

PHÂN LẬP VI KHUẨN HÒA TAN LÂN (P-NHÔM) TRÊN VÙNG ĐẤT PHÈN Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Châu Thị Anh Thy^{1,*}, Nguyễn Hoàng Kim Nương¹, Nguyễn Thị Kiều Anh¹, Dương Minh Viễn¹

TÓM TẮT

Sự thiếu hụt lân là trở ngại phổ biến trên một số loại đất, đặc biệt là đất phèn khi lân bị cố định bởi nhôm và sắt. Vi khuẩn hòa tan lân được quan tâm nghiên cứu gần đây nhờ khả năng chuyển hóa lân từ dạng không hữu dụng thành hữu dụng cho sự hấp thu của cây trồng. Trong nghiên cứu này, việc phân lập các dòng vi khuẩn có khả năng hòa tan lân dưới dạng phức hợp với nhôm cũng như đánh giá khả năng hòa tan lân và định danh các dòng vi khuẩn phân lập đóng vai trò quan trọng trong việc giảm sử dụng phân hóa học, tối ưu khả năng cung cấp lân từ đất. Kết quả phân lập được 75 dòng vi khuẩn có khả năng hòa tan lân trên các ruộng trồng lúa và mía/dừa ở vùng đất phèn tại Hậu Giang và Đồng Tháp và chia làm ba nhóm hình thái tế bào khác nhau gồm: hình cầu, hình que và hình cầu dẹt. Đánh giá khả năng hòa tan lân của các dòng vi khuẩn chọn lọc cho thấy hàm lượng lân hòa tan đạt cao nhất đến $73,25 \pm 0,57$ mg/L P và thấp nhất đạt $9,72 \pm 0,59$ mg/L P. Các nghiệm thức có vi khuẩn đều có hàm lượng lân hòa tan cao hơn nghiệm thức đối chứng, khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%. Các dòng vi khuẩn được định danh (với mức độ tương đồng đạt 99%) chủ yếu nằm trong nhóm vi khuẩn *Serratia marcescens* (70%), còn lại thuộc nhóm *Burkholderia vietnamensis*.

Từ khóa: *Burkholderia vietnamensis*, đất phèn, lân cố định trên nhôm, *Serratia marcescens*, vi khuẩn hòa tan lân.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đồng bằng sông Cửu Long hiện có 1,6 triệu ha đất phèn (chiếm 89% diện tích đất phèn trên cả nước), trong đó đất phèn hoạt động chiếm khoảng 613 ngàn ha [1]. Lân là một trong ba nguyên tố đa lượng có vai trò quan trọng quyết định năng suất và chất lượng cây trồng.

Trên đất phèn, sự cố định lân tạo thành các hợp chất lân khó tan như phosphat sắt và phosphat nhôm chiếm từ 90-95%, nhóm phosphat canxi chiếm thấp hơn từ 5-10% trong tổng lân vô cơ. Do đó, dù trong đất có lân tổng số khá hoặc giàu nhưng lân dễ tiêu lại rất nghèo, hạn chế sự hấp thu lân của cây trồng, từ đó hạn chế năng suất và chất lượng sản phẩm nông sản. Ngoài ra, theo thói quen của người nông dân, bón nhiều phân lân cũng gây nguy cơ tích lũy các độc chất như sản phẩm phụ trong quá trình sản xuất phân như arsen và selen. Nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước cho thấy hiệu quả của các dòng vi khuẩn hòa tan lân được phân lập trên các biểu loại đất khác nhau. Chúng các dòng vi khuẩn này giúp gia tăng sinh trưởng và năng suất của nhiều giống cây trồng

[2]. Vì vậy, ứng dụng vi sinh vật có khả năng hòa tan lân, đặc biệt trên đất phèn mở ra thời kì mới cho sản xuất nông nghiệp bền vững, bảo vệ môi trường. Tuy nhiên, nghiên cứu các dòng vi khuẩn hòa tan lân trên đất phèn ở nước ta vẫn còn hạn chế. Do đó, nghiên cứu “*Phân lập vi khuẩn hòa tan lân (AI-P) trên vùng đất phèn ở ĐBSCL*” nhằm mục tiêu phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn có hiệu quả hòa tan lân trên đất phèn, hướng tới ứng dụng sản xuất chế phẩm phân bón vi sinh hòa tan lân giúp cải thiện sinh trưởng và năng suất cây trồng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.1.1. Địa điểm nghiên cứu

Khảo sát và lấy mẫu đất tại 2 vùng đất phèn tiêu biểu ở đồng bằng sông Cửu Long (huyện Long Mỹ, tỉnh Hậu Giang và huyện Tam Nông, tỉnh Đồng Tháp). Tại mỗi vùng chọn ngẫu nhiên 4 ruộng trồng lúa và 4 ruộng trồng mía/dừa.

2.1.2. Hóa chất thí nghiệm

Môi trường Tryptose Soybean agar (TSA) gồm 30g Tryptose Soybean Broth (TSB) (India), 15 g agar pha trong một lít nước cất.

¹ Bộ môn Khoa học Đất, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

*Email: ctathy@ctu.edu.vn

Các thí nghiệm nuôi sinh khối, phân lập vi khuẩn, khảo sát khả năng hòa tan lân khó tan trong môi trường và xác định cơ chế hòa tan lân khó tan của các dòng vi khuẩn phân lập được trong môi trường Pikovskaya hiệu chỉnh [3]. Thành phần trong 1 lít môi trường gồm 10 g glucose, 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g KCl, 0,1 g NaCl, 1 g Yeast extract.

Hóa chất để phân tích hàm lượng lân hòa tan gồm dung dịch P chuẩn 10 ppm, L – ascorbic acid, $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Lân hòa tan được đo trên máy quang phổ ở bước sóng 880 nm theo phương pháp phân tích của Murphy và Reiley [4].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu mẫu đất

Ở các ruộng thu mẫu, khoan và mô tả phẫu diện để xác định biểu loại đất. Khi xác định đúng biểu loại đất phèn cần nghiên cứu, sẽ lấy 5 mẫu đất phụ theo hình chéo để gộp lại thành 1 mẫu chính trên mỗi ruộng. Mẫu được lấy ở độ sâu từ mặt đất đến hết tầng có xuất hiện nhiều đốm gỉ sắt. Sau khi thu, mẫu được bảo quản ở nhiệt độ phòng và phân tích ngay sau đó. Ở mỗi mẫu, một phần được phân tích, đánh giá thành phần lân trong đất và một số chỉ tiêu hóa học như pH, chất hữu cơ, đạm tổng số, kali hữu dụng và phần còn lại dùng cho phân lập vi khuẩn hòa tan lân khó tan.

2.2.2. Tổng hợp lân khó tan dạng chuỗi polymer Al (Al-P)

Nguồn lân khó tan được sử dụng trong thí nghiệm là AlPO_4 (Sigma Aldrich) và phosphate hấp phụ trên chuỗi polymer Al (Al-P). Nghiên cứu có tập trung trên phosphate hấp phụ trên chuỗi polymer Al (Al-P) vì cấu trúc lân bị cố định thực tế trong đất phèn thường ở dạng này. Phosphate hấp phụ trên chuỗi polymer Al được tổng hợp bằng cách cho các oxide và hydroxide Al được tạo thành khi cho muối clorua Al (AlCl_3 0,5 M) tác dụng với dung dịch KOH và điều chỉnh pH bằng 5 (pH trên 3,5 các oxide và hydroxide sẽ bị kết tủa). Lọc lấy phần tủa và rửa với nước để loại bỏ KOH dư còn bám trên bề mặt tủa. Sau đó xác định pH và ẩm độ của tủa. Sản phẩm có được là tủa oxide và hydroxide Al. Để có được sản phẩm chuỗi polymer Al, tủa tạo thành được trải qua quá trình khô ướt luân phiên, bằng cách 1 ngày nhỏ nước đều khắp trên bề mặt tủa (1 lần/ngày), 1 ngày để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng. Cứ như thế lặp lại trong 12 ngày. Sản phẩm của quá trình khô-ướt này

tạo thành chuỗi polymer Al. Chuỗi polymer sẽ được nghiền, sàng qua rây 0,5 mm và được hấp phụ lân bằng KH_2PO_4 0,025M với $\text{pH}_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = 6,5$. Sản phẩm thu được là phosphate hấp phụ trên chuỗi polymer Al (Al-P).

2.2.3. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng hòa tan lân khó tan

Quá trình phân lập vi khuẩn được thực hiện cho cả hai loại lân khó tan AlPO_4 và phosphate hấp phụ trên hydroxide và oxide Al (Al-P) cụ thể các bước như sau:

- Tăng sinh vi khuẩn hòa tan lân: sử dụng môi trường Pikovskaya có bổ sung AlPO_4 hoặc Al-P để làm giàu mật số vi khuẩn. Mẫu đất được trộn đều, cân 10 g đất cho vào dung dịch nước (1: 10), lắc với tốc độ 150 rpm trong một giờ, để lắng 15 phút, hút chuyển 1 ml vào 50 ml môi trường Pikovskaya đã chuẩn bị sẵn. Dung dịch được đặt trong tối, ở nhiệt độ 28°C và lắc liên tục với tốc độ 100 rpm/phút. Sau 7 ngày ủ, khi hàm lượng lân hòa tan (lân vô cơ) trong dung dịch nuôi tăng thì tiến hành cấy chuyển sang môi trường Pikovskaya có bổ sung các dạng lân mới. Số lần cấy chuyển được thực hiện 3 lần cho mỗi tổ hợp vi khuẩn. Thí nghiệm phân lập được tiến hành với 3 nghiệm thức: Nghiệm thức 1: đối chứng (môi trường Pikovskaya + AlPO_4 hoặc Al-P, không có đất). Nghiệm thức 2: đối chứng chết (môi trường Pikovskaya + AlPO_4 hoặc Al-P và đất đã tiệt trùng). Nghiệm thức 3: mẫu (môi trường Pikovskaya + AlPO_4 hoặc Al-P và đất).

- Tách riêng vi khuẩn hòa tan lân: các tổ hợp vi khuẩn có khả năng hòa tan lân khó tan được pha loãng ở nhiều nồng độ khác nhau (từ 10^{-1} đến 10^{-8}). Hút 50 μl dung dịch huyền phù vi sinh vật đã pha loãng và trải đều trên môi trường thạch Pikovskaya có bổ sung AlPO_4 hoặc Al-P. Các đĩa petri được ủ từ 3 đến 5 ngày trong tối, ở nhiệt độ phòng. Tiếp tục phân dạng khuẩn lạc và cấy ria từng dạng khuẩn lạc trên mỗi đĩa petri để tạo khuẩn lạc rời rạc (phân dạng khuẩn lạc dựa vào các đặc điểm hình thái khuẩn lạc: hình dạng, màu sắc, độ nổi và rìa). Sau khi tách được các chủng vi khuẩn thuần, nuôi trong môi trường Pikovskaya có bổ sung AlPO_4 hoặc Al-P và theo dõi sự phát triển mật số và khả năng hòa tan lân của các chủng vi khuẩn để xác định khả năng hòa tan lân. Bảo quản các chủng vi khuẩn thuần cho các thí nghiệm tiếp theo trong glycerol 30% ở nhiệt độ -80°C.

2.2.4. Đánh giá khả năng hòa tan lân của các dòng vi khuẩn phân lập

Các dòng vi khuẩn sau khi phân lập được đánh giá và so sánh khả năng hòa tan lân dựa trên hàm lượng lân vô cơ hòa tan ra trong dung dịch nuôi. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên. Mỗi dòng vi khuẩn phân lập được nuôi trong môi trường Pikovskaya (50 ml) có bổ sung AlPO_4 hoặc Al-P với hai nghiệm thức và ba lần lặp lại: Nghiệm thức 1: đối chứng (môi trường Pikovskaya + AlPO_4 hoặc Al-P, không có vi khuẩn). Nghiệm thức 2: môi trường Pikovskaya + AlPO_4 hoặc Al-P, chủng vi khuẩn. Hàm lượng lân hòa tan của các dòng vi khuẩn trong thí nghiệm được đánh giá dựa trên hàm lượng lân vô cơ hòa tan ra trong dung dịch nuôi. Lân hòa tan được đo trên máy quang phổ ở bước sóng 880 nm [4].

Mật số vi khuẩn ban đầu trong thí nghiệm đạt $\sim 10^7$ CFU/ml và được xác định theo phương pháp đếm trực tiếp trên buồng đếm [5].

2.2.5. Xác định hình thái khuẩn lạc, hình dạng tế bào, gram các chủng vi khuẩn có khả năng hòa tan lân

Hình thái khuẩn lạc sẽ được mô tả dựa vào hình dạng, rìa, độ nổi, bề mặt và màu sắc của khuẩn lạc sau khi chúng phát triển trên môi trường TSA. Hình dạng tế bào vi khuẩn được xem dưới kính hiển vi điện tử ở độ phóng đại 100 X. Vi khuẩn được nhuộm màu bằng Fushin 0,3%. Nhận diện gram vi khuẩn bằng KOH 3% [6].

2.2.6. Định danh loài vi khuẩn có khả năng hòa tan lân

ADN của các vi khuẩn tuyển chọn được ly trích và tiến hành phản ứng PCR vùng gen 16S rRNA bằng cặp mồi chuyên biệt 341F- GC (5'-CGCCCGCCGCGC GCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTA CGGGAGGCAGCAG-3') và 534R (5'-ATTACCGCGG CTGCTGG-3') [7]. Các bước trong phản ứng PCR như sau: bước 1: 93°C trong 5 phút; bước 2: 94°C trong 30 giây; bước 3: 53°C trong 30 giây; bước 4: 72°C trong 2 phút; bước 5: 72°C trong 10 phút và lặp lại các bước trong 29 chu kỳ, bước 6: 4°C trong thời gian không xác định. Sản phẩm PCR được dùng trong điện di biến tính tăng cấp (DGGE) để xác định độ thuần của các dòng vi khuẩn phân lập trước khi tiến hành giải mã trình tự. Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được giải trình tự trực tiếp 2 chiều với bộ mồi dùng trong phản ứng PCR. Từ kết quả giải trình tự, so sánh với ngân hàng gene (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) để xác định loài của các dòng vi khuẩn.

2.2.7. Xử lý số liệu

Số liệu sau khi kết thúc thí nghiệm được tổng hợp, tính toán bằng phần mềm Excel và kiểm định thống kê với ANOVA bằng phần mềm Minitab 16.2.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thành phần hóa học và các thành phần lân trong đất thí nghiệm

Bảng 1. Một số đặc tính hóa học của đất sử dụng trong thí nghiệm

Mẫu đất	pH KCl (1: 2,5)	CEC (meq/100g)	Chất hữu cơ (% C)	N tổng số (%)	P tổng số (% P_2O_5)	P Olsen ($\text{mgP}_2\text{O}_5/\text{kg}$)	Al^{3+} trao đổi (meq/100g)
Hậu Giang	3,15	20,94	4,83	0,12	0,17	23,34	12,05
Đồng Tháp	4,36	18,61	3,39	0,12	0,36	132,14	0,98

Bảng 1 trình bày một số thành phần hóa học của đất thí nghiệm tại Hậu Giang và Đồng Tháp cho thấy hàm lượng chất hữu cơ ở cả hai điểm thí nghiệm đạt mức trung bình. Trong khi hàm lượng đạm và lân tổng số ở mức rất nghèo đến nghèo theo thang đánh

giá của Kyuma (1976) [8]. Hàm lượng nhôm trao đổi ở Hậu Giang đạt mức cao (> 10 meq/100 g), trong khi ở Đồng Tháp thấp hơn rất nhiều (0,98 meq/100 g) (Bảng 1).

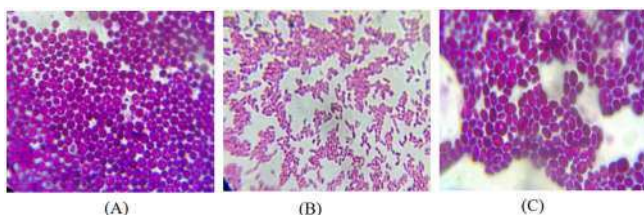
Bảng 2. Thành phần lân trong đất thí nghiệm

Mẫu đất	Hàm lượng P trích nước (mgP/kg)	Hàm lượng Pi_NaHCO_3 (mgP/kg)	Hàm lượng Po_NaHCO_3 (mgP/kg)	Hàm lượng Pi_NaOH (mgP/kg)	Hàm lượng Po_NaOH (mgP/kg)	Hàm lượng P tổng (mgP/kg)
Hậu Giang	0,88	7,24	46,5	20,77	100,88	74,38
Đồng Tháp	1,39	35,67	154,36	41,68	190,39	121,91

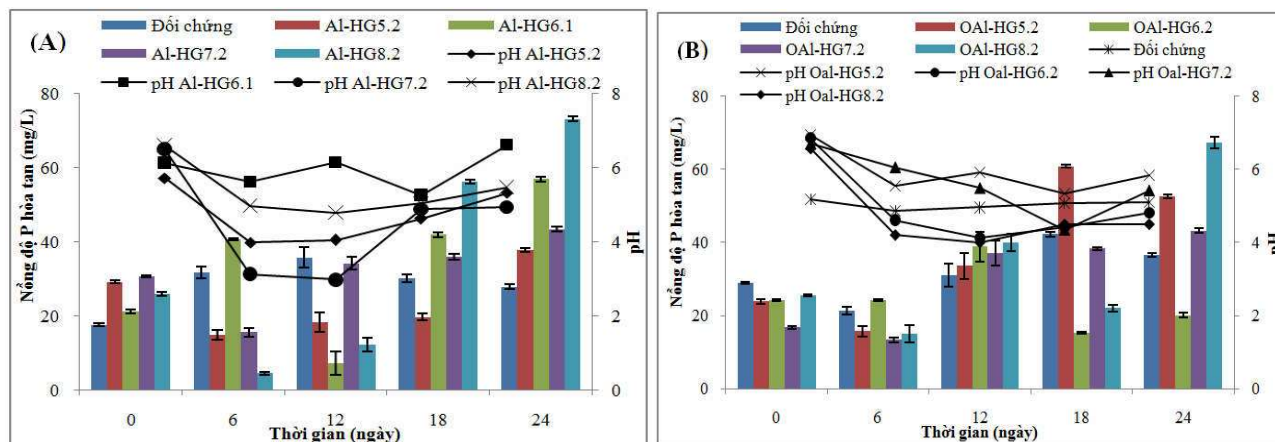
Các thành phần lân trong đất thí nghiệm được phân tích theo phương pháp Hedley và Stewart (1982) [9] được trình bày trong bảng 2. Nhìn chung, hàm lượng lân bị kiểm giữ ở các dạng khác nhau trong đất tương đối cao. Điều này ảnh hưởng đến sự phóng thích lân hữu dụng cho cây trồng.

3.2. Phân lập các dòng vi khuẩn có khả năng hòa tan lân trên đất phèn

Từ 16 mẫu đất phèn trồng lúa và mía được thu thập từ xã Hòa Tiến – Hậu Giang, huyện Tam Nông - Đồng Tháp, sau phân lập và tách ròng đã chọn được 75 dòng vi khuẩn có khả năng hòa tan lân, sinh trưởng và phát triển tốt trong môi trường khoáng tối thiểu Pikovskaya có chứa AlPO_4 hoặc Al-P. Quan sát về hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào cho thấy 30 dòng vi khuẩn được nhóm thành 3 nhóm: Nhóm 1: dạng tế bào hình cầu chiếm đa số gồm có 60 dòng vi khuẩn (Hình 1A); nhóm 2: dạng tế bào hình que gồm có 7 dòng vi khuẩn (Hình 1B); nhóm 3: dạng tế bào hình cầu dẹt gồm có 8 dòng vi khuẩn (Hình 1C).



Hình 1. Hình dạng 3 nhóm tế bào vi khuẩn của các dòng vi khuẩn phân lập (A) hình cầu; (B) hình que; (C) hình cầu dẹt



Hình 2. Nồng độ lân hòa tan (biểu đồ hình cột) và pH (biểu đồ đường) của các dòng vi khuẩn phân lập trên đất Hậu Giang, với nguồn lân từ (A) AlPO_4 ; (B) Al-P (n = 4, sai số chuẩn)

Nhìn chung, pH giảm ngay sau 6 ngày nuôi cấy ở tất cả các nghiệm thức có vi khuẩn (pH = 4,12) so với nghiệm thức đối chứng (pH = 6,31) (Hình 2). Môi trường nuôi cấy với nguồn lân từ AlPO_4 và Al-P có pH

3.3. Đánh giá khả năng hòa tan lân từ các nguồn AlPO_4 /Al-P của các dòng vi khuẩn phân lập

Các dòng vi khuẩn phân lập được bố trí thí nghiệm đánh giá và so sánh khả năng hòa tan lân, sự sinh trưởng và phát triển trong môi trường chuyên biệt Pikovskaya bổ sung nguồn AlPO_4 /Al-P tương ứng khi phân lập trên các nguồn lân này.

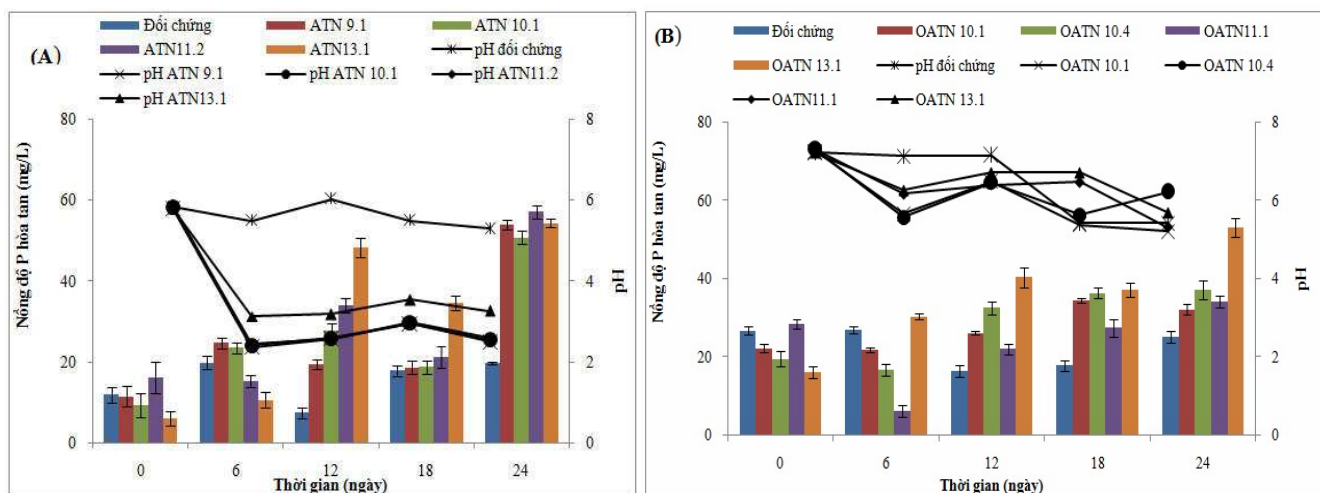
Kết quả thí nghiệm của các dòng vi khuẩn phân lập trên đất Hậu Giang sau 24 ngày được trình bày ở hình 2. Nhìn chung, hàm lượng lân hòa tan trong môi trường nuôi cấy tăng dần và khác nhau ở các dòng vi khuẩn, thể hiện khả năng hòa tan lân của tất cả các dòng vi khuẩn thí nghiệm so với đối chứng. Trên môi trường lân AlPO_4 , dòng Al-HG6.1 và Al-HG8.2 thể hiện khả năng hòa tan lân tốt nhất với hàm lượng lân hòa tan đạt $57,03 \pm 0,68$ mg/L và $73,25 \pm 0,57$ mg/L sau 24 ngày nuôi cấy, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% (Hình 2A). Trên môi trường lân Al-P, dòng OAl-HG5.2 và OAl-HG8.2 hàm lượng lân hòa tan ở các nghiệm thức có vi khuẩn đều cao hơn so với đối chứng. Điều này có thể giải thích rằng sau 24 ngày nuôi cấy, có lớp váng màu vàng xuất hiện có thể do phát triển của vi khuẩn tạo thành màng sinh học và giữ một lượng lân hòa tan trong môi trường nuôi cấy. Do đó, hàm lượng lân hòa tan được phân tích ít hơn so với lượng thực tế. Kết quả này phù hợp với kết quả gia tăng mật số vi khuẩn trong các nghiệm thức trên. Mật số của vi khuẩn gia tăng trong tất cả các nghiệm thức bình quân tăng từ 7,45 đến 8,89 log CFU/ml sau 24 ngày nuôi cấy.

Theo nghiên cứu của Goldstein (1994) [14], việc phóng thích các axit hữu cơ cùng với việc giảm pH làm cho môi trường xung quanh và bên trong tế bào vi khuẩn chuyển sang môi trường axit, vì vậy lân được phóng thích ra ngoài bởi việc thay thế Ca^{2+} bằng H^+ (đối với lân bị giữ bởi Ca). Tuy nhiên cũng có nghiên cứu cho rằng không có mối tương quan giữa pH và sự phóng thích lân [15]. Do đó, Illmer và Schinner (1995) [16] giả thuyết rằng việc phóng thích H^+ tác động đến sự đồng hóa các cation, từ đó giúp hòa tan lân. Theo nghiên cứu của Zhao và cs (2014) [13], hàm lượng lân hòa tan gia tăng khi pH giảm còn 3,12 (đạt 452 $\mu\text{g/mL}$ P) trong khi pH = 4,95 chỉ đạt hàm lượng 154 $\mu\text{g/mL}$ P khi nghiên cứu dòng vi khuẩn *Burkholderiacepacia* SCAUK0330.

Tương tự, kết quả lân hòa tan do các dòng vi khuẩn phân lập trên đất Đồng Tháp được trình bày ở hình 3. Nhìn chung, hàm lượng lân hòa tan trong các

thí nghiệm tăng dần qua các ngày nuôi cấy và cao hơn so với thí nghiệm đối chứng. Trên môi trường nuôi cấy với nguồn lân từ AlPO_4 , sau 24 ngày, hàm lượng lân hòa tan tăng, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với đối chứng, đạt cao nhất ở dòng vi khuẩn ATN 11.2 (57,15 mgP/L) (Hình 3A). Trong khi đó, môi trường nuôi cấy với các nguồn lân còn lại (Al-P), hàm lượng lân hòa tan qua các ngày nuôi cấy tăng ở mức thấp hơn, đạt cao nhất ở dòng vi khuẩn OATN 13.1 (53,12 mgP/L) (Hình 3B).

Nhìn chung, pH của các thí nghiệm cũng giảm rõ rệt sau 6 ngày nuôi cấy. Thí nghiệm đối chứng có pH ổn định hơn so với các thí nghiệm có vi khuẩn đối với môi trường nuôi cấy với nguồn lân từ AlPO_4 (Hình 3A). Trong khi đó, các thí nghiệm thí nghiệm với nguồn lân hấp phụ trên Al biến động không khác biệt với thí nghiệm đối chứng (Hình 3B).



Hình 3. Nồng độ lân hòa tan (biểu đồ hình cột) và pH (biểu đồ đường) của các dòng vi khuẩn phân lập trên đất Đồng Tháp, với nguồn lân từ (A) AlPO_4 ; (B) Al-P ($n = 4$, sai số chuẩn)

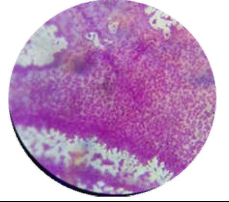
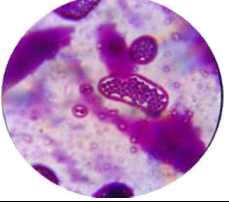
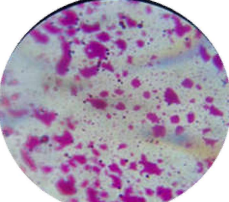
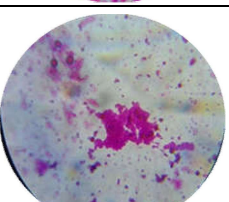
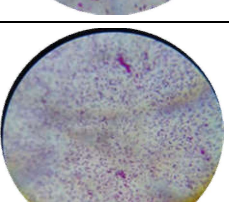
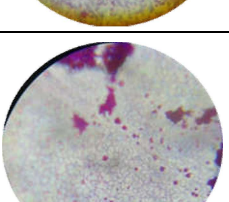
3.4. Xác định loài các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Sáu dòng vi khuẩn được chọn lọc trong thí nghiệm định lượng được giải mã trình tự đoạn gen 16S rRNA và định danh trên cơ sở so sánh dữ liệu ngân hàng gene. Kết quả cho thấy các dòng này tương đồng với đoạn gen 16S rRNA của loài *Serratia marcescens* và *Burkholderia vietnamensis* với độ tương đồng đến 99% (Bảng 3). Trong đó, loài *Serratia marcescens* chiếm ưu thế với 4 dòng được phân lập trên đất lúa và 1 dòng trên đất trồng mía. Loài *Serratia marcescens* được phân lập có khả năng hòa tan lân tốt trên cả 2 nguồn lân từ AlPO_4 và Al-P. Trong khi đó, loài *Burkholderia vietnamensis* chỉ được tìm thấy trên đất trồng cạn có khả năng hòa tan

AlPO_4 (Bảng 3).

Nhiều nghiên cứu phân lập các dòng vi khuẩn hòa tan lân cho thấy kết quả rất đa dạng, bao gồm nhiều loài vi khuẩn như *Serratia* sp. [17], [18]; *Burkholderia* sp. [19], [13] và *Pseudomonas* sp. [20]. Ngoài khả năng hòa tan lân, một số dòng vi khuẩn hòa tan lân được phát hiện có khả năng hòa tan đạm, tổng hợp phytohormones và kích thích sự hấp thu một số nguyên tố khác như kẽm, magie. Nghiên cứu của Lý Ngọc Thanh Xuân và cs (2017) cho thấy dòng vi khuẩn nội cộng sinh có khả năng hòa tan đạm, lân (*Burkholderia cenocepacia*) phân lập được từ rễ của cây sắn giúp gia tăng năng suất củ, chiều dài củ so với đối chứng.

Bảng 3. Kết quả định danh một số dòng vi khuẩn tuyển chọn

STT	Dòng	Nguồn gốc	Độ tương đồng (%)	Thông tin trên cơ sở đăng kí		Mô tả hình dạng khuẩn lạc	Gram	Hình dạng vi khuẩn dưới kính hiển vi (100X)
				Vi khuẩn	Số đăng kí			
1	HG5.1	Đất lúa	99%	<i>Serratia marcescens</i>	CP003959.1	Tròn, rìa đều, bề mặt nhẵn, màu trắng đục	(+)	
2	HG7.1	Đất trồng dưa	99%	<i>Burkholderia vietnamensis</i>	KY810662.1	Tròn, rìa đều, bề mặt nhẵn, màu trắng đục	(+)	
3	HG8.2	Đất trồng dưa	99% (complete genome)	<i>Serratia marcescens</i>	CP012639.1	Tròn, rìa đều, bề mặt bóng trơn, màu trắng đục hơi vàng	(-)	
4	HG5.2	Đất lúa	99%	<i>Serratia marcescens</i>	MK014280.1	Tròn, rìa đều, bề mặt nhẵn, màu trắng đục	(+)	
5	OATN 10.4	Đất lúa	99%	<i>Serratia marcescens</i>	CP029746.1	Tròn, rìa đều, bề mặt bóng trơn, màu trắng đục	(-)	
6	ATN 10.3	Đất lúa	99%	<i>Serratia marcescens</i>	GQ981178.1	Tròn dẹt, mép tạo răng cưa, bề mặt nhẵn, màu trắng đục	(+)	

4. KẾT LUẬN

Từ các mẫu đất ở một số ruộng lúa và cây trồng cạn (mía, dưa) ở hai vùng đất phèn thuộc tỉnh Hậu Giang và Đồng Tháp, đã phân lập được 75 dòng vi khuẩn có khả năng hòa tan lân. Trong đó, 6 dòng vi khuẩn thể hiện khả năng hòa tan lân và sinh trưởng tốt trong môi trường nuôi cấy có các nguồn lân khác nhau gồm $AlPO_4$ và Al-P, với nồng độ lân hòa tan

trong môi trường nuôi cấy biến động từ $9,72 \pm 0,59$ mg/L P đến $73,25 \pm 0,57$ mg/L P. Các dòng này được định danh thuộc 2 loài chính: *Serratia marcescens* và *Burkholderia vietnamensis* với độ tương đồng đến 99%. Đây là các dòng vi khuẩn cho hiệu quả cao trong việc hòa tan lân khó tan, có tiềm năng tạo chế phẩm vi sinh ứng dụng trong nâng cao sinh trưởng và năng suất cây trồng trên vùng đất phèn.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 với khoản vay ODA-A7 232 từ Chính phủ Nhật Bản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hồ Quang Đức, Nguyễn Văn Đạo, Trương Xuân Cường và Lê Thị Mỹ Hảo (2013). Đánh giá sự biến động của đất mặn và đất phèn vùng ĐBSCL. <http://iasvn.org/tin-tuc/Danh-gia-su-bien-dong-dat-man-va-dat-phen-vung-DBSCL-sau-30-nam-su-dung-4390.html>
2. Lý Ngọc Thanh Xuân, Trần Văn Dũng, Ngô Ngọc Hưng, Phạm Duy Tiến, Nguyễn Thị Xuân Đào, Nguyễn Thị Bảo Trân (2017). Khả năng hòa tan lân của vi khuẩn vùng rễ lúa trên đất phèn tỉnh An Giang. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 13: 26-30.
3. Pikovskaya, R. I. (1948). *Mobilization of Phosphorus in Soil Connection with the Vital Activity of Some Microbial Species*. Microbiology 17, 362-370.
4. Murphy, J. and Reily, J. P. (1962). A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 26: 31-36.
5. Hoben, H. J., and Somasegaran, P. (1982). *Comparison of the Pour, Spread, and Drop Plate Methods for Enumeration of Rhizobium spp. in Inoculants Made from Presterilized Peat*. Applied and environmental microbiology 44(5): 1246-1247.
6. Suslow, T. V. (1982). *Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining*. Phytopathology 72: 917-918.
7. Muyzer, G. Ellen, D. W., and Andre, G. U. (1993). Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microb. 3: 695-700.
8. Kyuma, K. (1976). *Paddy soils in the Mekong Delta of Vietnam. Discussion Paper 85*. Center for Southeast Asian Studies, Kyoto University, Kyoto. p.77.
9. Hedley, M. and Stewart, J. (1982). Method to measure microbial phosphate in soils. *Soil Biol. Biochem.* 14: 377-385.
10. Goldstein, A. H. (2000). Bioprocessing of rock phosphate ore: essential technical considerations for the development of a successful commercial technology, in Proceedings of the 4th International Fertilizer Association Technical Conference, (Paris: IFA), 220.
11. Seshachala, U., and Tallapragada, P. (2012). Phosphate solubilizers from the rhizosphere of *Piper nigrum* L. in Karnataka, India. *Chil. J. Agric. Res.* 72: 397-403.
12. Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., and Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. Springer 2: 587-600.
13. Zhao, K., Penttinen, P., Zhang, X., Ao, X., Liu, M., Yu, X., et al. (2014). Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. Microbiol. Res. 169: 76-82.
14. Goldstein, A. H. (1994). Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria, in Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology, eds A. Torriani-Gorini, E. Yagil, and S. Silver (Washington, DC: ASM Press), 197-203.
15. Asea, P. E. A., Kucey, R. M. N., and Stewart, J. W. B. (1988). Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biol. Biochem* 20: 459-464.
16. Illmer, P., and Schinner, F. (1995). Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 27, 257-263.
17. David, P., Raj, R. S., Linda, R., and Rhema, S. B. (2014). Molecular characterization of phosphate solubilizing bacteria (PSB) and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) from pristine soils. *Int. J. Innov. Sci. Eng. Technol.* 1: 317-324.
18. Swarnalakshmi, K., Prasanna, R., Kumar, A., Pattnaik, S., Chakravarty, K., Shivay, Y. S., et al. (2013). Evaluating the influence of novel cyanobacterial biofilmed biofertilizers on soil fertility and plant nutrition in wheat. *Euro. J. Soil Biol.* 55: 107-116.

19. Istina, I. N., Widiastuti, H., Joy, B., and Antralina, M. (2015). Phosphatesolubilizing microbe from Sapristis peat soil and their potency to enhance oil palm growth and P uptake. *Proc. Food Sci.* 3, 426-435.
20. Babalola, O. O., and Glick, B. R. (2012). The use of microbial inoculants in African agriculture: current practice and future prospects. *J. Food Agric. Environ.* 10: 540–549.

PHOSPHORUS SOLUBILIZING BACTERIA IN ACID SULFATE SOILS IN THE MEKONG DELTA

Chau Thi Anh Thy, Nguyen Hoang Kim Nuong, Nguyen Thi Kieu Anh, Duong Minh Vien

Summary

In acid sulfate soils, poor availability of soluble P is a common problem because most of the soil P remains as a fraction of Fe or Al-P. Phosphate-solubilizing bacteria are frequently used in agriculture as plant growth promoters because they provide soluble P to growing plants by solubilizing complex soil inorganic phosphates like Al-P. This issue will help to reduce the overuse of inorganic fertilizer as well as to optimize the phosphate releasing from soil. In this present study, 75 bacterial strains were isolated in acid sulfate soils at Hau Giang and Dong Thap with three different groups including coccus, rod and vibrio shape. Out of 75 isolates, 32 isolates were selected to evaluate the ability to release phosphate in the medium. As the results, concentration of soluble phosphate reached maximum concentration at 73.25 ± 0.57 mg/L P while the minimum phosphate concentration released at only 9.72 ± 0.59 mg/L P. All the examined isolates showed the ability to release phosphate with significantly different compared to control treatment without bacteria ($P \leq 0.05$). The sequence analysis based on 16s rRNA of ten remarkable isolates resulted in four different species with similarity of 99% including *Serratia marcescens* and *Burkholderia vietnamensis*.

Keywords: *Acid sulfate soil, aluminum phosphate, Burkholderia vietnamensis, phosphate solubilizing bacteria, Serratia marcescens.*

Người phản biện: PGS.TS. Lê Như Kiều

Ngày nhận bài: 20/4/2022

Ngày thông qua phản biện: 13/5/2022

Ngày duyệt đăng: 30/6/2022