

NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT PHÂN SINH HỌC BÓN CHO ĐẬU NÀNH: CHẤT MANG THÍCH HỢP CHO SỰ SỐNG SÓT CỦA VI KHUẨN NỐT RỄ VÀ VI KHUẨN PSEUDOMONAS SPP

Cao Ngọc Diệp¹

ABSTRACT

Sinorhizobium fredii [isolate VN064] and *Pseudomonas spp* [isolate P14] were used to biofertilizer production for soybean cultivation in Dong Thap province with suitable carrier [50% peat and 50% sugar-byproduct (bagasse) plus 1% CMC] in granule formula. This carrier helped bacteria prolonge high survival during 6 months (bacteria population over $\log_{10}=8,4 - 8,7/g$ carrier)(TCVN-6166-1996 and 6167-1996 in 2001 Department of Agriculture and Rural Development).

Keywords: rhizobia, phosphate solubilizing bacteria, carriers, soybean, survival

Title: Study on multi-strain biofertilizer production for soybean cultivation: appropriate carrier for the good survival of rhizobia and pseudomonas

TÓM TẮT

Chúng vi khuẩn nốt rễ *Sinorhizobium fredii* [VN064] và vi khuẩn hòa tan lân, tổng hợp IAA *Pseudomonas spp.* [P14] được đưa vào sản xuất phân sinh học đa chủng bón cho đậu nành trồng trong tỉnh Đồng Tháp trong chất mang gồm 50% than bùn và 50% mùn mía + 1% CMC được ép thành viên có độ sống sót cao (mật số $>\log_{10}=8,4 - 8,7/g$ chất mang) sau 6 tháng tồn trữ đạt tiêu chuẩn TCVN-6166-1996 và 6167-1996 ban hành năm 2001 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông Thôn Việt nam.

Từ khóa: Vi khuẩn nốt rễ, vi khuẩn hòa tan lân, chất mang, đậu nành, sự sống sót

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự gia tăng sản lượng cũng như năng suất cây trồng tương quan thuận với lượng phân bón hóa học sử dụng và chính sự lạm dụng phân hóa học và thuốc bảo vệ thực vật làm cho môi trường ngày càng ô nhiễm và nông dân cũng bị ảnh hưởng (Kumar *et al.*, 2001). Chính vì thế, ngày càng có nhiều nghiên cứu và tìm kiếm nguồn phân bón sinh học để thay thế lần lần phân hóa học. Sự hiệu quả của vi khuẩn cố định đạm đã giúp giải quyết phần nào lượng phân đạm hóa học (Chabot *et al.*, 1996). Ngoài ra, những vi sinh vật hòa tan lân khó tan đã được nhiều nhà khoa học phân lập và sản xuất phân lân sinh học để tận dụng nguồn lân khó tan có sẵn trong đất và giảm bớt lượng lân hoá học như super lân... (Katnelzson *et al.*, 1962; Subba Rao, 1985; Kucey, 1983, 1989; Whitelaw *et al.*, 1999). Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cho thấy những vi sinh vật cố định đạm và hòa tan lân sẽ gia tăng tác dụng nếu như có sự hỗ trợ của những vi khuẩn vùng rễ kích thích sự tăng trưởng cây trồng (Plant Growth Promoting Rhizobacteria =PGPR) ngay cả trên cây một và hai lá mầm (Shimshick và Hebert, 1979; Terouchi và Syono, 1990), những

¹ Viện Nghiên Cứu và Phát Triển Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại học Cần Thơ

dòng vi khuẩn này giúp cho lông hút và rễ của những cây trồng phát triển nhanh chóng (Molla *et al.*, 2001). Nhiều dòng vi sinh vật cố định đạm, hòa tan lân và cả PGPR có thể tổng hợp ra nhiều kích thích tố tăng trưởng (phytohormone) gia tăng sự hấp thu nhiều dưỡng chất hơn (Chabot, 1993; Lippmann *et al.*, 1995; Sergeeva *et al.*, 2002), chính vì vậy mà nhiều nhà khoa học phối hợp nhiều nhóm vi sinh vật để phát huy tác dụng của tất cả các nhóm vi sinh vật có ích (Dashti *et al.*, 1997, 1998; Parmar và Dadarwal, 1999) và điều này đã được nhiều nhà khoa học sớm tổng hợp một dạng phân bón sinh học đa chủng đa chức năng cho cây trồng (Okon và Kapulnik, 1986). Loại phân bón này đã phát huy tác dụng trên cây bắp lai (Chabot *et al.*, 1996), đậu nành (Molla *et al.*, 2001), đậu pea (Kumar *et al.*, 2001), lúa mạch (Belomov *et al.*, 1995), cải ăn lá (Antoun *et al.*, 1998), trên lúa gạo và lúa mì (Rasul *et al.*, 1998). Vì vậy, người ta tìm kiếm những vật liệu thích hợp để giải quyết được những khó khăn trên trong đó sử dụng than bùn như là một chất mang cho vi khuẩn sống sót và phát triển là thích hợp nhất thế nhưng than bùn có những bất lợi sau:

- Thành phần lý hóa tính của than bùn thay đổi theo nguồn gốc thành lập và không ổn định.
- Giá thành cao ở những nước không có nguồn than bùn mà phải nhập nội nên giá thành phân chủng cao.
- Khi khử trùng nhiệt ướt, than bùn có thể hình thành một số độc tố không mong muốn ảnh hưởng đến sự sống sót của vi khuẩn.

Để giải quyết những yếu tố bất lợi trên, người ta sử dụng những vật liệu khác để thay thế than bùn như than đá, vermiculite (Paau, 1989) hay mụn xơ dừa (coir-dust)(Faizah *et al.*, 1980), mùn mía, bentonite, kaolinite, rơm rạ, phân hữu cơ, cùi bắp.... (Kremer và Peterson, 1983; Pramanik và Iswaran, 1973; Sparrow và Ham, 1983) hay người ta có thể pha trộn các vật liệu này với nhau để tạo ra chất mang tốt nhất cho sự sống sót của vi khuẩn.

Mục tiêu của đề tài là nghiên cứu chất mang (carrier) thích hợp, rẻ tiền, dễ tìm... giúp cho vi khuẩn sống sót tốt trong 6 tháng trong điều kiện nhiệt độ phòng và sản phẩm có chất lượng đạt yêu cầu của phân chủng sinh học (TCVN 6166-1996 và TCVN 6167-1996 ban hành năm 2001 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn).

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu thí nghiệm

2.1.1 Vi khuẩn

- Vi khuẩn nốt rễ (*Sinorhizobium fredii*) dòng VN064 phân lập từ nốt rễ đậu nành trồng ở thị xã Cao Lãnh, Đồng Tháp (Nguyễn Ngọc Đáng, 2004).
- Vi khuẩn *Pseudomonas* spp. dòng P14 phân lập từ đất vùng rễ cây So Đũa ở Đồng Tháp, dòng vi khuẩn này hòa tan lân cao và tổng hợp IAA [indole-3-acetic acid] khá (Lê Kim Sáu, 2005).

2.1.2 Than bùn và bã bùn mía

Than bùn có nguồn gốc từ các vỉa than bùn ở vùng Maren, huyện Thạnh Hóa, tỉnh Long An và bã bùn mía là các chất thải từ nhà máy đường Vị Thanh, tỉnh Hậu Giang với thành phần được trình bày trong bảng 1.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Vi khuẩn nốt rễ dòng VN064 được nuôi trong 150 ml môi trường Yeast Extract Mannitol (Somasagaran và Hoben, 1995) trong các bình tam giác 250 mL đặt trên máy lắc xoay vòng trong 48 giờ ở nhiệt độ phòng và đạt mật số > 10⁹ tế bào/ml, sẵn sàng để trộn vào chất mang để sản xuất phân sinh học 50%. Vi khuẩn *Pseudomonas* spp. dòng P14 (Lê Kim Sáu, 2005), vi khuẩn này nuôi trong môi trường King B trong 2 ngày (cấp 1) trên máy lắc ngang để mật số đạt 10⁹ tế bào/ml, sau đó được nhân trong môi trường đơn giản (cấp 2) để ủ trong chất mang, đồng thời vi khuẩn này được nuôi cấp 3 với môi trường sucrose (10%) – apatit (1%)(Whitelaw *et al.*, 1999) để sản xuất cấp 3 dùng để tưới cho cây đậu như là nguồn cung cấp IAA trong điều kiện lên men bình thường ở nhiệt độ phòng trong 7 ngày, mật số đạt > 10⁷ tế bào/ml với 54 µg/ml PO₄ và 7,2 µg/ml IAA và sử dụng dịch lên men để dùng trong thí nghiệm.

Bảng 1: Thành phần lý hóa tính của than bùn và bã bùn mía

Đặc tính	Than bùn (a)	Bã bùn mía (b)
pH	3,0 – 4,6	6,7
N tổng số (%)	0,3 – 0,4	2,32
P tổng số (% P ₂ O ₅)	0,047	-
P dễ tiêu (mg P ₂ O ₅ /100 g đất)	-	5,29
K tổng số (% K ₂ O)	0,02	-
K ₂ O trao đổi (meq K ₂ O)/100 g đất)	-	1,79
Humic (%)	1,4	-
Chất hữu cơ (%)	12,4	50,8
Tỉ lệ C/N	14 – 15	-

(a) Số liệu từ Trung tâm Tiêu chuẩn – Đo lường 3, TP. Hồ chí Minh.

(b) Số liệu từ phòng Phân tích Đất, Bộ môn Khoa học Đất, Khoa Nông Nghiệp, Đại học Cần Thơ

Mục đích tạo ra chất mang thích hợp cho vi khuẩn có thể sống sót và phát triển tốt trong 6 tháng và để có chất mang tốt (có pH= 6,5-7,0; 1-3% N; tỉ lệ C/N= 20 - 30), một chất mang được tổ hợp từ các vật liệu dễ tìm, rẻ tiền, dễ xử lý tiết trùng như sau:

Giai đoạn 1: Chọn chất mang (chất độn) để nuôi vi khuẩn

Than bùn hay mùn mía có thành phần lý hóa tính được trình bày trong bảng 1, được xử lý cho khô bằng cách phơi trong mát hay sấy ở nhiệt độ thấp (xem như nghiệm thức không khử trùng). Thí nghiệm được bố trí theo thể thức ngẫu nhiên hoàn toàn với 4 lần lặp lại. Thí nghiệm có 3 nghiệm thức: Than bùn, than bùn+mùn mía, than bùn+phân heo+mùn mía (bảng 2) và chất mang không khử trùng nhiệt ướt và khử trùng và theo thời gian: 0, 1, 2, 3, 4, 5, và 6 tháng; Các nguyên vật liệu trên được sấy đồng loạt ở 100 hay 105°C trong 24 giờ trước khi

tiến hành thí nghiệm. Dòng vi khuẩn nốt rễ (dòng VN064) và dòng vi khuẩn *Pseudomonas* spp. (dòng P14) được nuôi trong môi trường thích hợp để mật số đạt 10^9 tế bào/ml (như mô tả ở phần trên), chất mang được khử trùng nhiệt ướt ở 121°C trong 30 phút và kéo dài 3 đợt. Dịch vi khuẩn được trộn đều vào chất mang ở 50% ẩm độ, sau đó được ủ ở nhiệt độ phòng ($28 - 30^\circ\text{C}$), lấy mẫu để đếm sống vi khuẩn trong môi trường thích hợp (YEM cho vi khuẩn nốt rễ và môi trường King B hay *Pseudomonas* Isolation Agar [Difco]) lúc khởi đầu và định kỳ một tháng/lần để xác định loại chất mang thích hợp cho vi khuẩn sống sót và phát triển trong một thời gian nhất định.

Bảng 2: Tổ hợp các nghiệm thức

Dưỡng chất	Than bùn (%)	Than bùn +Mùn mía (%)	Than bùn+Mùn mía+phân heo (%)
Than bùn	95	50	50
Mùn mía	0	45	25
Phân heo (hoai)	0	0	20
Tro trấu đen	3	3	3
Vôi (CaCO_3)	1	1	1
Apatit	1	1	1

Giai đoạn 2: Xử lý chất mang để kéo dài sự sống sót của vi khuẩn

Chất mang được chọn lọc trong giai đoạn 1 được tiến hành xử lý với hợp chất CMC và Alginate để nâng cao chất lượng chất mang, cụ thể như sau:

Dịch vi khuẩn lên men trong môi trường thích hợp (như trong giai đoạn 1) đạt mật số 10^9 tế bào/ml, bổ sung với CMC với 3 nồng độ 0,1 và 2% và Alginate với 3 nồng độ 0, 1 và 2%. Thí nghiệm có 6 nghiệm thức được trình bày như trên, và thời gian: 0, 1, 2, 3, 4, 5 và 6 tháng sau khi tồn trữ, với 4 lần lặp lại.

Sau đó trộn với chất mang đã được chọn lọc trong giai đoạn 1, tiến hành đếm sống vi khuẩn trong môi trường thích hợp lúc khởi đầu và định kỳ 1 tháng/lần, mục tiêu là kéo dài chất lượng sản phẩm ít nhất là 6 tháng trong điều kiện tồn trữ nhiệt độ phòng ($28 - 30^\circ\text{C}$).

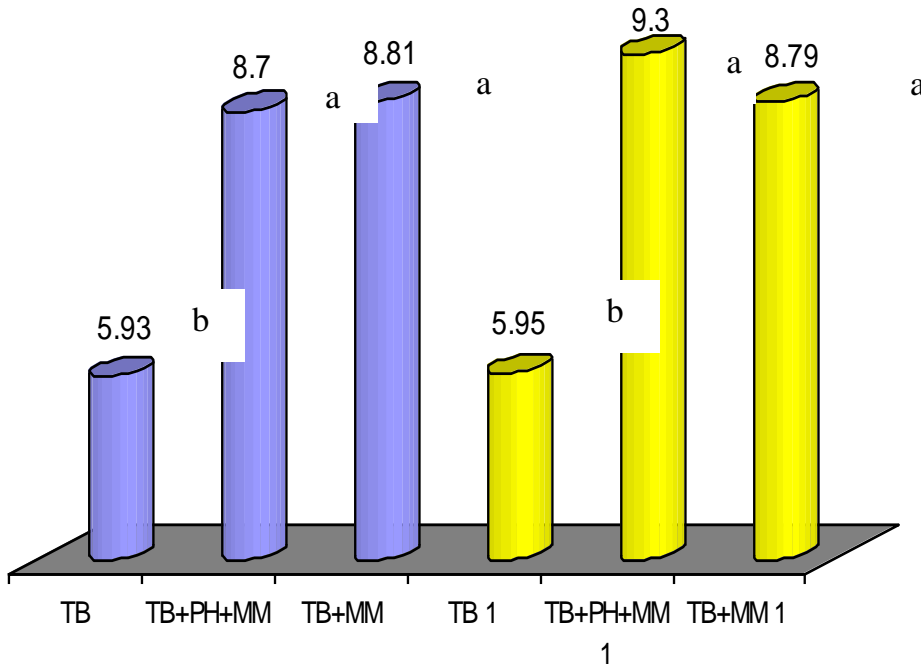
3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thí nghiệm 1

Khảo sát sự sống sót của 2 loại vi khuẩn trong 3 loại chất mang là: than bùn (Kiên Giang), than bùn+phân heo (hoai)+mùn mía và hỗn hợp than bùn+mùn mía với điều kiện không khử trùng và khử trùng nhiệt ướt.

Kết quả cho thấy mật số vi khuẩn nốt rễ [VKNR] trong 2 loại chất mang là than bùn+phân heo+mùn mía và than bùn+mùn mía trong điều kiện không và khử trùng nhiệt ướt (hình 6) sau 6 tháng trữ trong nhiệt độ phòng; trong hình 7 cho thấy chất mang hỗn hợp gồm than bùn+phân heo+mùn mía không khử trùng có mật số VKNR ổn định và ở mức cao trong suốt từ tháng thứ 2 đến hết tháng thứ 6, kể đến là chất mang gồm hỗn hợp than bùn+mùn mía không khử trùng và chất mang gồm

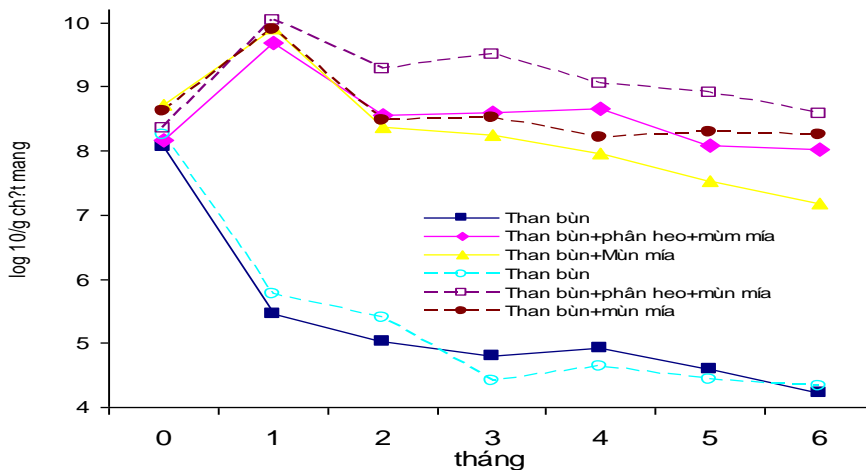
hỗn hợp than bùn+phân heo+mùn mía khử trùng có mật số VKNR ổn định và khá cao (\log_{10}/g chất mang > 8.0) sau 6 tháng trữ ở nhiệt độ phòng.



thành phần chất mang
 TB= than bùn, TB+PH+MM= than bùn+phân heo+mùn mía, TB+MM= than bùn+mùn mía; 1: có khử trùng

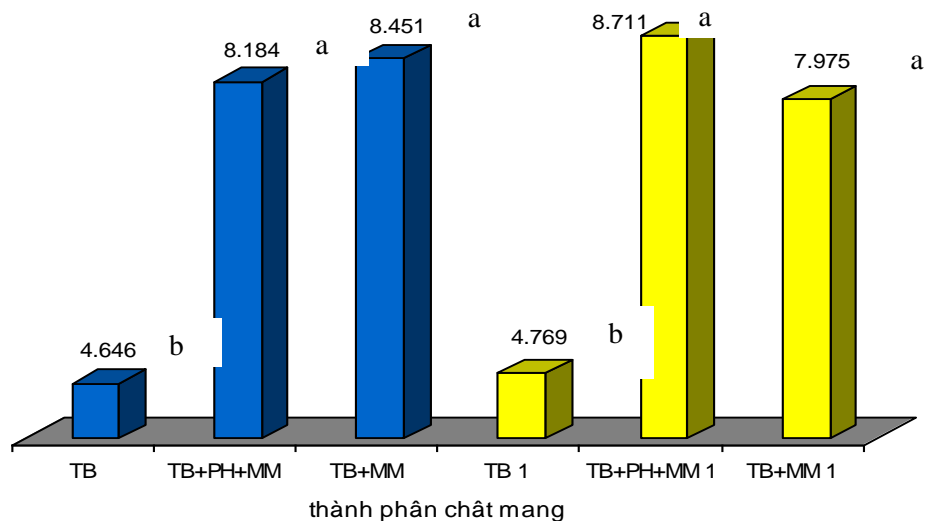
(Những cột có số theo sau cùng một chữ không khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức độ 1%)

Hình 1: Mật số vi khuẩn nốt rễ (\log_{10}/g chất mang) trong 3 loại chất mang trong điều kiện không và khử trùng nhiệt ướt



(---) chất mang không khử trùng ; (-) chất mang khử trùng nhiệt ướt

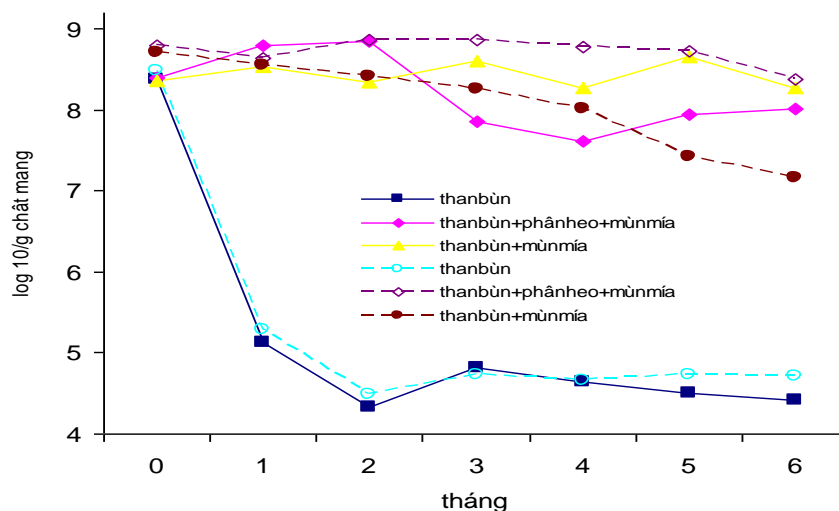
Hình 2: Mật số vi khuẩn nốt rễ (\log_{10}/g chất mang) trong 3 loại chất mang (không và có khử trùng nhiệt ướt) trong 6 tháng



TB= than bùn, TB+PH+MM= than bùn+phân heo+mùn mía, TB+MM= than bùn+mùn mía; 1: có khử trùng

(Những cột có số theo sau cùng một chữ không khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức độ 1%)

Hình 3: Mật số vi khuẩn *Pseudomonas* spp. (log₁₀/g chất mang) trong 3 loại chất mang không và khử trùng nhiệt ướt



(-----) chất mang không khử trùng ; (-) chất mang khử trùng nhiệt ướt

Hình 4: Mật số vi khuẩn *Pseudomonas* spp. (log₁₀/g chất mang) trong 3 loại chất mang (không và có khử trùng nhiệt ướt) trong 6 tháng

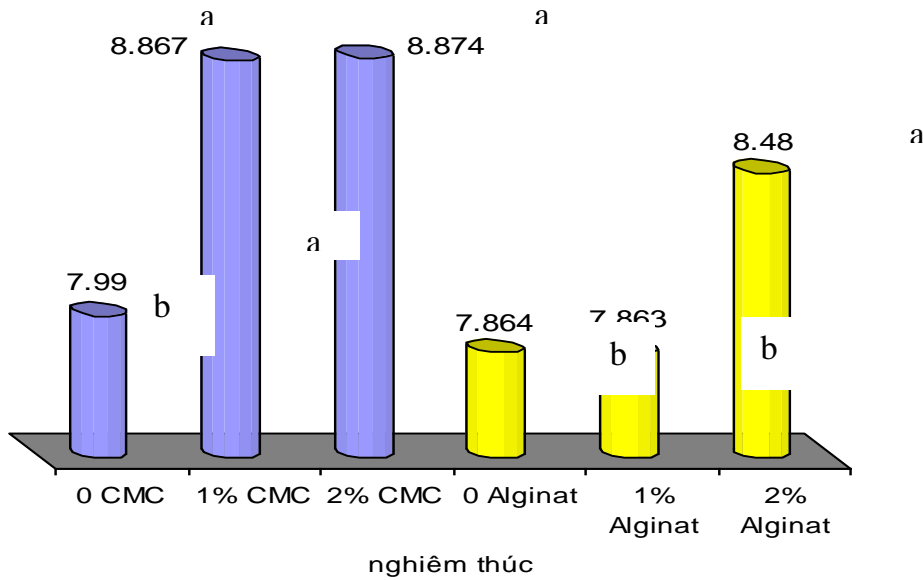
3.2 Thí nghiệm 2

Từ kết quả thí nghiệm 1, chúng tôi chọn **chất mang than bùn+mùn mía không khử trùng** để nghiên cứu ảnh hưởng chất dính (CMC [carboxyl methyl-cellulose] và Alginate) đến sự sống sót của 2 loại vi khuẩn trên vì hai loại chất mang này dễ kiếm và hiệu quả cao, giá thành thấp vì không khử trùng (đỡ tốn năng lượng).

Kết quả từ hình 5 cho thấy chất mang bổ sung 1% hay 2% CMC có mật số VKNR cao nhất trong 6 tháng trừ trong đó không có sự khác biệt ý nghĩa về giữa 2 nồng độ 1% và 2% CMC đối với sự sống sót của VKNR trong 6 tháng (hình 5), tính không ổn định của Alginate cũng như nồng độ và giá thành của Alginate đã ảnh hưởng đến khâu xét chọn chất dính.

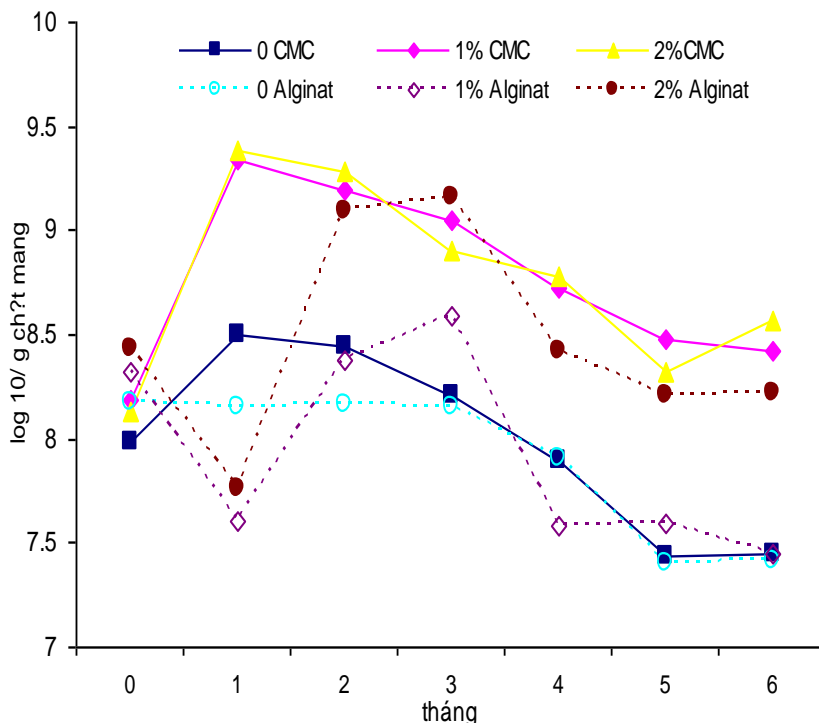
Trong hình 6 và hình 7 cho thấy kết quả sự sống sót của vi khuẩn *Pseudomonas* spp. tương tự như trường hợp VKNR và với 1% CMC phù hợp cho sự sống sót của vi khuẩn này trong 6 tháng.

Như vậy, qua 2 thí nghiệm trên chúng tôi chọn thành phần chất mang là THAN BÙN+MÙN MÍA cùng với 1% CMC để sản xuất phân sinh học sau này.

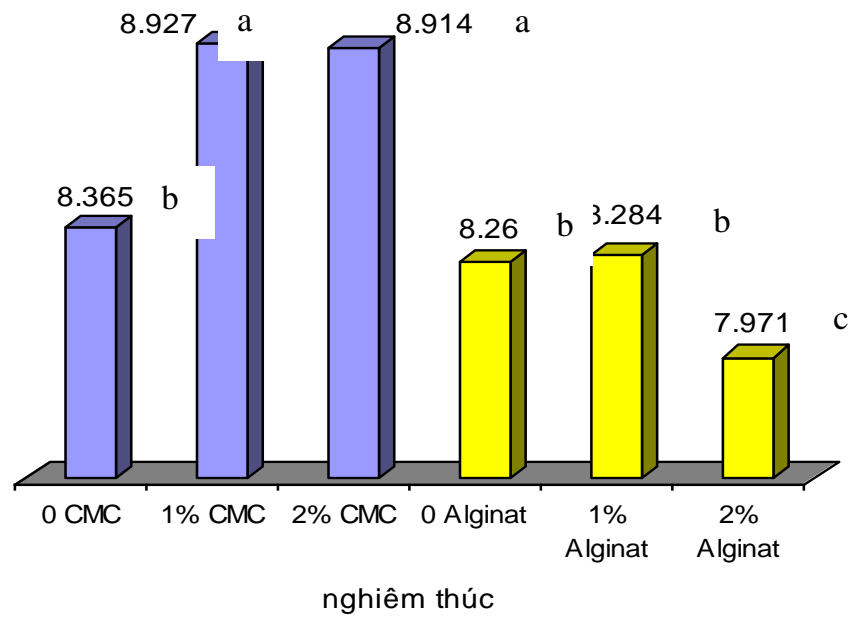


(Những cột có số theo sau cùng một chữ không khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức độ 1%)

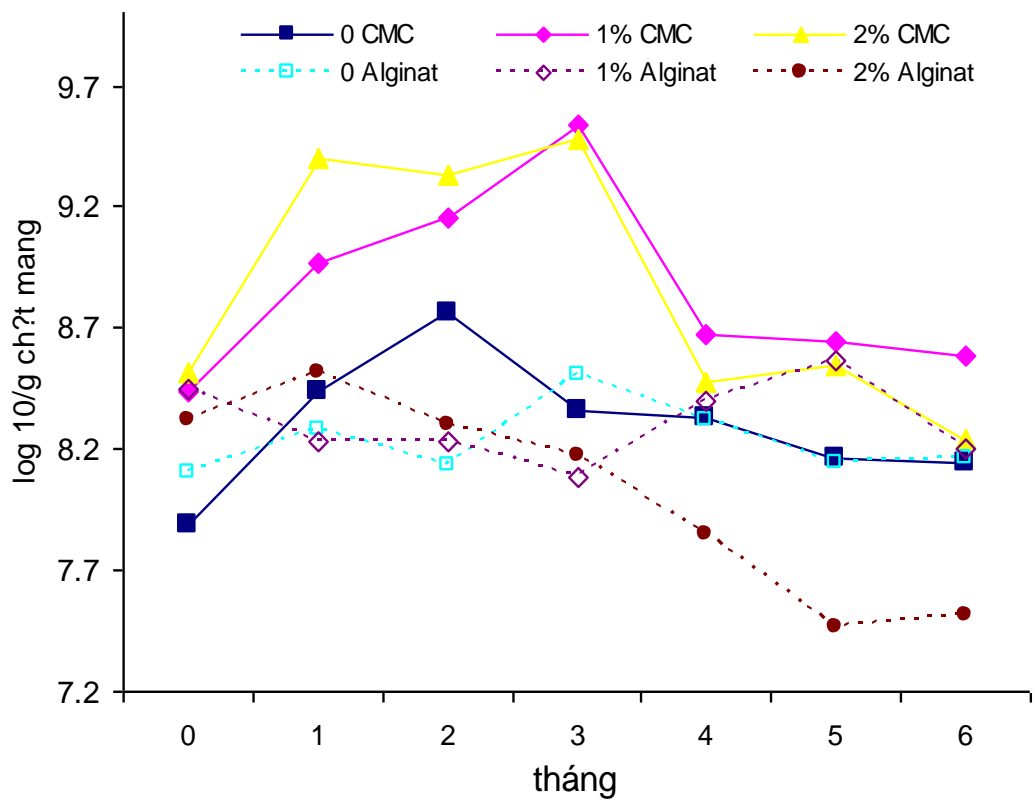
Hình 5: Mật số vi khuẩn nốt rỗ (log₁₀/g chất mang) trong chất mang than bùn+mùn mía với 2 loại chất dính (CMC và Alginate) và 3 nồng độ



Hình 6: Mật số vi khuẩn nốt rỗ (log₁₀/g chất mang) trong chất mang than bùn+mùn mía với 2 loại chất dính (CMC và Alginate) và 3 nồng độ



(Nồng độ cơ sở theo sau cùng một chữ không khác biệt ý nghĩa trong kiểm định ở mức độ 1%)
Hình 7: Mật số vi khuẩn *Pseudomonas* spp. (log₁₀/g chất mang) trong chất mang than bùn+mùn mía với 2 loại chất dính (CMC và Alginate) với 3 nồng độ



Hình 8: Mật số vi khuẩn *Pseudomonas* spp. (log₁₀/g chất mang) trong chất mang than bùn + mùn mía với 2 loại chất dính (CMC và Alginate) với 3 nồng độ

Từ lâu người ta sử dụng than bùn như là một chất mang giúp cho vi khuẩn sống sót và phát triển thích hợp nhất thể nhưng than bùn có những bất lợi như thành phần lý hóa tính của than bùn thay đổi theo nguồn gốc thành lập và không ổn định, giá thành cao ở những nước không có nguồn than bùn mà phải nhập nội nên giá thành phân chủng cao và khi khử trùng nhiệt ướt, than bùn có thể hình thành một số độc tố không mong muốn ảnh hưởng đến sự sống sót của vi khuẩn. Để giải quyết những yếu tố bất lợi trên, người ta sử dụng những vật liệu khác để thay thế than bùn như than đá, vermiculite (Paau, 1989) hay mụn xơ dừa (coir-dust)(Faizah *et al.* (1980), mùn mía, bentonite, kaolinite, rơm rạ, phân hữu cơ, cùi bắp.... (Kremer và Peterson, 1983; Pramanik và Iswaran, 1973; Sparrow và Ham, 1983) hay người ta có thể pha trộn các vật liệu này với nhau để tạo ra chất mang tốt nhất cho sự sống sót của vi khuẩn. Tuy nhiên, để kéo dài sự sống sót của vi khuẩn trong chất mang trong một thời gian, người ta sử dụng các dạng cao phân tử (polymers) tự nhiên hay tổng hợp (Dommergues *et al.*, 1979; Jung *et al.* (1982) như gum, xanthan, CMC (carboxyl methyl cellulose), PVP (polyvinyl pyrrolidol) hay polyethylenglycerol (PEG), và gum arabic giúp vi khuẩn sống sót tốt (Rodriguez-Navarro *et al.* (1992) hay theo Dernandin và Freire (2000) hỗn hợp gum và PVP có thể kéo dài sự sống sót của vi khuẩn nốt rễ lên đến 8 tháng sau khi tồn trữ và một trong những tiến bộ trong sự duy trì sự sống sót và khả năng tạo nốt rễ của các dòng vi khuẩn nốt rễ được nuôi trong môi trường lỏng bổ sung 2% PVP (Tran Yen Thao *et al.*, 2002).

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Chất mang thích hợp cho phân sinh học đa chủng bón cho đậu nành với thành phần là 50% than bùn + 50% mùn mía cùng với 1% CMC làm chất dính để ép thành viên để bón (rãi) cho đậu nành sạ lan hay rải thành hàng hoặc dạng rời để trộn với tro trấu lấp lỗ đậu.

ACKNOWLEDMENT

Đề tài này được sự tài trợ kinh phí của Sở Khoa Học và Công nghệ tỉnh Đồng Tháp

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Antoun, H., C. J. Beauchamp, N. Goussard, R. Chabot and R. Lalande. 1998. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil* 204: 57 – 67.
- Belimov, A. A.; A. P. Kojemiakov and C.V. Chubarliyeva. 1995. Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria. *Plant and Soil* 173: 29-37.
- Chabot, R., H. Antoun, et M. P. Cescas. 1993. Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Can. J. Microbiol.* 39: 941 – 947.
- Chabot, R., H. Antoun and M.C. Cescas. 1996. Growth promoting of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Plant Soil* 184:311-321.

- Dashiti, N; F. Zhang, R. Hynes and D. L. Smith. 1997. Application of plant growth promoting rhizobacteria to soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) increases protein and dry matter yield under short season conditions. *Plant and Soil* 188, 33-41.
- Dashiti, N; F. Zhang, R. Hynes and D. L. Smith. 1998. Plant growth promoting rhizobacteria accelerate nodulation and increase nitrogen fixation activity by field grown soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under short season conditions. *Plant and Soil* 200, 205-213.
- Dommergues, Y.K., H.G. Diem, and C. Davies. 1979. Polyacrylamide entrapped *Rhizobium* as a carrier for legumes inoculants. *Applied and Environmental* 37: 779 – 781.
- Nguyễn Ngọc Đáng. 2004. Đa dạng sinh học vi khuẩn nốt rễ phân lập từ nốt rễ Đậu nành ở phía đông sông Hậu bằng phương pháp PCR-ARDRA 16S-23S IGS. Luận văn tốt nghiệp Thạc sĩ Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
- Denardin, N.D. and J.R.J. Freire. 2000. Assessment of polymers for the formulation of legume inoculants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16: 215-217.
- Faizah, A.W., W.J. Broughton and C.K. John. 1979. *Rhizobia in Tropical Legumes-X. Growth in Coir-Dust-Soil Compost*. *Soil Biol. Biochem.* 12: 211-218.
- Jung, G., J. Mugnier, H.G. Diem and Y.R. Dommergues. 1982. Polymer-entrapped *Rhizobium* as an inoculant for legumes. *Plant and Soil* 65: 219 – 231.
- Katznelson, H; E. A. Peterson and J. W. Rouatt. 1962. Phosphate – dissolving microorganisms on seed in the root zone of plants. *Canadian Journal of Botany*, 40: 1181 - 1186.
- Kremer, R. J. and H.L. Peterson. 1982. Effect of inoculant carrier on survival of *Rhizobium* on inoculant seed. *Soil Sci.* 134: 117 – 125.
- Kucey, R. M. N. 1983. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta Soil. *Canadian journal of Soil Science*, 63: 671 – 678.
- Kucey, R. M. N.; H.H. Janzen and M. E. Leggett. 1989. Microbially mediated increases in plant- available phosphorus. *Advances in Agronomy*, 42: 199 - 228.
- Kumar, D., B. S.; I. Bergersen and A. M. Martensson. 2001. Potential for improving pea production by co-inoculation with fluorescent *Pseudomonas* and *Rhizobium*. *Plant and Soil* 229: 25-34
- Lippmann B, V. Leinhos and H. Bergmann. 1995. Influence of auxin producing rhizobacteria on root morphology and nutrient accumulation of crops. I. Changes in roots morphology and nutrient accumulation in maize (*Zea mays* L.) caused by inoculation with indole-3-acetic acid (IAA) producing *Pseudomonas* and *Acinetobacter* strains or IAA applied exogenously. *Angew Bot.* 69, 31-36.
- Molla, A. H.; H. Shamsuddin; M. S. Halim; M. Morziah and A. B. Putch. 2001. Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems. *Soil Biol. and Biochem.* 33: 457-463.
- Okon, Y. and Y. Kapulnik. 1986. Development and function of *Azospirillum* inoculated roots. *Plant and Soil* 90: 3-16.
- Paa, A.S. 1989. Improvement of *Rhizobium* Inoculants. *Applied and Environmental Microbiology*. 55,862-865.
- Parmar N. and K. R. Dadarwal. 1999. Stimulation of nitrogen fixation and induction of flavoid like compounds by rhizobacteria. *J. Appl. Microbiol.* 86, 36-44.
- Praminik, M. and Iswaran. 1973. Survival of *Rhizobium japonicum* in various carriers. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitol. Intektionskr. Hyg. Abtr.* 128: 232 – 239.
- Rasul, G.; M. S. Mirza; F. Latif and K. A. Malik. 1998. Identification of plant growth hormones produced by bacterial isolates from rice, wheat and kallar grass. In K. A. Malik et al (eds.). *Nitrogen Fixation with Non-legumes*, pp. 25-37. Kluwer Academic Publishers. UK.

- Rodriguez-Navvaro, D.N., F. Temprano and R. Orive. 1991. Survival of *Rhizobium* sp. (*Hedysarum coronarium* L.) on peat-based inoculants and inoculated seeds. *Soil Biol. Biochem.* 23: 375 – 379.
- Lê Kim Sáu. 2005. Phân lập vi sinh vật tổng hợp IAA và hiệu quả của chúng trên cây trồng. Luận văn Thạc sĩ Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần thơ, Cần Thơ, Việt nam.
- Sergeeva, E.; A. Liaimer and B. Bergman. 2002. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. *Planta* 215: 229-238.
- Shimshick, E. J. and R. R. Herbert. 1979. Binding characteristics of N₂-fixing bacteria to cereal roots. *Appl. Environ. Microbiology.* 38: 447-453.
- Somasegaran, P. and H. J. Hoben. 1985. Methods in legume-Rhizobium technology. NifTAL Project and MIRCEN. Dept of Agro. and Soil Sci. College of Trop. Agric. and Human Resour., Univ. of Hawaii, Honolulu.
- Sparrow, S.D. and G. H. Ham. 1982. Survival of *Rhizobium phaseoli* in six carrier materials. *Agronomy J.* 75: 181 – 184.
- Subba Rao, N. S. 1982. *Biofertilizers in Agriculture.* Oxford, UK.
- Terouchi, N. and K. Syono. 1990. *Rhizobium* attachment and curling in asparagus, rice and oat plants. *Plant Cell Physiol.* 31: 119-127.
- Tran yen Thao, W. Singleton and D. herridge. 2002. Inoculation Responses of Soybean and Liquid Inoculants as an Alternative to Peat-Based Inoculants, pp: 67-74. In: *Inoculants and Nitrogen Fixation of Legumes.* Ed. D. Herridge, ACIAR Proceedings No109.
- Whitelaw, M.A., T.J. Harden and K. R. Helyar. 1999. Phosphate solubilizing in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biol. Biochem.* 31:655-665