

## PHÂN LOẠI MỘT SỐ CHỦNG VI SINH VẬT PHÂN LẬP TỪ ĐẤT TRỒNG CÀ PHÊ TÂY NGUYÊN ĐỂ SẢN XUẤT CHẾ PHẨM VI SINH ĐA CHỨC NĂNG

Trần Đình Mẫn<sup>1</sup>, Phạm Thanh Hà<sup>1</sup>, Hà Việt Sơn<sup>2</sup>,  
Đỗ Thị Gấm<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Thu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học,  
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam  
<sup>2</sup>Trung tâm Phát triển công nghệ cao,  
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Sau hơn nửa thế kỷ sử dụng rộng rãi đến mức lạm dụng phân bón hóa học, hầu hết các nước trên thế giới đã nhận ra mặt trái của nó. Môi trường bị ô nhiễm trầm trọng, đất bị bạc màu, giảm độ tơi xốp, ngộ độc cây trồng, nhất là các cây trồng lâu năm ngày càng sinh trưởng kém, nông sản chứa nhiều độc tố... (Elshanshoury, 2005). Vì vậy, cần sử dụng phân bón sinh học làm tăng độ hữu hiệu của phân hóa học, góp phần cải tạo đất, làm tăng năng suất, chất lượng cây trồng. Những năm gần đây, việc nghiên cứu và sản xuất các chế phẩm sinh học để thay thế một phần phân bón hóa học đã được hầu hết các nước quan tâm. Tiềm năng sử dụng các chế phẩm sinh học đa chức năng trong canh tác cây trồng rất lớn, đây là một hướng đi đúng đắn, hướng tới một nền nông nghiệp hữu cơ, sinh thái bền vững và thân thiện với môi trường (Elshanshoury, 2005).

Việc nghiên cứu và ứng dụng phân bón vi sinh có giá trị thực tiễn cao, với ưu điểm ít tốn kém trong chi phí đầu tư, dễ áp dụng trên các đối tượng cây trồng. Tuy nhiên mỗi loại phân vi sinh chỉ phát huy đối với một loại cây trồng nhất định nên cần nghiên cứu để tạo ra các loại chế phẩm phù hợp với đặc tính của từng loại cây. Nên sử dụng các chế phẩm sinh học không độc hại, an toàn với môi trường. Trong đó tuyển chọn và phân loại các chủng vi sinh vật (VSV) là khâu đầu tiên và quan trọng trong quy trình tạo ra chế phẩm.

Bài báo này chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu phân loại, định tên 05 chủng VSV đã được phân lập và tuyển chọn từ đất trồng cà phê Tây Nguyên, đã được đánh giá hoạt tính, hiệu quả đối với đất và cây trồng cũng như khả năng tồn tại trong chế phẩm để đảm bảo an toàn khi đưa vào sản xuất chế phẩm vi sinh sử dụng cho cây trồng.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### Phân loại vi khuẩn

*Phân loại dựa theo đặc điểm hình thái:* Quan sát hình thái khuẩn lạc trên môi trường thạch đĩa; Quan sát hình thái tế bào vi khuẩn (VK) dưới kính hiển vi quang học với vật kính dầu phóng đại 100 X; Nhuộm Gram, nhuộm bào tử, thử khả năng hiếu khí của VK, thử hoạt tính catalase, oxidase, thử khả năng di động, khả năng thủy phân gelatin, khả năng lên men các nguồn đường theo Nguyễn Lân Dũng và cs. (1982).

*Phân loại dựa theo đặc điểm sinh hóa:* Phân loại VK theo kit chuẩn API 20E và 50 CHB (Biomek, Pháp) Sơ bộ định tên VK dựa vào kết quả phân tích của phân mềm APILAB PLUS 3.3.kết hợp với hệ thống phân loại VK của Bergey (Jonh et al., 1994).

*Phân loại VK dựa trên trình tự gene 16S rARN:* Từ ADN khuôn, thu nhận đoạn gen mã hóa 16S rRNA bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 16S-F1(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 16S-R1(5'-TACGGTTACCTTGTACCGACTT-3'). Phân đoạn ADN dài ~ 1500 kb thu nhận từ PCR được tinh sạch bằng kit QiaQuick PCR Purification (Qiagen, Hilden, Đức). Trình tự ADN được xác định bằng kit Dyedeoxy Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems,

Weierstadt, Đức), sản phẩm được phân tích trên máy đọc trình tự tự động ABI 377 (Perkin-Elmer, Mỹ). Chuỗi nucleotit được xử lý bằng chương trình SeqEd1.03; chương trình AssemblyLIGN 1.9 và hệ chương trình MacVector 6.5.3 (Oxford Molecular Inc.). Truy cập dữ liệu Gene bankEMBL(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) để so sánh bằng chương trình GENDOC 2.5 (Nicholas&Nicholas, 1999). Sử dụng chương trình phân tích phả hệ và tiến hóa MEGA 4 để xác định mối quan hệ di truyền giữa các chủng được phân tích (Tamura et al., 2007).

### **Phân loại nấm mốc**

*Phân loại dựa theo đặc điểm hình thái:* Cây chắm điểm nấm mốc lên thạch đĩa để quan sát hình thái khuẩn lạc và cấy lên khối thạch để quan sát các đặc điểm vi mô. *Quan sát các đặc điểm vi mô* bằng mắt thường hoặc dưới kính hiển vi soi nổi (Đặc điểm hình thái khuẩn lạc: Hình dạng, kích thước, dạng mặt, dạng mép khuẩn lạc. Màu sắc hệ sợi, màu sắc mặt dưới. Giọt tiết. Sắc tố khuếch tán ra môi trường. *Đặc điểm hình thái hạch nấm, thể quả.* *Quan sát các đặc điểm vi học:* Thực hiện tiêu bản nấmmốc, quan sát ở vật kính phóng đại 40X cấu tạo khuẩn ty và bào tử. Bào tử: typ phát sinh bào tử, hình dạng, kích thước, màu sắc, bề mặt...Bộ máy mang bào tử trần: Giá bào tử (kích thước, bề mặt, màu sắc, vách ngăn). Bọng đính giá (hình dạng, kích thước). Các lớp thể bình (quan sát số tầng). Sợi nấm: Có hay không có vách ngăn ngang, đường kính, màu sắc, bề mặt có hoặc không có bó sợi, bó giá, hạch nấm ... Dựa trên kết quả thu nhận được tra khóa phân loại, xác định tên loài tương ứng (Maren, 2002).

*Phân loại nấm mốc dựa trên trình tự gene 28S rARN:* Tách chiết ADN của nấm sợi theo Wang et al. (1998). Khuếch đại gen 28S rRNA của các chủng nấm sợi bằng kỹ thuật PCR, sử dụng cặp mồi NL1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG -3') và NL2(5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG - 3'). Sản phẩm PCR khuếch đại gen 28S rRNA của các chủng nấm sợi sau khi tinh sạch được đọc trình tự và được xác định mối quan hệ di truyền với các chủng có trình tự tương đồng trên Gene bank.

## **II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

Từ tập hợp chủng giống có nguồn gốc từ đất trồng cây cà phê Tây Nguyên, trên cơ sở đánh giá hoạt tính sinh học của các chủng cũng như ảnh hưởng đối với cây trồng đã tuyển chọn được tổ hợp 05 chủng VSV có hoạt tính cao. Trong đó 03 chủng VK có hoạt tính cố định đạm *Azotobacter* sp. Ab-CF 7.2, *Acetobacter* sp. Ac-CF 2.2 và *Azospirillum* sp. As-CF 1.5; 01 chủng VK *Bacillus* sp. VL-CF 7.3 và 01 chủng vi nấm *Aspergillus* sp. ML-CF 1.3 có hoạt tính phân giải lân. 02 chủng Ab-CF 7.2 và Ac-CF 2.2 ngoài khả năng cố định đạm còn có khả năng sinh tổng hợp AIA - một chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Do đó sử dụng những chủng VK có các đặc tính này giúp cải thiện độ phì của đất, tăng chất dinh dưỡng và tăng khả năng giữ ẩm cho đất.

Để quyết định việc sử dụng tập hợp chủng VSV này vào tạo phân bón đa chức năng cho cây trồng, cần thiết phải phân loại và định tên các chủng đến đơn vị loài.





### **Phân loại vi khuẩn**

*Phân loại vi khuẩn dựa trên đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa*

Các chủng được phân loại sơ bộ theo hình thái, màu sắc, kích thước khuẩn lạc và tế bào. Kết quả quan sát đặc điểm hình thái của các chủng VK được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1

Đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn

Chủng	Ab-CF7.2	Ac-CF 2.2	As-CF 1.5	VL-CF 7.3
Hình thái khuẩn lạc trên môi trường đặc hiệu				
	Khuẩn lạc non màu trắng đục, lông, già màu nâu nhạt, nhầy, đàn hồi. Không sinh sắc tố. Đường kính 2-5 mm.	Khuẩn lạc vàng, tròn nhỏ đều đặn, bề mặt trơn bóng, không sinh sắc tố. Đường kính 1,5 mm.	Khuẩn lạc tròn đều, nhẵn, mép phẳng, màu hồng. Đường kính 1,5 mm.	Khuẩn lạc tròn, rìa răng cưa không đều, màu vàng xám, khi già nhẵn, màu hơi nâu, đường kính 3mm.
Hình thái tế bào dưới kính hiển vi	Tế bào hình que kích thước 2 x 3,1 µm. Khi còn non có dạng tròn, 2-3 tế bào dính liền nhau, có tiên mao, khi già tế bào có vỏ dày và tạo thành nang xác.	Tế bào hình elip, đứng đơn, kích thước 0,8 x 1,2 µm. Có tiên mao.	Tế bào có dạng que, đầu xoắn, kích thước 2,1 x 3,7 µm. Trên môi trường dịch thể có tiên mao.	Tế bào hình que nhỏ, hai đầu tròn, kích thước 0,7-0,8 x 1,8-2,5 µm, đứng đơn lẻ hoặc thành chuỗi ngắn. Có tiên mao
Gram	-	-	-	+
Bào tử	-	-	-	+

Dựa trên một số đặc điểm hình thái (Bảng 1), sinh lý, sinh hóa (Bảng 2,3) kết hợp với Khóa phân loại VK của Bergey cho thấy chủng Ab-CF7.2 có đặc điểm giống với loài *Azotobacter chroococcum*, chủng Ac-CF 2.2 có đặc điểm tương tự với loài *Acetobacter diazotrophicus* và chủng As-CF 1.5 có đặc điểm của *Azospirillum brasilense*.

Bảng 2

Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của các chủng vi khuẩn

TT	Đặc điểm	Ab-CF7.2	Ac-CF 2.2	As-CF 1.5	VL-CF 7.3
1	Hiếu khí	+	+	+	+
2	Vi hiếu khí	-	+	+	+
3	Khả năng di động	+	+	+	+
4	Phép thử catalase	+	+	+	+
5	Phép thử oxidase	+	-	-	
6	Thủy phân gelatin	-	-	-	+
7	Sinh H <sub>2</sub> S	+	-	-	-
8	Hoạt tính urease	+	+	+	-
9	Khử nitrate	+	+	-	-
10	Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng	25 - 30°C	20-30°C	22 - 37°C	37°C
11	pH cho sinh trưởng	6,5 - 8	5	6 - 7	7 - 7,4
12	Sinh enterotoxin	-	-	-	-

Bảng 3

**Khả năng đồng hóa các nguồn carbon của các chủng vi khuẩn cố định đạm**

TT	Đặc điểm	Ab-CF7.2	Ac-CF 2.2	As-CF 1.5
1	Có khả năng đồng hóa	Tinh bột, rhamnose, disaccharid, dextrin	Ethanol, glycerol, D-galactose, D-xylose, maltose, fructose, glucose, sucrose, sodium acetate, D-arabinose, D-mannitol .	D-fructose, glycerol, D-gluconate, 2-ketogluconate, axit malic, D-ribose, D-sorbitol, D-xylose, D-ribose, D-mannose, L-arabinose, D-arabitol, D-fructose, D-galactose
2	Không có khả năng đồng hóa	Lactose, manitol, natribenzoat	D-sorbitol, methanol (1%), mannose, dextrin, tinh bột	N-acetylglucosamine, L-arabitol, celobiose, D-arabinose, inositol, maltose, L-rhamnose, sucrose, L-xylose, D-glucose, D-mannitol, D-lactose
3	Sinh trưởng trên môi trường chứa	Alcohol	30% glucose hoặc sucrose	
4	Sinh trưởng trên axit hữu cơ	+	+	+
5	Axit hóa các nguồn	Sucrose, lactose, manitol, maltose, fructose, sorbitol, glucose	Glucose, ethanol	D-glucose
6	Không axit hóa nguồn	Galactose	D-mannitol, D-sorbitol, I-propanol	

Chủng VK phân giải lân VL-CF 7.3 thuộc loại trực khuẩn Gram (+) và có nhiều đặc điểm hình thái giống với VK thuộc chi *Bacillus* (bảng 1, 2) nên được phân loại theo kit sinh hóa API 20E (Bảng 4) và API 50CHB (Bảng 5).

Bảng 4

**Đặc điểm sinh hóa của chủng VKVL-CF 7.3 dựa trên kit chuẩn API 20E**

TT	Đặc điểm		TT	Đặc điểm		TT	Đặc điểm	
1	Sinh $\beta$ -galactosidase	+	4	Sử dụng Citrate	+	7	Sinh Indole	-
2	Arginine dihydrolase	-	5	Ornithine decarboxylase	-	8	V-P	+
3	Lysine decarboxylase	-	6	TDA	-	9	Khả năng lên men	+

**Khả năng lên men từ các nguồn cơ chất của chủng VKVL-CF 7.3 dựa trên kit chuẩn API 50CHB**

TT	Đặc điểm		TT	Đặc điểm		TT	Đặc điểm	
1	Glycerol	±	17	Inositol	-	33	Inulin	-
2	Erythritol	-	18	Mannitol	-	34	Melezitose	-
3	D-Arabinose	-	19	Sorbitol		35	D-Raffinose	+
4	L- Arabinose	±	20	α-Methyl-D-mannoside	-	36	Tinh bột	+
5	Ribose	-	21	α-Methyl-D-glucoside	-	37	Glycogen	-
6	D-Xylose	-	22	N-Acetylglucosamine	+	38	Xylitol	-
7	L-Xylose	-	23	Amygdalin	-	39	β-Gentiobiose	-
8	Adonitol	-	24	Arbutin	+	40	D-Turanose	-
9	β-Methylxyloside	-	25	Aesculin	+	41	D-Lyxose	-
10	Galactose	+	26	Salicin	-	42	D-Tagatose	-
11	D-Glucose	+	27	Cellobiose	+	43	D-Fucose	-
12	D-Fructose	-	28	Maltose	-	44	L-Fucose	-
13	D-Mantose	-	29	Lactose	-	45	D- Arabitol	-
14	L-Sorbose	-	30	Melibiose	+	46	L- Arabitol	-
15	Rhamnose	-	31	Sucrose	+	47	Gluconate	-
16	Dulcitol	-	32	Trehalose	-	48	2-Ketogluconate	-
						49	5-Ketogluconate	-

Kết quả xác định (bảng 4, 5) được đối chiếu với dữ liệu phần mềm cho thấy chủng VL-CF7.3 có các đặc điểm sinh hoá gần nhất với *B. subtilis*, chỉ số xác định id  $\geq 90,8\%$ . (% id - mức độ gần gũi liên quan với những đơn vị phân loại khác của cơ sở dữ liệu  $\geq 90,0\%$  được cho là xác định tốt).

Chúng tôi tiếp tục tiến hành xác định trình tự gene 16S rRNA của các chủng VK để khẳng định thêm về vị trí phân loại của chủng này.

*Phân loại vi khuẩn dựa trên trình tự gen 16S ARN*

Kết quả giải trình tự gene và xác định vị trí phân loại của 03 chủng VK cố định đạm (hình 1) cũng cho kết quả trùng với kết quả nghiên cứu đặc điểm hình thái và sinh lý, sinh hóa. Chủng Ab-CF7.2 có trình tự tương đồng với loài *A. chroococcum* với mức độ tương đồng 98,8%, chủng Ac-CF 2.2 có trình tự tương đồng với loài *A. diazotrophicus* với mức độ tương đồng 99,8% và chủng As-CF1.5 có quan hệ gần với loài *A. brasilense* (mức độ tương đồng 97,8%).

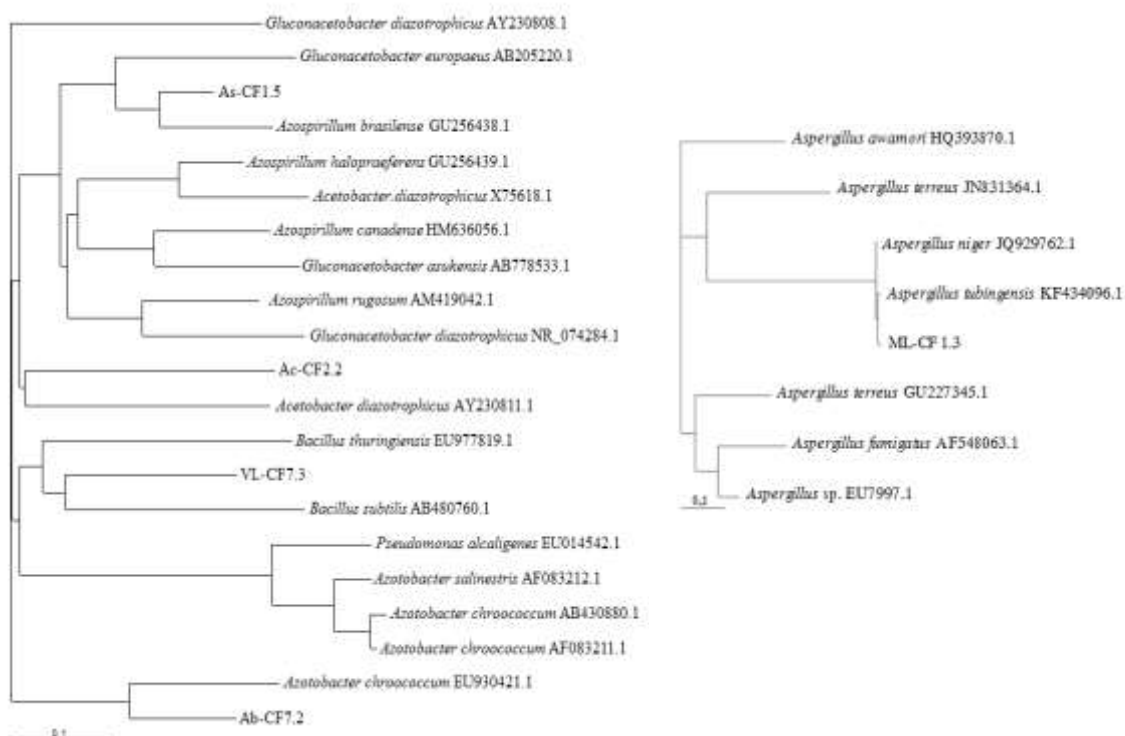
Kết quả phân tích (hình 1) cho thấy chủng VL-CF 7.3 có trình tự gần nhất với chủng *B. subtilis* AB480760, với mức độ tương đồng 99,2%.

**Phân loại chủng vi nấm có hoạt tính phân giải lân***Đặc điểm hình thái, sinh lý*

Chủng nấm sợi ML-CF1.3 có đặc điểm: khuẩn ty có vách ngăn, phân nhánh, không màu, màu nhạt hoặc chuyển nâu. Hiếu khí, chịu nhiệt độ cao, chịu axit. Sinh sản vô tính bằng bào tử

đỉnh. Sợi nấm là ống hình trụ dài, có vách ngăn ngang, sợi nấm phân nhánh. Kết quả quan sát đặc điểm hình thái của chủng nấm mốc được thể hiện ở bảng 6.

Dựa trên một số đặc điểm hình thái khuẩn lạc và các đặc điểm vi học của các chủng nghiên cứu kết hợp với khóa phân loại vi nấm của Samson (1994) nhận thấy chủng ML-CF1.3 có đặc điểm giống với nấm sợi thuộc loài *A. tubingensis*. Chúng tôi tiếp tục phân loại sâu hơn dựa trên kỹ thuật sinh học phân tử để định danh chính xác chủng này.



Hình 1: Vị trí phân loại của 05 chủng vi sinh vật nghiên cứu

Phân loại vi nấm dựa trên trình tự gen 28S rARN

Kết quả phân tích (hình 1) cho thấy chủng ML-CF1.3 có trình tự gần nhất với chủng *A. tubingensis* KF434096.1 với mức độ tương đồng 99%. Căn cứ vào các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hoá, trình tự gene 28S rARN kết hợp với hệ thống phân loại vi nấm của Raper & Thom (1965), chủng nấm mốc ML-CF 1.3 được phân loại là loài *A. tubingensis*.

Bảng 6

**Đặc điểm hình thái khuẩn lạc, khuẩn ty và bào tử của chủng ML-CF1.3**

Hình thái khuẩn lạc sau 7 ngày nuôi cấy trên Czapek chứa  $Ca_3(PO_4)_2$



- Khuẩn lạc tốc độ mọc nhanh, kích thước 5-5,5 cm
- Khuẩn lạc ăn sâu, bám chặt vào môi trường, bề mặt nhẵn nheo, rìa trắng. Không hình thành giọt tiết
- Màu sắc: Mặt phải sợi nấm màu trắng, ở giữa có các hạt bào tử dày màu đen, mặt trái màu trắng.
- Sắc tố không khuếch tán vào môi trường

Hình thái khuẩn ty dưới kính hiển vi



- Đầu sợi nấm hình cầu, tỏa tia rất đều khi non và xé rách tạo dạng cột khi già. Kích thước 150-200  $\mu\text{m}$ .
- Cuống không màu, bề mặt cuống nhẵn, có màu nâu gần sát bông. Cuống có đặc trưng dài vượt trội trong số các loài thuộc chi *Aspergillus*. Kích thước (1200-1950) x (11-112,5)
- Bông hình cầu, kích thước 17-30  $\mu\text{m}$ . Vùng sinh sản khắp mặt bông.
- Thể bình một tầng là chủ yếu. Đặc biệt bông lớn 2 thể bình, bông nhỏ 1 thể bình, đôi khi có cả 2 loại thể bình trên cùng 1 bông. Thể bình 1 tầng hình chai, kích thước (7-8,75) x (3,75-5). Thể bình 2 tầng: Lớp 1 hình trụ dài, kích thước (7,5-11) x (3,75-7,5)  $\mu\text{m}$ . Lớp 2 hình chai, kích thước 12,5 x (3,75-7,5)  $\mu\text{m}$ .

Hình thái bào tử

- Bào tử hình cầu, màu đen, bề mặt có gai mịn, khi già gai trở nên xù xì. Bào tử có kích thước lớn (5-7)  $\mu\text{m}$ .

Nhiệt độ tối ưu

25 - 30°C

Khả năng đồng hóa

Arabinose, maltose, sucrose, xylose, glucose, mannitol, tinh bột tan.

Khả năng sinh enzyme

Amylase, protease, pectinase

Sinh axit

+

### Đánh giá mức độ an toàn của các chủng vi sinh vật được phân loại

Độ an toàn sinh học của các chủng VSV sử dụng trong đời sống có ý nghĩa đặc biệt quan trọng. Theo Hướng dẫn số 90/679/EWG của Cộng đồng Châu Âu về an toàn sinh học, nhóm tác nhân sinh học vi sinh vật được phân làm 4 cấp độ an toàn, trong đó chỉ các VSV ở cấp độ 1 và 2 được ứng dụng trong sản xuất.

Kết quả đánh giá cho thấy cả 05 chủng VSV có tên phân loại như trên đều được xếp vào mức độ an toàn cấp 1 vì vậy có thể ứng dụng tổ hợp chủng VSV hữu ích này cho sản xuất phân vi sinh đa chức năng cho cây trồng.

### III. KẾT LUẬN

Đã tiến hành phân loại và định tên được 05 chủng VSV sử dụng cho sản xuất phân bón VSV chức năng cho cây cà phê: 03 chủng VK cố định nitơ được định tên là *Azotobacter chroococum* Ab-CF 7.2, *Acetobacter diazotrophicus* Ac-CF2.2 và *Azospirillum brasilense* As-CF1.5, 01 chủng VK phân giải lân được định tên là *Bacillus subtilis* VL-CF7.3 và 01 chủng nấm mốc phân giải lân được định tên là *Aspergillus tubingensis* ML-CF1.3. Tất cả các chủng VSV được tuyển chọn đều thuộc nhóm VSV an toàn sinh học cấp 1 theo qui định của Cộng đồng châu Âu.

*Lời cảm ơn:* Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài mã số TN16/C02 thuộc Chương trình Tây Nguyên giai đoạn 2016-2020.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lâm Dũng, Đoàn Xuân Mượu, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Thạnh, Phạm Văn Ty, 1982: Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, 85 trang.
2. Elshanshoury A. R., 2005: Interactions of *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense* & *Streptomyces mutabilis* in relation to their effect on wheat development. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 175 (2): 119-127.
3. John G. H., Noel R. K., Peter H. A. S., James T. S., Stanley T. W., 1994: *Bergey's manual of determinative bacterial 9<sup>th</sup> Edition*. The Williams and Wilkin, Co., Baltimore: 85-187.
4. Maren A. K., 2002: *Identification of common Aspergillus species*. Pulished by the Central bureau voor Schimmelcutues, Utrecht, the Netherlands. 107 pages.
5. Nicholas K. B., Nicholas H. B., 1999: GENDOC: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments.
6. Sampson R. A., 1994: Current systematics of the genus *Aspergillus*. In: *The genus Aspergillus. From taxonomy and genetics to industrial application*. Plenum Press, New York, N.Y.: 261-276.
7. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., 2007: MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
8. Thom C., Raper K. B., 1965: *A manual of the Aspergilli*: 373 pages.
9. Wang L., Yokohama K., Miyaji M., Nishimura K., 1998: The identification and phylogenetic relationship of pathogenic species of *Aspergillus* base on mitochondrial cytochrome b gene. *Medical Mycology Journal*, 36: 153-164.

## CLASSIFICATION OF SOME MICROBIAL STRAINS ISOLATED FROM COFFEE PLANTING SOIL IN TAY NGUYEN TO PRODUCE MULTIFUNCTIONAL BIOFERTILIZER

Tran Dinh Man, Pham Thanh Ha, Ha Viet Son, Do Thi Gam, Nguyen Thị Thu

### SUMMARY

Multifunctional biofertilizers are one of the best modern tools for agriculture. Being essential components of organic farming, they play vital role in maintaining long term soil fertility and sustainability. Based on the morphological, physiological, biochemical features, and gene sequence analysis according to classified schemes for bacteria and fungi, 5 microbial strains with activities of nitrogen fixation, solubilizing phosphorus and stimulating plant growth that were isolated from coffee planting soils in Tay Nguyen have been identified to species level. The results showed that 3 of nitrogen fixing bacterial strains were *Azotobacter chroococum* Ab-CF 7.2, *Acetobacterdiazotrophicus* Ac-CF2.2 and *Azospirillumbrasilense* As-CF1.5. One phosphate dissolving bacterial strain was identified as *Bacillus subtilis* VL-CF7.3. One phosphate dissolving fungal strain was identified as *Aspergillus tubingensis* ML-CF1.3. All of selected strains were biosafety microorganisms at first degree following the EC standards, so these strains could be used in the production of safe multifunctional biofertilizers for plants.