $\pm$ 0,845	KX2026	Khuổi Xỏo - Nghiên Loan	19,5 ^{ab} $\pm$ 0,605	28,7 ^b $\pm$ 0,617
NC2025	Nà Chúa - Nà Phặc	23,1 ^d $\pm$ 0,215	39,81 ^c $\pm$ 0,417	NL2026	Nà Lại - Nghiên Loan	76,7 ^k $\pm$ 0,713	176,85 ⁿ $\pm$ 0,911

Các giá trị trong cùng một cột đi kèm ký tự khác nhau biểu thị sự khác nhau có nghĩa ở mức $\alpha=0,05$; $\pm$ trong các bảng là $\pm\text{SD}$.

Kết quả bảng 1 cho thấy, hàm lượng amoni tích lũy của các chủng vi khuẩn ở mức độ khác nhau và dao động trong khoảng từ 18,3 đến 78,6 $\mu\text{g/ml}$. Kết quả này cao hơn công bố trước đó của N.T.P. Oanh và cs (2013) [24] khi tuyển chọn 15 chủng vi khuẩn được phân lập từ đất vùng rễ cây lúa trồng tại Trà Vinh (trước sấp nhập) và Cần Thơ (hiệu quả cố định đạm dao động từ 2,29 đến 4,67 $\mu\text{g/ml}$). Trong 16 chủng mới phân lập, KC2024 thể hiện hoạt tính cố định đạm cao nhất (đạt 78,6 $\mu\text{g/ml}$) khác biệt có ý nghĩa so với các chủng còn lại. Tiếp đến là các chủng NK2025 và NL2026 (75,9-76,7 $\mu\text{g/ml}$) tương đương nhau sai khác không có ý nghĩa. Về chất điều tiết sinh trưởng IAA, 16 chủng mới phân lập đều có khả năng tạo mới IAA với mức độ khác nhau (dao động 25,0-176,85 $\mu\text{g/ml}$), trong đó, cao nhất là chủng NL2026 (176,85 $\mu\text{g/ml}$), tiếp theo là KC2024 (175,3 $\mu\text{g/ml}$), chênh lệch chỉ trong phạm vi sai số và cao hơn có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại. Kết quả nghiên cứu này tương đồng và cao hơn khi so sánh với công bố của P. Chumpoo và cs (2018) [25] về khả năng sinh IAA của 6 chủng vi

khảo được phân lập từ đất trồng lúa tại Thái Lan (dao động từ 1,4 đến 28,0 $\mu\text{g/ml}$). Như vậy, trong số các chủng mới phân lập, 3 chủng (NK2025, KC2024 và NL2026) thể hiện được sự nổi trội ở cả 2 hoạt tính cố định đạm và sinh IAA. Để tiếp tục sàng lọc, chúng tôi tiến hành đánh giá ảnh hưởng của chúng đến sự phát triển của cây lúa ở giai đoạn non [19], với hai tiêu chí quan trọng là chiều dài rễ và chiều dài thân. Kết quả được thể hiện tại bảng 2 và hình 1.

Bảng 2. Hiệu lực tăng cường của vi khuẩn đến sự phát triển của cây lúa sau 7 ngày gieo.

STT	Công thức	Chiều dài rễ (cm)	Chiều dài thân (cm)
1	Đối chứng	8,4 ^a ±0,23	10,9 ^a ±0,14
2	NK2025	10,7 ^b ±0,11	11,6 ^b ±0,32
3	KC2024	11,3 ^b ±0,15	12,1 ^b ±0,17
4	NL2026	12,6 ^c ±0,41	12,8 ^c ±0,26

Các giá trị trong cùng một cột đi kèm ký tự khác nhau biểu thị sự khác nhau có nghĩa ở mức $\alpha=0,05$.

Có thể nhận thấy: 7 ngày sau khi gieo, chiều dài thân và rễ của cây lúa có sự khác biệt rõ rệt giữa công thức được xử lý dịch vi khuẩn và công thức đối chứng, trong đó, dịch nuôi chủng NL2026 cho chiều dài rễ và thân lúa cao nhất so với các công thức còn lại ở mức có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) (đạt 12,6 và 12,8 cm), cao hơn so với đối chứng lần lượt là 50 và 17,4%. Hai chủng NK2025 và KC2024 có tác động gần như tương đương nhau đến sinh trưởng cây lúa và thấp hơn có ý nghĩa so với chủng NL2026. Như vậy, chủng NL2026 thể hiện được tiềm năng ứng dụng cao nhất trong số các chủng đã được sơ tuyển và được lựa chọn để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.



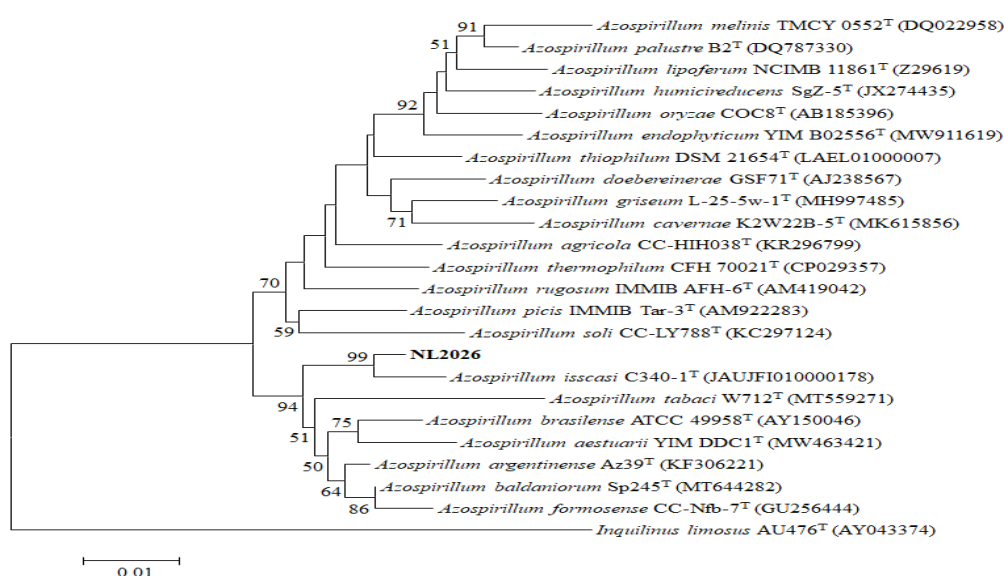
Hình 1. Cây lúa sau 7 ngày gieo.

3.2. Định danh chủng tuyển chọn

Trình tự gen 16S rRNA của chủng NL2026 nhận diện với các chủng chuẩn đã công bố thông qua dữ liệu EzBioCloud biểu thị mức độ tương đồng 98,94% với *Azospirillum isscasi* C340-1^T (JAUJFI010000178); 98,52% với *Azospirillum baldaniorum* Sp245^T (MT644282); 98,06% với *Azospirillum argentinense* Az39^T (KF306221) và từ 96,41-97,63% với các chủng chuẩn khác thuộc chi *Azospirillum* (bảng 3).

Bảng 3. Kết quả so sánh trình tự gen 16S rRNA của chủng NL2026 với các chủng chuẩn gần nhất công bố trên dữ liệu EzBioCloud.

Chủng chuẩn gần nhất	Độ tương đồng từng cặp (%)	Mức độ che phủ (%)	Nguồn tham khảo
<i>Azospirillum isscasi</i> C340-1 ^T (JAUJFI010000178)	98,94	100,00	[26]
<i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp245 ^T (MT644282)	98,52	99,21	[27]
<i>Azospirillum argentinense</i> Az39 ^T (KF306221)	98,06	100,00	[28]
<i>Azospirillum formosense</i> CC-Nfb-7 ^T (GU256444)	97,63	100,00	[29]
<i>Azospirillum aestuarii</i> YIM DDC1 ^T (MW463421)	97,38	98,67	[30]
<i>Azospirillum brasilense</i> ATCC 49958 ^T (AY150046)	97,37	100,00	[31]
<i>Azospirillum picis</i> IMMIB Tar-3 ^T (AM922283)	96,91	99,51	[32]
<i>Azospirillum rugosum</i> IMMIB AFH-6 ^T (AM419042)	96,91	99,08	[33]
<i>Azospirillum palustre</i> B2 ^T (DQ787330)	96,53	99,08	[34]
<i>Azospirillum griseum</i> L-25-5w-1 ^T (MH997485)	96,41	100,00	[35]
<i>Azospirillum tabaci</i> W712 ^T (MT559271)	96,41	100,00	[36]



Hình 2. Sơ đồ phả hệ của chủng NL2026 với thành viên gần nhất thuộc chi *Azospirillum* dựa vào trình tự gen 16S rRNA. *Inquilinus limosus* AU476^T (AY043374) được sử dụng ngoài chi *Azospirillum*.

Kết quả thể hiện ở bảng 3 cho thấy, chủng NL2026 có sự tương đồng cao nhất (98,94%) với *Azospirillum isscasi* C340-1^T, nằm trong giới hạn ($\geq 98,6\%$) với chủng đã được mô tả thuộc cùng một chi [37]. Bên cạnh đó, sơ đồ phả hệ cũng chỉ ra rằng chủng NL2026 xếp vào nhóm của chi *Azospirillum* và cùng nhánh với *Azospirillum isscasi* C340-1^T. Vị trí phân loại của chủng NL2026 được bảo đảm giá trị tin cậy (giá trị bootstrap) là 99% (hình 2). Các dữ liệu trên khẳng định chủng NL2026 được phân loại là *Azospirillum isscasi* và được đặt tên là *Azospirillum isscasi* NL2026.

3.3. Các thông số liên quan đến nuôi cấy chủng tuyển chọn

Chi *Azospirillum* là nhóm vi khuẩn vùng rễ nổi bật với khả năng cố định đạm sinh học và sản xuất các chất điều tiết sinh trưởng thực vật như IAA. Nhờ những đặc tính này, *Azospirillum* được xem là vi khuẩn kích thích sinh trưởng thực vật quan trọng trong nông nghiệp bền vững [38]. Tuy nhiên, khả năng tăng sinh và biểu hiện hoạt tính sinh học của *Azospirillum* phụ thuộc chặt chẽ vào điều kiện nuôi cấy, đặc biệt là nhiệt độ, pH và tốc độ lắc. Việc tối ưu hóa các yếu tố này có ý nghĩa quan trọng trong nghiên cứu cơ bản cũng như sản xuất chế phẩm vi sinh [39].

Nhiệt độ là yếu tố then chốt chi phối hoạt động enzyme và tốc độ trao đổi chất của vi khuẩn [38]. Kết quả bảng 4 cho thấy, ở các mức nhiệt độ nuôi khác nhau khả năng tích lũy sinh khối của chủng NL2026 khác nhau ở mức có ý nghĩa thống kê, trong đó nuôi ở 35°C cho mật độ tế bào cao nhất (8,65 log₁₀ CFU/ml) và thấp nhất khi nuôi ở 20°C (6,57 log₁₀ CFU/ml). Theo công bố của F.R. Perdomo và cs (2015) [40] cho thấy, chủng *Azospirillum brasilense* C16 có khả năng tăng sinh tối ưu ở 30°C. Điều này cho thấy, sự khác biệt về nhiệt độ thích hợp để vi khuẩn tăng sinh tốt nhất phụ thuộc vào chủng vi sinh vật và sự biến đổi của chúng [41], nghĩa là đặc điểm của giống quyết định điều kiện thích hợp cho sự sinh trưởng [42].

Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của chủng tuyển chọn.

STT	Nhiệt độ nuôi cấy (°C)	Mật độ tế bào (log ₁₀ CFU/ml)
1	20	6,57 ^a ±0,03
2	25	7,36 ^c ±0,02
3	30	8,18 ^d ±0,03
4	35	8,65 ^e ±0,01
5	40	6,74 ^b ±0,04

Các giá trị trong cùng một cột đi kèm ký tự khác nhau biểu thị sự khác nhau có nghĩa ở mức $\alpha=0,05$.

Đồng thời, theo A.D. Didonet và cs (1997) [43], với vi khuẩn *Azospirillum* khi nuôi ở mức nhiệt độ dưới 25°C, tốc độ sinh trưởng giảm rõ rệt do hoạt tính enzyme bị hạn chế, dẫn đến OD₆₀₀ tăng chậm và thời gian đạt pha log kéo dài. Ngược lại, ở nhiệt độ trên

37°C, một số chủng có thể tăng trưởng nhanh giai đoạn đầu nhưng dễ bị ức chế do biến tính protein và rối loạn màng tế bào. Như vậy đối với chủng NL2026, nhiệt độ nuôi cấy thích hợp là 35°C, nhiệt độ này sẽ được lựa chọn để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 5. Ảnh hưởng của pH môi trường đến sinh trưởng của chủng tuyển chọn.

STT	pH môi trường	Mật độ tế bào (log ₁₀ CFU/ml)
1	5,0	6,02 ^a ±0,02
2	5,5	6,69 ^b ±0,01
3	6,0	7,18 ^c ±0,015
4	6,5	8,86 ^e ±0,012
5	7,0	8,64 ^d ±0,031
6	7,5	6,74 ^b ±0,04

Các giá trị trong cùng một cột đi kèm ký tự khác nhau biểu thị sự khác nhau có nghĩa ở mức $\alpha=0,05$.

Kết quả bảng 5 cho thấy, pH môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng rất rõ rệt đến mật độ tế bào NL2026. Cụ thể, mật độ tăng dần từ pH 5,0 (6,02 log₁₀ CFU/ml) đến 6,5 và đạt cực đại tại pH 6,5 (8,86 log₁₀ CFU/ml), sau đó giảm nhẹ ở pH 7,0 (8,64 log₁₀ CFU/ml) và giảm mạnh ở pH 7,5 (6,74 log₁₀ CFU/ml). Xu hướng này phản ánh một đường cong sinh trưởng điển hình theo pH, trong đó tồn tại một khoảng pH tối ưu hẹp cho sự phát triển cực đại của chủng. Theo H. Dahm và cs (1993) [44], sự sinh trưởng của *Azospirillum* phụ thuộc mạnh vào pH và thường đạt hiệu quả cao trong khoảng pH 5,5-6,5. Kết quả của nghiên cứu này cũng tương đồng với công bố của T.M. Pham và cs (2022) [45] khi báo cáo rằng, *Azospirillum* thường phát triển tốt trong khoảng pH trung tính hoặc axit yếu, pH tối ưu cho sinh trưởng của *Azospirillum brasilense* là pH 6,5. Tuy nhiên, có thể thấy sự khác biệt nhất định về giá trị pH tối ưu với các loài khác của *Azospirillum* như công bố của S. Zhou và cs (2013) [46] khi mô tả loài *Azospirillum humicireducens* cho thấy chúng có thể sinh trưởng trong khoảng pH 5,5-8,5, với pH tối ưu khoảng 7,2. Điều này cho thấy, sự khác biệt giữa các loài hoặc chủng của chi *Azospirillum*, cũng như sự phụ thuộc vào điều kiện nuôi cấy. Bên cạnh đó, xu hướng giảm mật độ tế bào khi pH tăng từ 6,5 lên 7,5 cũng phù hợp với công bố của S.A. Konnova và cs (2003) [47] khi cho rằng khi pH tăng, cân bằng ion trong tế bào bị thay đổi, ảnh hưởng đến khả năng vận chuyển chất qua màng và làm giảm hiệu suất sinh trưởng. Theo đó, khi nuôi cấy *Azospirillum brasilense* trong môi trường có pH kiềm yếu, thời gian pha lũy thừa bị rút ngắn và hiệu suất sinh trưởng giảm rõ rệt. Điều này giải thích vì sao ở pH 7,5 mật độ tế bào trong thí nghiệm giảm đáng kể so với pH tối ưu (6,5).

Theo Y. Okon (1985) [48], tốc độ lắc là một trong những yếu tố kỹ thuật quan trọng nhất quyết định hiệu quả nuôi cấy vi khuẩn *Azospirillum*. Do *Azospirillum* thuộc nhóm vi khuẩn vi hiếu khí, khả năng tích lũy sinh khối của chúng nhạy cảm đặc biệt với nồng độ oxy hòa tan trong môi trường - yếu tố bị chi phối trực tiếp bởi tốc độ lắc, việc kiểm soát chặt chẽ áp suất oxy là điều kiện tiên quyết để tối ưu hóa sự tăng trưởng của các loài trong chi này, vì nồng độ oxy quá cao sẽ gây ức chế quá trình chuyển hóa năng lượng đặc thù [49]. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sinh trưởng của chủng NL2026 được trình bày tại bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sinh trưởng của chủng tuyển chọn.

STT	Tốc độ lắc (vòng/phút)	Mật độ tế bào ($\log_{10}$ CFU/ml)
1	90	6,52 ^a ±0,011
2	120	8,86 ^c ±0,02
3	150	8,94 ^d ±0,034
4	180	8,96 ^d ±0,013
5	210	8,84 ^c ±0,01
6	240	8,73 ^c ±0,016

Các giá trị trong cùng một cột đi kèm ký tự khác nhau biểu thị sự khác nhau có nghĩa ở mức $\alpha=0,05$.

Kết quả bảng 6 cho thấy, tốc độ lắc có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng tích lũy sinh khối của chủng NL2026. Khi tốc độ lắc tăng từ 90 đến 180 vòng/phút, tốc độ tăng sinh của chủng cũng tăng theo và đạt giá trị lớn nhất tại 180 vòng/phút, nhưng sự chênh lệch so với 150 vòng/phút (8,94-8,96 $\log_{10}$ CFU/ml) chỉ nằm trong phạm vi sai số và nếu tiếp tục tăng tốc độ lắc khả năng tích lũy sinh khối của chủng giảm đáng kể. Điều này có thể do khi tốc độ lắc tăng, diện tích tiếp xúc giữa pha lỏng và pha khí được mở rộng, làm gia tăng hệ số chuyển khối oxy, đồng thời giúp các tế bào vi khuẩn phân tán đều và tối ưu hóa tiếp xúc với nguồn dinh dưỡng. Kết quả này phù hợp với nhận định của T.M. Tien và cs (1979) [50] khi cho rằng tốc độ lắc quá thấp, môi trường rơi vào trạng thái thiếu oxy, làm chậm quá trình trao đổi chất. Ngược lại, nếu tốc độ quá cao, nồng độ oxy hòa tan vượt ngưỡng sẽ tạo ra các gốc tự do làm tổn thương tế bào. Đồng thời, việc lắc quá mạnh sẽ tạo lực cắt lớn có thể phá vỡ cấu trúc màng tế bào, làm giảm tỷ lệ sống sót. Kết quả của nghiên cứu này có sự tương đồng với công bố của V.T.P. Nhu và cs (2014) [51], S. Yaadesh và cs (2023) [49] khi chỉ ra rằng tốc độ lắc tối ưu cho *Azospirillum amazonense* thường dao động quanh mức 120-150 vòng/phút, tại đó, mật độ tế bào thu được cao nhất. Một nghiên cứu khác cũng ghi nhận tốc độ lắc khoảng 140-150 vòng/phút là phù hợp để duy trì sinh trưởng của *Azospirillum* [52]. Như vậy, xem xét ảnh hưởng của tốc độ lắc đến khả năng tăng sinh, đồng thời để tiết kiệm chi phí điện năng trong công nghệ lên men, 150 vòng/phút là tốc độ lắc thích hợp được lựa chọn để nuôi cấy NL2026.

4. Kết luận

16 chủng vi khuẩn phân lập từ 45 mẫu đất tại các điểm trồng lúa tỉnh Thái Nguyên có khả năng cố định đạm và sinh IAA, trong đó 3 chủng có hoạt tính cao nhất là KC2024, NK2025 và NL2026. Trong 3 chủng được sơ tuyển, chủng NL2026 cùng với khả năng tích lũy amoni và sinh IAA cao (các giá trị lần lượt là 76,7 và 176,85 $\mu\text{g/ml}$) còn có tác động tốt đến sinh trưởng cây lúa, thể hiện qua sự tăng chiều rễ và chiều dài thân cây lúa cao nhất (50,00 và 17,41% cao hơn so với đối chứng). So sánh trình tự gen 16S rRNA của chủng NL2026 với các chủng chuẩn trên EzBioCloud cho mức độ tương đồng cao nhất với *Azospirillum isscasi* C340-1^T (98,94%). Trên sơ đồ phả hệ, chủng NL2026 cũng nằm cùng nhánh với *Azospirillum isscasi* C340-1^T nên được đặt tên là *Azospirillum isscasi* NL2026. Nuôi cấy chủng NL2026 trên môi trường Ashby không p<0,05 đạm ở 35°C, pH6,5 với tốc độ lắc 150 vòng/phút cho khả năng tăng sinh mạnh nhất (đạt 8,94 log₁₀ CFU/ml).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] N.T. Quynh, H.K. Dieu, V.T. Nguyen, et al. (2023), “Assessing current paddy rice cultivation in Thai Nguyen province of Vietnam”, *Thai Nguyen University Journal of Science and Technology*, **228(09)**, pp.59-66, DOI: 10.34238/tnu-jst.6514.

[2] N.Q. Khuong, N.V. Nghia, T.V. Hung, et al. (2016), “Effects of NPK fertilizer application on rice growth and yield on acid sulphate soils in the Mekong Delta”, *Can Tho University Journal of Science*, **43(B)**, pp.24-34, DOI: 10.22144/ctu.jvn.2016.042 (in Vietnamese).

[3] J.R. Stoltzfus, R. So, P.P. Malaravithi, et al. (1997), “Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen”, *Plant and Soil*, **194**, pp.25-36.

[4] J.N. Bhaduri, P. Kundu, D. Mitra, et al. (2016), “Isolation and characterisation of nitrogen fixing bacteria (*Azotobacter* sp.) from tea field soil of Dooars and Darjeeling region of North Bengal, India”, *International Journal of Engineering Science Invention*, **5(8)**, pp.46-51.

[5] H.D. Santa, R.F. Hernández, G. Michelena, et al. (2004), “*Azospirillum* sp. inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments”, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **47(6)**, pp.843-850, DOI: 10.1590/S1516-89132004000600002.

[6] Y. Bashan, H. Levanony (1990), “Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture”, *Canadian Journal of Microbiology*, **36(9)**, pp.591-603, DOI: 10.1139/M90-105.

[7] N.Q. Khuong, L.V. Thuc, T.C. Nhan, et al. (2019), “Effects of biofertilizers containing different nitrogen fixing bacteria on growth and yield of rice cultivated on acid sulfate soil in Hon Dat under the nethouse conditions”, *Can Tho University Journal of Science*, **52(2)**, pp.89-94, DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.048 (in Vietnamese).

[8] S. Spaepen, J. Vanderleyden, R. Remans (2007), “Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling”, *FEMS Microbiology Reviews*, **31(4)**, pp.425-448, DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x.

[9] M. Chieb, E.W. Gachomo (2023), “The role of plant growth promoting rhizobacteria in plant drought stress responses”, *BMC Plant Biology*, **23**, DOI: 10.1186/s12870-023-04403-8.

[10] S. Mehnaz, G. Lazarovits (2006), “Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions”, *Microbial Ecology*, **51**, pp.326-335, DOI: 10.1007/s00248-006-9039-7.

[11] N.A. Huy, N.H. Hiep (2018), “Isolation and identification of salt tolerant bacteria capable in nitrogen fixation and IAA synthesis from rice - shrimp soils in Bac Lieu, Soc Trang and Kien Giang provinces”, *Can Tho University Journal of Science*, **54(1)**, pp.7-12, DOI: 10.22144/ctu.jvn.2018.002 (in Vietnamese).

[12] D.K. Nhung, V.T. Cong (2011), “Investigation of the IAA synthesis and nitrogen fixation ability of *Gluconacetobacter* sp. and *Azospirillum* sp. isolated from sugarcane”, *Can Tho University Journal of Science*, **18a**, pp.161-167 (in Vietnamese).

[13] B.T. Dao, N.T. Phong, C.N. Diep (2021), “Isolation and identification of endophytic bacteria capable of nitrogen fixation, phosphorus solubilisation, and IAA synthesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.) grown in three mountainous districts of Binh Dinh province”, *Can Tho University Journal of Science*, **57(6)**, pp.125-131, DOI: 10.22144/ctu.jvn.2021.179 (in Vietnamese).

[14] H.B. Li, R.K. Singh, P. Singh, et al. (2017), “Genetic diversity of nitrogen-fixing and plant growth promoting *Pseudomonas* species isolated from sugarcane rhizosphere”, *Frontiers in Microbiology*, **8**, DOI: 10.3389/fmicb.2017.01268.

[15] D. Tilman, K.G. Cassman, P.A. Matson, et al. (2002), “Agricultural sustainability and intensive production practices”, *Nature*, **418**, pp.671-677, DOI: 10.1038/nature01014.

[16] N.T.T. Hang, N.T. Thuy (2015), “Screening of *Azotobacter* strains with the ability of nitrogen fixation and synthesis of indole acetic acid (IAA)”, *Journal of Forestry Science and Technology*, **4**, pp.3-9 (in Vietnamese).

- [17] E. Glickmann, Y. Dessaux (1995), “A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria”, *Applied and Environmental Microbiology*, **61(2)**, pp.793-796, DOI: 10.1128/aem.61.2.793-796.1995.
- [18] Ministry of Science and Technology (2010), *Vietnamese Standard TCVN 7538-6:2010: Soil quality - Sampling - Part 6: Guidance on The Collection, Handling and Storage of Soil Under Aerobic Conditions for The Assessment of Microbiological Processes, Biomass and Diversity in The Laboratory* (in Vietnamese).
- [19] L.T.A. Hong, C.T.H. Dao, N.T. Vi, et al. (2025), “Isolation and selection of endophytic bacteria capable of fixing nitrogen and synthesizing IAA from rice plants (*Oryza sativa* L.) in Dong Thap and Long An provinces”, *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, **22(10)**, pp.1912-1925, DOI: 10.54607/hcmue.js.22.10.4754(2025) (in Vietnamese).
- [20] J. Sambrook, D.W. Russell (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2344pp.
- [21] A. Klindworth, E. Pruesse, T. Schweer, et al. (2013), “Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies”, *Nucleic Acids Research*, **41(1)**, DOI: 10.1093/nar/gks808.
- [22] S. Kumar, G. Stecher, M. Suleski, et al. (2024), “MEGA12: Molecular evolutionary genetics analysis version 12 for adaptive and green computing”, *Molecular Biology and Evolution*, **41(12)**, DOI: 10.1093/molbev/msae263.
- [23] T.V. Chi, L.V. Hien, N.M. Tuan, et al. (2023), “Selection of highly active bacterial strains for fixing nitrogen and synthesizing indole-3-acetic acid (IAA) from green tea cultivation soil in Tuc Tranh commune, Thai Nguyen province”, *Journal of Forestry Science and Technology*, **12(6)**, pp.3-11, DOI: 10.55250/jo.vnuf.12.6.2023.003-011 (in Vietnamese).
- [24] N.T.P. Oanh, T.B. Minh, N.T. Pha (2013), “Isolation and selection of several rice rhizosphere soil bacterial strains capable of nitrogen fixation and IAA synthesis”, *Can Tho University Journal of Science*, **26**, pp.82-88 (in Vietnamese).
- [25] P. Chumpoo, A. Shutsrirung (2018), “Screening of N₂-fixing and IAA-producing bacteria and their potential use as biofertilizer for rice”, *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, **23(3)**, pp.1-10, DOI: 10.14456/apst.2018.7.
- [26] H. Wang, H. Jin, Z. Chen, et al. (2024), “*Azospirillum isscasi* sp. nov., a bacterium isolated from rhizosphere soil of rice”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **74(1)**, DOI: 10.1099/ijsem.0.006218.

[27] D.S.N. Ferreira, S.A.F. Hayashi, R.V. Massena, et al. (2020), “Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov.”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **70(12)**, pp.6203-6212, DOI: 10.1099/ijsem.0.004517.

[28] N.D.S. Ferreira, A. Coniglio, M. Puente, et al. (2022), “Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Az39 as the type strain of *Azospirillum argentinense* sp. nov.”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **72(8)**, DOI: 10.1099/ijsem.0.005475.

[29] S.Y. Lin, F.T. Shen, L.S. Young, et al. (2012), “*Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **62**, pp.1185-1190, DOI: 10.1099/ijms.0.030585-0.

[30] C.H. Xu, G. Chen, Y. Liu, et al. (2023), “*Azospirillum aestuarii* sp. nov., a novel nitrogen-fixing and aerobic denitrifying bacterium isolated from an estuary of a freshwater river”, *Current Microbiology*, **80(4)**, DOI: 10.1007/s00284-023-03213-3.

[31] J.J. Tarrand, N.R. Krieg, J. Döbereiner (1978), “A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov.”, *Canadian Journal of Microbiology*, **24(8)**, pp.967-980, DOI: 10.1139/m78-160.

[32] S.Y. Lin, C.C. Young, H. Hupfer, et al. (2009), “*Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **59(4)**, pp.761-765, DOI: 10.1099/ijms.0.65837-0.

[33] C.C. Young, H. Hupfer, C. Siering, et al. (2008), “*Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **58(4)**, pp.959-963, DOI: 10.1099/ijms.0.65065-0.

[34] E.N. Tikhonova, D.S. Grouzdev, I.K. Kravchenko (2019), “*Azospirillum palustre* sp. nov., a methylotrophic nitrogen-fixing species isolated from a raised bog”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **69(9)**, pp.2787-2793, DOI: 10.1099/ijsem.0.003560.

[35] Y. Yang, R. Zhang, J. Feng, et al. (2019), “*Azospirillum griseum* sp. nov., isolated from lakewater”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **69(12)**, pp.3676-3681, DOI: 10.1099/ijsem.0.003460.

[36] Y.Q. Duan, X.K. Zhou, N. Habib, et al. (2021), “*Azospirillum tabaci* sp. nov., a bacterium isolated from rhizosphere soil of *Nicotiana tabacum* L.”, *Archives of Microbiology*, **204(1)**, DOI: 10.1007/s00203-021-02688-7.

[37] H.P. Browne, S.C. Forster, B.O. Anonye, et al. (2016), “Culturing of unculturable human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation”, *Nature*, **533(7604)**, pp.543-546, DOI: 10.1038/nature17645.

[38] S. Nievas, A. Coniglio, W.Y. Takahashi, et al. (2023), “Unraveling *Azospirillum*'s colonization ability through microbiological and molecular evidence”, *Journal of Applied Microbiology*, **134(4)**, pp.1-16, DOI: 10.1093/jambio/lxad071.

[39] O. Steenhoudt, J. Vanderleyden (2000), “*Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: Genetic, biochemical and ecological aspects”, *FEMS Microbiology Reviews*, **24(4)**, pp.487-506, DOI: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.x.

[40] F.R. Perdomo, M.C. Rusinque, P.C. Campos, et al. (2015), “Effect of temperature and pH on the biomass production of *Azospirillum brasilense* C16 isolated from Guinea grass”, *Pastos y Forrajes*, **38(3)**, pp.171-175.

[41] G. Immanuel, R. Dhanusha, P. Prema, et al. (2006), “Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment”, *International Journal of Environmental Science and Technology*, **3(1)**, pp.25-34, DOI:10.1007/BF03325904.

[42] D.T.T. Tam, T.T. Yen, N.T. Huyen (2023), “Characterization of potential cellulose-degrading bacteria isolated from by-products of wood processing”, *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, **21(8)**, pp.1028-1036 (in Vietnamese).

[43] A.D. Didonet, A.C. Magalhães (1997), “Growth and nitrite production by *Azospirillum* strains subjected to different levels of dissolved oxygen in the medium”, *Soil Biology and Biochemistry*, **29(11-12)**, pp.1743-1746, DOI: 10.1016/S0038-0717(97)00066-7.

[44] H. Dahm, H. Różycki, E. Strzelczyk, et al. (1993), “Production of B-group vitamins by *Azospirillum* spp. grown in media of different pH at different temperatures”, *Zentralblatt für Mikrobiologie*, **148(3)**, pp.195-203.

[45] T.M. Pham, X.D. Bui, V.K.T. Le, et al. (2022), “Isolation of indole-3-acetic acid-producing *Azospirillum brasilense* from Vietnamese wet rice: Co-immobilization of isolate and microalgae as a sustainable biorefinery”, *Journal of Biotechnology*, **349**, pp.12-20, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2022.03.007.

[46] S. Zhou, L. Han, Y. Wang, et al. (2013), “*Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **63(7)**, pp.2618-2624, DOI: 10.1099/ijs.0.046813-0.

[47] S.A. Konnova, I.P. Fedonenko, O.E. Makarov, et al. (2003), “Effect of cultivation parameters on the composition of extracellular polysaccharide-containing substances in *Azospirillum brasilense*”, *Izvestiya Akademii Nauk. Seriya Biologicheskaya*, **4**, pp.430-437.

[48] Y. Okon (1985), “*Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture”, *Trends in Biotechnology*, **3(9)**, pp.223-228, DOI: 10.1016/0167-7799(85)90012-5

[49] S. Yaadesh, G.S. Tomar, R. Kaushik, et al. (2023), “*Azospirillum-Bacillus* associations: Synergistic effects on *in vitro* plant growth-promoting traits and growth of pearl millet at the early seedling stage under limited moisture conditions”, *3 Biotech*, **13(3)**, DOI: 10.1007/s13205-023-03503-4.

[50] T.M. Tien, M.H. Gaskins, D.H. Hubbell (1979), “Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.)”, *Applied and Environmental Microbiology*, **37(5)**, pp.1016-1024, DOI: 10.1128/aem.37.5.1016-1024.1979.

[51] V.T.P. Nhu, C.N. Diep (2014), “Effects of *Azospirillum amazonense* and *Burkholderia kururiensis* on high-yielding rice (cv. Ma Lam 213) cultivated on sandy loam soil in Tuy Hoa city, Phu Yen province”, *Can Tho University Journal of Science*, **33**, pp.85-96 (in Vietnamese).

[52] N. Bagheri, M. Ahmadzadeh, P. Mariotte, et al. (2022), “Behavior and interactions of the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum oryzae* NBT506 and *Bacillus velezensis* UTB96 in a co-culture system”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **38(6)**, DOI: 10.1007/s11274-022-03283-8.