

УДК 633.72:631.461.5

### ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА АЗОТФИКСИРУЮЩЕГО ШТАММА СД1 ИЗ ПОЧВЫ ЧАЙНОЙ ПЛАНТАЦИИ ПРОВИНЦИИ ФУ ТХО РЕСПУБЛИКИ ВЬЕТНАМ

НГУЕН ВАН ЖАНГ<sup>1</sup>, ВУ ТХИ ХЬЕН<sup>1</sup>, В.В. ПЫЛЬНЕВ<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Вьетнамский национальный сельскохозяйственный университет;  
<sup>2</sup> РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

*Целью исследований являлось определение состава штаммов азотфиксирующих бактерий в почве чайной плантации провинции Фу Тхо (Вьетнам) и выделение из них наиболее активного. Из различных образцов почв чайной плантации провинции Фу Тхо на безазотистой питательной среде Берка выделено более 12 штаммов азотфиксирующих бактерий. Исследуемые штаммы бактерий характеризовались различной степенью азотфиксирующей активности (от 0,605 до 5,486 мг/л). Из них штамм СД1 выделен как максимально высокоактивный. Концентрация фиксированного им азота достигла 5,468 мг/л. Исследования зависимости активности штамма СД1 от влияния температуры, рН, длительности культивирования, источников углерода питательной среды показали, что он хорошо развивается при температуре 25–35°C (концентрация  $\text{NH}_4^+$  возросла с 4,485 до 5,487 мг/л), рН=6–8 (лучшее развитие при рН=7), на среде, содержащей сахарозу. Оптимальная температура роста штамма СД1 составляет 30–32°C. После 3 дней культивирования штамм СД1 достиг максимальной плотности (7,6·10<sup>6</sup> клеток/мл). Таким образом, выявлено, что максимальная активность нитрогеназы достигается после 4 сут культивирования. Штамм СД1 обладает способностью синтезировать фитогормон ИУК. Максимальное количество ИУК, синтезируемое данным штаммом, достигло 11,25 мкг/мл после 3 сут инкубации. Азотфиксирующая активность штамма СД1 максимальна на 4 день культивирования. По совокупности культурально-морфологических признаков штамм СД1 согласно определителю Берги относится к роду *Azotobacter*.*

**Ключевые слова:** *Azotobacter spp.*, фитогормон ИУК, азотфиксирующие микроорганизмы, нитрогеназа, чайная плантация, почва.

### Введение

Микроорганизмы играют важную роль в биологических процессах круговорота элементов и веществ экосистем. Эти процессы прямо или косвенно влияют не только на состав и качество почвы, но и на сельскохозяйственные культуры. Поэтому ключевым условием поддержания жизни является обеспечение сбалансированной деятельности природных микробных сообществ.

Интенсификация промышленного и сельскохозяйственного производства, в том числе увеличение использования химических удобрений и пестицидов, оказывает

заметное негативное влияние на здоровье людей, загрязняет окружающую среду и подавляет жизнедеятельность микроорганизмов. Выходом из сложившейся ситуации является изменение стратегии сельскохозяйственного производства от глобальной «химизации» к повсеместной «биологизации». В связи с этим существенно возрастает роль физиологически значимых микроорганизмов.

Чайная плантация провинции Фу Тхо расположена на высоте 100 м над уровнем моря. Почва в основном ферралитная, pH ее колеблется от 4,5 до 5,5. На этой почве целесообразно выращивать лесные растения. На участках с крутизной склона меньше 25 град. часто возделывают технические культуры, в том числе и чай [15].

Выращивание чая во многом зависит от почвенно-климатических условий плантации и технологии его возделывания. В отличие от других технических культур, у чая собирают почки и молодые листья. Сезон их сбора длится 9–10 мес. С целью повышения продуктивности растений производители используют большие дозы минеральных удобрений. Злоупотребление ими приводит к истощению питательных веществ почвы и повышению кислотности почвы [14]. К тому же чайные кусты часто выращивают на склонах холмов, где питательные вещества легко выщелачиваются. Поэтому урожайность чайных кустов в данной провинции недостаточно высока.

В почве существуют разнообразные группы значимых азотфиксирующих, фосфатмобилизующих и других микроорганизмов. Современная биотехнология рассматривает почву как банк при поиске культур микроорганизмов с любыми необходимыми свойствами. Некоторые изоляты, выделенные из ризосферы, обладают способностью колонизировать корни определенных видов растений. Причем гомологичные штаммы обладают большей специфичностью и более активно колонизируют корневую зону растений. Проблема поиска эффективных азотфиксирующих и фосфатмобилизующих микроорганизмов весьма актуальна, поскольку они относятся к числу агрономически значимых групп.

Целью проводимых исследований являлось выделение высокоэффективно азотфиксирующих форм микроорганизмов из почвы чайной плантации провинции Фу Тхо.

### **Материал и методика**

Образцы почвы из разных мест чайной плантации отбирались в стерильные полиэтиленовые мешки по методу Г.С. Посыпанова [1].

Питательная среда для выделения и культивирования азотфиксирующих бактерий: 20 г сахарозы; 0,64 г  $K_2HPO_4$ ; 0,16 г  $KH_2PO_4$ ; 0,2 г  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,2 г NaCl; 0,05 г  $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ ; 5 мл  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  (0,05%); 5мл  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,3%) 15 г agar; 1000 мл  $H_2O$ ; pH 7,3 [13].

Для выделения азотфиксирующих бактерий использовали образцы почвы, отобранные из чайных холмов провинции Фу Тхо по методу Eichorst et al. [5] и Г.С. Посыпанова [1]. Образцы почвы собраны с глубины 5–20 см. Из образцов готовили разведения  $10^{-1}$  (15 г почвы на 90 мл дистиллированной стерильной воды) и перемешивали на качалке в течение 2 ч. В дальнейшем проводили десятикратные разведения, переносили 1 мл  $10^{-1}$  разведения в пробирку, содержащую 9 мл стерилизованную воду с помощью стерилизованной пипетки, что дало  $10^{-2}$  разведения. Таким способом была приготовлена серия разведений до  $10^{-8}$ . Разбавление приготовлено в асептических условиях. Посев проводили из разведений  $10^{-5}$  и  $10^{-6}$  на чашки Петри, содержащие среду Берка (Burk free Nitrogen). Объем посевного материала – 1 мл суспензии.

Каждое разведение высевали в четырехкратной повторности. Чашки культивировали при температуре 30°C в течение 5–7 сут. В не содержащей азот среде Берка (Burk free Nitrogen medium) могли вырасти только колонии азотфиксирующих бактерий.

Азотфиксирующую активность выделенных штаммов определяли на основе измерения концентрации свободной  $\text{NH}_4^+$  в питательной среде. Штаммы микроорганизмов культивировали в жидкой не содержащей азот среде Берка, при температуре 30°C. После 72 ч культивирования питательную среду центрифугировали со скоростью 10000 об./мин при температуре 4°C в течение 10 мин. Отбирали надосадочную жидкость и определяли концентрацию  $\text{NH}_4^+$  по методу Нэсслера [7].

Для определения влияния длительности культивирования (или инкубации) на развитие и азотфиксирующую активность выделенных штаммов исследуемые штаммы микроорганизмов культивировали в жидкой не содержащей азот среде Берка на качалке при 180 об./мин. Через каждые 24 ч жидкость центрифугировали со скоростью 10000 об./мин при 4°C в течение 10 мин. Для определения концентрации аммиака брали надосадочную жидкость по методу Нэсслера [7]. Одновременно брали каплю культуральной жидкости и в разных концентрациях высевали в чашки Петри с твердой средой Берка. Объем колонии (в колониобразующих единицах – КОЕ, или Colony Forming Unit – CFU) подсчитывали по методике Pepper и Gerba [11].

Способность синтезировать фитогормон ИУК выделенных штаммов определяли по методике Glickmann и Desaux [6]. Калибровочную кривую для определения ИУК построили на основе содержания данного гормона в тестированном растворе с различными концентрациями: 0; 5; 10; 20; 30 и 40 мг/л. Штаммы микробов культивировали в жидкой не содержащей азот среде Берка на качалке при 180 об./мин с добавлением L-триптофана. После 72 ч инкубации культуральную жидкость центрифугировали со скоростью 10000 об./мин при 4°C в течение 10 мин. Брали 1 мл надосадочную жидкость, добавляли пробный раствор Salkowski (15 мл  $\text{FeCl}_3$  0,5M, 300 мл  $\text{H}_2\text{SO}_4$  98%, 500 мл  $\text{H}_2\text{O}$ ); раствор хорошо взбалтывали и оставляли в темноте на 30 мин, после чего измеряли при  $\lambda=530$  нм. Результаты сравнивались с калибровочной кривой.

### Результаты и обсуждения

Из образцов почвы, отобранных из разных мест чайной плантации, в не содержащей азот среде Берка было выделено 12 штаммов бактерий. Все штаммы колонии беловатые, полупрозрачные, приподнятые, слизистые. Края и поверхность колонии – гладкие. Клетки в основном имеют форму от палочковидной до сферической, грам-отрицательные (рис. 1).

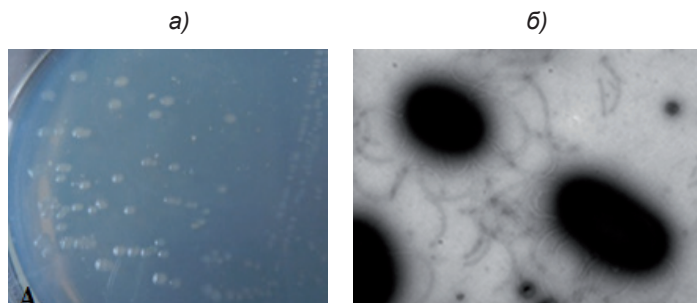
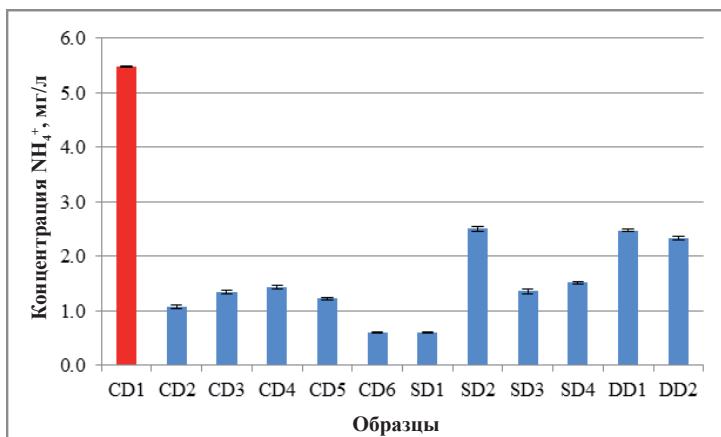


Рис. 1. Колонии (а) и формы клетки (б) штамма СД1



**Рис. 2.** Азотфиксирующая активность выделенных штаммов

Была показана различная азотфиксирующая активность выделенных штаммов (рис. 2). Концентрация аммиака у них колебалась от 0,605 до 5,486 мг/л. По сообщению Kizilkaya [8], разные штаммы *Azotobacter*, выделенные из почвы, способны фиксировать азот в количестве 3,5–29,35 мкг/мл. Nguyễn Thị Phương Oanh и др. [10], а также Cao Ngọc Điệp и Nguyễn Thành Dũng [4] приводят сведения об активности нитрогеназы некоторых азотфиксирующих штаммов бактерий почвы и ризосферы. Количество фиксированного этими штаммами азота колеблется от 3,20 до 4,67 мг/л. Выделенные штаммы характеризуются сходной азотфиксирующей активностью. Особенно сильно на активность почвенных микроорганизмов влияет pH. Из всех исследованных нами штаммов СД1 фиксирует максимальное количество азота. Концентрация аммиака в питательной среде через сутки достигла 5,486 мг/л. Именно из-за этого данный штамм был выбран для проведения последующих экспериментов.

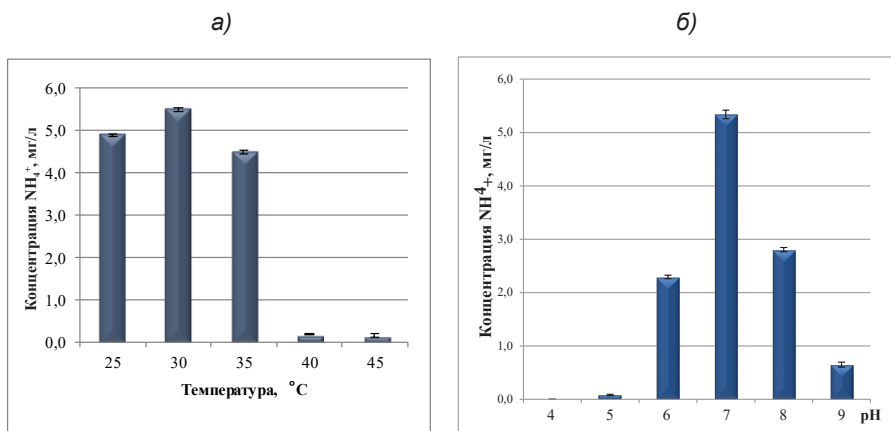
### ***Влияние условий культивирования на азотфиксирующую активность выделенных штаммов***

#### ***Влияние температуры и pH***

Микроорганизмы находятся в непрерывном взаимодействии с внешней средой и подвергаются ее влиянию. В одних случаях внешняя среда может способствовать лучшему развитию микроорганизмов, в других – подавлять их жизнедеятельность. Поэтому, изучая микробиологические процессы, необходимо учитывать два момента: во-первых, какие изменения вызывают микроорганизмы в окружающей среде; во-вторых, какое влияние оказывает внешняя среда на развитие микроорганизмов.

Температура внешней среды является мощным фактором воздействия на организмы, который определяет не только интенсивность их развития, но и саму возможность. Принято различать три основные температурные точки, имеющие значение для развития микробов: оптимум, минимум и максимум.

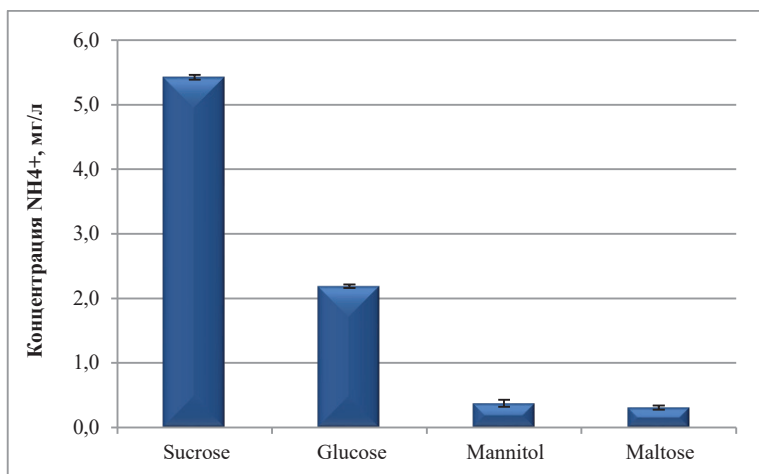
Температура инкубации существенно повлияла на азотфиксирующую способность штамма СД1. Штамм СД1 хорошо фиксирует азот в температурном диа-



**Рис. 3.** Влияние температуры (а) и рН (б) на азотфиксирующую активность штамма СД1

пазоне 25–35°C. При этом количество фиксированного азота изменялось от 4,485 до 5,487 мг/л соответственно. Азотфиксирующая активность штамма СД1 уменьшается при повышении температуры. Штамм СД1 относится к группе мезофильных микроорганизмов. Этот результат аналогичен результатам Sharma и др. [12] при изучении штаммов азотобактера.

Количество азота, фиксируемого штаммом СД1, зависит от значения рН. Этот штамм может фиксировать азот в диапазоне рН=5–9 (рис. 3). При рН=7 количество фиксированного азота максимально (5,339 мг/л). Когда  $5 > \text{pH} > 9$ , азотфиксирующая способность штамма СД1 не проявляется. При рН=5 и рН=9 количество фиксированного азота, соответственно, достигает 0,083 и 0,69 мг/л. Штамм СД1 активен в нейтральной или слабо щелочной среде.



**Рис. 4.** Влияние источников углерода на азотфиксирующую активность штамма СД1

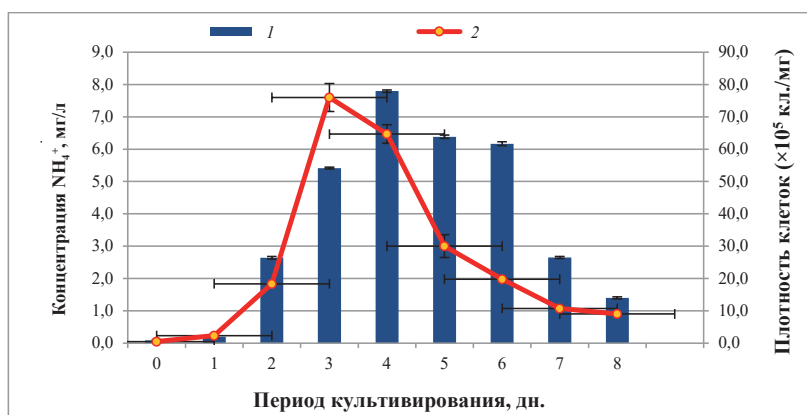
## Влияние углеродных источников

Микроорганизмы могут использовать различные источники углерода для своего роста. Тем не менее, для развития микробов подходят не все источники углерода. Поэтому для их развития необходимо подбирать подходящий источник углерода. При культивировании штамма СД1 в среде Берка с различными источниками углерода отмечено, что он может использовать все четыре источника углерода (рис. 4). Тем не менее, азотфиксирующая активность штамма СД1 сильнее всего проявляется в среде, содержащей сахарозу. Если в качестве углерода использованы маннит и мальтоза, штамм СД1 показывает низкую активность азотфиксации (количество фиксированного азота равно 0,33 и 0,32 мг/л соответственно).

Stella и Suhaimi [13] также отмечают, что источником подходящего для развития и повышения активности нитрогеназы азотфиксирующих бактерий углерода является сахароза. Ahmad и др. [2] подтверждают, что *Azotobacter spp.* лучше развиваются на среде, содержащей сахарозу, и хуже – на среде с маннитом.

## Влияние длительности культивирования

Плотность клеток штамма СД1 достигает максимального уровня ( $7,6 \times 10^6$  кл./мл) после 3 дней инкубации. После этого постепенно уменьшается и на 5 день культивирования плотность клеток остается только  $3 \times 10^6$  кл./мл (рис. 5). Изменение плотности клеток штамма СД1 не совпадает с изменением концентрации  $\text{NH}_4^+$  в культуральной среде. Концентрация  $\text{NH}_4^+$  достигает максимума после 4 дней инкубации (7,8 мг/л). Затем она постепенно снижается и через 7 дней культивирования наблюдается ее значительное сокращение до 2,649 мг/л. Это можно объяснить тем, что питательные вещества в среде исчерпываются и микробы достигают стационарной фазы. Возможно также, что в среде накапливаются вторичные метаболиты и активность нитрогеназы может ингибироваться высокой концентрацией  $\text{NH}_4^+$  в среде. В работах Nguyễn Thị Phương Oanh и др. [10], выделенные из почвы азотфиксирующие штаммы дали максимальное количество  $\text{NH}_4^+$  после 4 сут инкубации, затем активность азотфиксации заметно снижается.



**Рис. 5.** Влияние длительности культивирования на рост и азотфиксирующую активность штамма СД1: 1 – концентрация  $\text{NH}_4^+$ ; 2 – плотность клеток

### Синтез фитогормона ИУК (IAA phytohormone)

Результаты экспериментов показывают, что количество ИУК, синтезируемой штаммом СД1, достигло 11,25 мг/мл после 3 сут инкубации. Это значение невысоко, так как по данным Nguyễn Thị Phương Oanh и др. [10], азотфиксирующие микроорганизмы, выделенные из почвы, синтезируют ИУК с концентрацией от 24,96 до 39,26 мг/мл, а штамм СТВ3 достиг максимального количества ИУК после 8 дней культивирования (41,38 мкг/мл). Nguyễn Kim Anh и др. [9] выделили штамм ВК-5 из почвы Нгу Хань Шон – Дананг, способствующий синтезу 4,3 мг ИУК/мл.

### Выводы

1. Выделенный из почвы чайной плантации провинции Фу Тхо штамм СД1 обладает относительно высокой азотфиксирующей активностью. Клетки штамма СД1 – грамотрицательные, подвижные. Колонии, как правило, гладкие, беловатые, непрозрачные, низко выпуклые и слизистые. Штамм СД1 может использовать разные источники углерода. Температура развития штамма – 25–40°C, оптимальная температура роста – 30–32°C, оптимальные значения pH для азотфиксации находятся в интервале 6–9, что характерно для рода *Azotobacter* [3].

2. Штамм СД1 хорошо развивается и фиксирует азот при температуре 30°C и pH=7. На жидкой, не содержащей азот среде Берк, штамм СД1 достиг максимальной плотности клеток после 3 сут инкубации. Азотфиксирующая активность штамма СД1 максимальна на 4 день культивирования. Максимальное синтезируемое штаммом СД1 количество ИУК достигло 11,25 мкг/мл после 3 сут инкубации.

### Библиографический список

1. Посьпанов Г.С. Методы изучения биологической фиксации азота воздуха. М.: Агропромиздат, 1991. 300 с.
2. Ahmad F., Ahmad I., Khan M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*, 2008. 163(2). P.173–181.
3. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2<sup>nd</sup> ed. Vol. 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. Genus III. *Azotobacter*. P. 384–402.
4. Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Thành Dũng. Đặc tính vi khuẩn nội sinh phân lập trong cây khóm trồng trên đất phèn Vĩnh Thuận, tỉnh Kiên Giang // Tạp chí Khoa học. 2010. Vol. 15a. P. 54–63.
5. Eichorst S.A., Breznak J.A., Schmidt T.M. Isolation and characterization of soil bacteria that define *Terriglobus* gen. nov., in the phylum Acidobacteria // Applied and environmental microbiology. 2007. Vol. 73(8). P. 2708–2717.
6. Glickmann E., Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria // Applied and environmental microbiology. 1995. Vol. 61(2). P. 793–796.
7. Jeffery G.H., Baset, J., Mendham J., Denney R.C. Vogel's textbook of quantitative chemical analysis. 5<sup>th</sup> ed. Longman Scientific & Technical, 1989. 877 p.
8. Kizilkaya R. Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter* spp. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils // *J. Environ Biol*. 2009. Vol. 30 (1). P. 73–82.

9. Nguyễn Kim Anh, Phạm Thị Ngọc Anh, Lê Thị Thúy Hoa, Nguyễn Thị Quỳnh Như, Đậu Thị Tinh. Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn Azotobacter có hoạt tính nitrogenaza và sinh tổng hợp IAA (indol axetic axit) từ đất thôn Bình Kỳ- Hòa Quý- Ngũ Hành Sơn- // Đà Nẵng. Tuyển tập báo cáo «Hội nghị sinh viên nghiên cứu khoa học». lần thứ 6. Đại học Đà Nẵng. 2008. P. 300–304.

10. Nguyễn Thị Phương Oanh, Trần Hữu Minh và Nguyễn Thị Pha. Phân lập và tuyển chọn một số dòng vi khuẩn đất vùng rẫy lúa có khả năng cố định nitrogen và tổng hợp IAA // Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ sinh học: 26. 2013. P. 82–88.

11. Pepper I.L., Gerba C.P. Environmental Microbiology: A Laboratory Manual. 2<sup>th</sup> ed. 2004. 226 p.

12. Sharma T., Kumar N., Rai N. Isolation, Screening and Characterization of PGPR Isolates from Rhizosphere of Rice Plants in Kashipur Region (Tarai region) // Biotechnology International. Vol. 5(3). P. 69–84.

13. Stell M., Suhaimi M. Selection of suitable growth medium for free-living diazotrophs isolated from compost // J. Trop. Agric. and Fd. Sc. 2010. Vol. 38(2). P. 211–219.

14. Phân đa yếu tố cho chè VietGAP // Viện Nông hóa – Thổ nhưỡng. URL: <http://sfri.org.vn/TinTucChiTiet.aspx?MenuId=3&Id=59> (дата доступа: 10.04.2016).

15. Giới thiệu khái quát về tỉnh Phú Thọ // Cổng thông tin điện tử Tỉnh đoàn Phú Thọ. URL: <http://tinhdoanphutho.vn/gioithieu.aspx?id=1> (дата доступа: 10.04.2016).

## CHARACTERISTICS OF NITROGEN FIXATION BACTERIAL STRAIN SD1 FROM TEA PLANTATION SOIL OF THE PHU THO PROVINCE (THE REPUBLIC OF VIETNAM)

NGUEN VAN GIANG<sup>1</sup>, VU THI HIEN<sup>1</sup>, V.V. PYLNEV<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Vietnam National University of Agriculture;  
<sup>2</sup> Russian Timiryazev State Agrarian University)

*The research focuses on the determination of nitrogen-fixing bacterial strains composition in tea plantation soil of the Phu Tho province and detection of the most active one. The authors have determined 12 bacterial strains from the various soil samples on Burk nitrogen-free medium obtained from a tea plantation of the Phu Tho province. The tested strains were characterized by varying degrees of nitrogenase activity (nitrogen-fixed concentration from 0,605 to 5,486 mg/l). The SD1 strain singled out of these is characterized a highly active one because the concentration of nitrogen fixed by it reached 5,468 mg/l. The studies of the effect of temperature, pH, cultivation period, and the carbon source of the nutrient medium on the activity of the SD1 strain have shown that the isolated strain grows well at a temperature of 25–35°C (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration increased from 4,485 to 5,487 mg/l), pH 6–8 (the best development at pH 7), on a medium containing sucrose. Optimum temperatures for the SD1 strain growth are in the range of 30–32°C. After three days of cultivation the SD1 strain reached maximal density (7,6×10<sup>6</sup> cells/ml). The study has revealed that the maximum nitrogenase activity of the SD1 strain is obtained after 4 days of culturing. Besides nitrogen fixation, the SD1 strain is also capable of producing phytohormone IAA. The maximum amount of IAA synthesized by this strain reached 11,25 µg/ml after 3 days of incubation.*



*Nitrogen-fixing activity of SD1 strain reaches its peak on the 4th day of culturing. Basing on culture-morphological characteristics, the SD1 strain can be classified as the Azotobacter genus (according to the Bergey's Manual of Systematic Bacteriology).*

**Key words:** *Azotobacter spp; IAA phytohormone; nitrogen-fixing microorganisms; nitrogenase; tea plantation, soil.*

## References

1. *Posypanov G.S.* Metody izucheniya biologicheskoy fiksatsii azota vozdukha [Methods for studying the biological fixation of air nitrogen]. M.: Agropromizdat, 1991. 300 p.
2. *Ahmad F., Ahmad I., Khan M.S.* Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*, 2008. 163(2). P.173–181.
3. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2<sup>nd</sup> ed. Vol. 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. Genus III. *Azotobacter*. P. 384–402.
4. *Cao Ngọc Diệp và Nguyễn Thành Dũng.* Đặc tính vi khuẩn nội sinh phân lập trong cây khóm trồng trên đất phèn Vĩnh Thuận, tỉnh Kiên Giang // Tạp chí Khoa học. 2010. Vol. 15a. P. 54–63.
5. *Eichorst S.A., Breznak J.A., Schmidt T.M.* Isolation and characterization of soil bacteria that define *Terriglobus* gen. nov., in the phylum Acidobacteria // *Applied and environmental microbiology*. 2007. Vol. 73(8). P. 2708–2717.
6. *Glickmann E., Dessaux Y.* A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria // *Applied and environmental microbiology*. 1995. Vol. 61(2). P. 793–796.
7. *Jeffery G.H., Baset, J., Mendham J., Denney R.C.* Vogel's textbook of quantitative chemical analysis. 5<sup>th</sup> ed. Longman Scientific & Technical, 1989. 877 p.
8. *Kizilkaya R.* Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter* spp. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils // *J. Environ Biol*. 2009. Vol. 30 (1). P. 73–82.
9. *Nguyễn Kim Anh, Phạm Thị Ngọc Anh, Lê Thị Thúy Hoa, Nguyễn Thị Quỳnh Như, Đậu Thị Tinh.* Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn *Azotobacter* có hoạt tính nitrogenaza và sinh tổng hợp IAA (indol axetic axit) từ đất thôn Bình Kỳ- Hòa Quý- Ngũ Hành Sơn- // Đà Nẵng. Tuyển tập báo cáo «Hội nghị sinh viên nghiên cứu khoa học». lần thứ 6. Đại học Đà Nẵng. 2008. P. 300–304.
10. *Nguyễn Thị Phương Oanh, Trần Bửu Minh và Nguyễn Thị Pha.* Phân lập và tuyển chọn một số dòng vi khuẩn đất vùng rẫy lúa có khả năng cố định nitrogen và tổng hợp IAA // Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ sinh học: 26. 2013. P. 82–88.
11. *Pepper I.L., Gerba C.P.* Environmental Microbiology: A Laboratory Manual. 2<sup>th</sup> ed. 2004. 226 p.
12. *Sharma T., Kumar N., Rai N.* Isolation, Screening and Characterization of PGPR Isolates from Rhizosphere of Rice Plants in Kashipur Region (Tarai region) // *Biotechnology International*. Vol. 5(3). P. 69–84.
13. *Stell M., Suhaimi M.* Selection of suitable growth medium for free-living diazotrophs isolated from compost // *J. Trop. Agric. and Fd. Sc.* 2010. Vol. 38(2). P. 211–219.
14. Phân đa yếu tố cho chè VietGAP|Viện Nông hóa – Thổ nhưỡng. Available at: <http://sfri.org.vn/TinTucChiTiet.aspx?MenuId=3&Id=59> (date of access: 10.04.2016.)

15. Giới thiệu khái quát về tỉnh Phú Thọ// Cổng thông tin điện tử Tỉnh đoàn Phú Thọ.  
Available at: <http://tinhdoanphutho.vn/gioithieu.aspx?id=1> (date of access: 10.04.2016).

**Нгуен Ван Жанг** – к. с.-х. н., преп. кафедры микробиологической биотехнологии Вьетнамского национального сельскохозяйственного университета (Вьетнам, г. Ханой; e-mail: [nvgiang@vnua.edu.vn](mailto:nvgiang@vnua.edu.vn)).

**Ву Тхи Хьен** – маг. наук, м. н. с. кафедры микробиологической биотехнологии Вьетнамского национального сельскохозяйственного университета (Вьетнам, г. Ханой; e-mail: [vuhienasha@gmail.com](mailto:vuhienasha@gmail.com)).

**Пыльнев Владимир Валентинович** – д. б. н., проф. кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976-12-72; e-mail: [selection@timacad.ru](mailto:selection@timacad.ru)).

**Nguyen Van Zhang** – PhD (Ag), Lecturer of the Department of Microbiological Biotechnology, Vietnam National Agricultural University (Vietnam, Hanoi, e-mail: [nvgiang@vnua.edu.vn](mailto:nvgiang@vnua.edu.vn)).

**Wu Thi Hyen** – MSc, Junior Researcher of the Department of Microbiological Biotechnology, Vietnam National Agricultural University (Vietnam, Hanoi, e-mail: [vuhienasha@gmail.com](mailto:vuhienasha@gmail.com)).

**Vladimir V. Pylnev** – DSc (Bio), Prof. of the Department of Genetics, Biotechnology, Selection and Seed Growing, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 49; phone: +7 (499) 976-12-72; e-mail: [selection@timacad.ru](mailto:selection@timacad.ru)).