

PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH CÁC CHỦNG VI KHUẨN HÒA TAN PHỐT PHÁT VÀ KHÁNG KIM LOẠI NẶNG TỪ ĐẤT TRỒNG LÚA Ở TỈNH NAM ĐỊNH

Đỗ Quang Trung^{1*}, Lưu Thế Anh¹, Nguyễn Trọng Trí²,
Đào Minh Trường¹, Ngô Ngọc Dung¹, Đinh Mai Văn²

TÓM TẮT

Ô nhiễm kim loại nặng trong đất nông nghiệp đang là vấn đề cản trở sự phát triển của nền nông nghiệp bền vững. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm phân lập các chủng vi khuẩn trong đất trồng lúa ở tỉnh Nam Định có khả năng hòa tan phốt phát và kháng kim loại nặng. Kết quả cho thấy hầu hết các chủng phân lập được đều có thể kháng các kim loại nặng ở nồng độ thấp. Tuy nhiên, khả năng chịu đựng sau đó đã giảm đáng kể khi nồng độ kim loại nặng tăng lên. Trong số 11 chủng phân lập được, có 7 chủng dễ bị tổn thương với các kim loại nặng Cd và Pb ở nồng độ 400 mg/L và ba chủng có khả năng chịu đựng tốt hơn. Đặc biệt là chủng ND03 (*Burkholderia gladioli*) cho thấy khả năng chịu đựng cao nhất đối với Cd, Pb, Cu và Zn ở các dải nồng độ nghiên cứu. Tuy nhiên, khả năng hòa tan phốt phát của chủng ND03 cũng bị suy giảm rất nhiều khi có mặt các kim loại nặng Cd và Pb. Nhìn chung, ảnh hưởng của các kim loại nặng đến khả năng hòa tan phốt phát của các chủng vi khuẩn được tìm thấy giảm dần theo thứ tự sau: Pb > Cd > Cu > Zn. Các kết quả trong nghiên cứu này cho thấy chủng ND03 có tiềm năng ứng dụng trong cải tạo đất, làm tăng khả năng hòa tan phốt phát khoáng trong đất trồng nhiễm kim loại nặng.

Từ khóa: Đất trồng lúa, vi khuẩn, hòa tan phốt phát, kháng kim loại, 16S rDNA.

1. GIỚI THIỆU

Ô nhiễm kim loại nặng đang trở thành vấn đề được các nhà môi trường quan tâm do những tác động tiêu cực của chúng mang lại cho môi trường và sức khỏe của con người [2, 15]. Tuy nhiên, có một số vi sinh vật bao gồm vi khuẩn thúc đẩy tăng trưởng thực vật (PGPB) thực hiện nhiều loại cơ chế chống chịu khác nhau đối với sự tăng cao của nồng độ kim loại nặng [5, 13]. Các vi sinh vật này có thể tránh được độc tính do các kim loại nặng khác nhau tạo ra thông qua các cơ chế khác nhau như đào thải các kim loại ra bên ngoài bề mặt tế bào vi sinh vật, tích tụ sinh học các ion kim loại bên trong tế bào, chuyển hóa sinh học các kim loại độc thành dạng ít độc hơn và hấp phụ kim loại trên thành tế bào [1]. Trong các PGPB, các vi sinh vật hòa tan phốt phát (PSM) có thể huy động phốt phát vô cơ không hòa tan vào dung dịch đất, làm cho chúng dễ dàng được cây hấp thụ [3, 8, 13, 15]. Do đó, tiềm năng ứng dụng của PSM để tăng hiệu quả sử dụng P trong đất đã thu hút sự quan tâm của cộng đồng khoa học. Trong số các lĩnh vực khác nhau của PSM, vi khuẩn thuộc các chi *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Pantoea*,

Enterobacter, *Erwinia*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella* và *Micrococcus* đã được báo cáo là tác nhân hòa tan phốt phát hiệu quả [3, 9, 11, 13]. Mặc dù nhiều vi khuẩn trong đất có khả năng chống chịu với kim loại nặng, nhưng theo báo cáo các chủng vi khuẩn được phân lập từ môi trường ô nhiễm kim loại nặng được chứng minh là có khả năng chịu được nồng độ kim loại cao hơn so với các chủng được phân lập từ các khu vực không bị ô nhiễm [10, 17]. Do đó, các chủng vi khuẩn phân giải lân có tiềm năng di truyền để tăng khả năng chống chịu với hàm lượng cao của kim loại nặng được cải thiện hoạt tính để kích thích sự phát triển của cây trồng trên đất ô nhiễm kim loại nặng bằng cách giảm độc tính của kim loại [16, 17]. Nghiên cứu này được thực hiện để phân lập các chủng vi khuẩn hòa tan phốt phát từ đất trồng lúa ở Nam Định và đánh giá tính kháng kim loại nặng của chúng nhằm định hướng ứng dụng tạo phân sinh học sử dụng cho tỉnh Nam Định.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phân lập các chủng vi khuẩn hòa tan phốt phát

15 mẫu đất phù sa (tầng mặt: 0-30 cm) trồng lúa nước được thu thập từ các vị trí khác nhau ở huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định vào ngày 2/11/2020 để

¹ Viện Tài nguyên và Môi trường, Đại học Quốc gia Hà Nội

² Trường Đại học Lâm nghiệp

Email: trungcnsinh@gmail.com

phân lập các chủng vi khuẩn phân giải lân. Quy trình lấy mẫu được thực hiện theo TCVN 4046-1985 [8], cụ thể như sau: mẫu đất được lấy theo quy tắc đường chéo hoặc zigzag tùy địa hình vùng đất, không lấy đất ở các vị trí có phân gia súc, phân vô cơ hay chỗ có tàn dư thực vật... Mỗi địa điểm lấy từ 15-20 mẫu, mỗi mẫu khoảng 0,5 kg và các mẫu được trộn đều lấy đại diện theo quy tắc đường chéo khoảng 0,5 kg.

Các mẫu đất được pha loãng và cấy trên môi trường NBRIP (National Botanical Research Institute Phosphate) có chứa 10 g glucose, 5 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KCl, 0,1g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và 16 g thạch trong 1 L nước cất [7]. Độ pH của môi trường được điều chỉnh đến 7. Các đĩa petri có cấy vi khuẩn được ủ trong 7 ngày ở 30°C. Các khuẩn lạc có vòng sáng rõ ràng xung quanh khuẩn lạc được coi là khuẩn lạc hòa tan photphat. Các khuẩn lạc được tinh sạch thêm bằng cách cấy chuyển trên đĩa thạch NBRIP mới ở 30°C đến khi hình thái tế bào đồng nhất.

Chỉ số hòa tan photphat (SI) được tính theo công: $\text{SI} = (\text{đường kính khuẩn lạc} + \text{đường kính vùng quang}) / \text{đường kính khuẩn lạc}$ [9].

2.2. Thử nghiệm khả năng hòa tan photphat vô cơ

Các chủng vi khuẩn phân lập được nuôi trong môi trường NBRIP lỏng tiết trùng (20 ml) ở 30°C trong 2 ngày với lắc liên tục ở tốc độ 150 vòng/phút. Phần dịch nuôi cấy (1 ml) sau đó được chuyển vào bình 500 ml ($n = 3$ cho mỗi chủng) có chứa môi trường lỏng đã khử trùng (250 ml) và được ủ, lắc liên tục ở 30°C. Môi trường đã tiết trùng không cấy vi khuẩn được dùng làm đối chứng. Một mẫu (10 ml) của mỗi chủng nuôi cấy và đối chứng được lấy sau 3 ngày nuôi cấy và ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 15 phút. Phần dịch phía trên được sử dụng để xác định độ pH và lượng photpho (P) được giải phóng vào môi trường. pH của môi trường nuôi cấy cũng được ghi lại bằng máy đo pH được trang bị điện cực thủy tinh. Lượng P hòa tan trong dung dịch được xác định bằng phương pháp màu xanh lam phospho-molybdate [6].

2.3. Kiểm tra tính kháng kim loại nặng của các chủng vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn phân lập được đánh giá tính nhạy cảm hoặc khả năng kháng kim loại nặng bằng phương pháp đĩa thạch. Các đĩa môi trường muối tối

thiếu mới chuẩn bị được thay thế bằng bốn kim loại nặng khác nhau (Cd, Pd, Cu và Zn) ở các nồng độ khác nhau (100-400 mg/l). Các đĩa này được cấy các chủng vi khuẩn đã phân lập được và khả năng chống chịu kim loại nặng được xác định bằng sự xuất hiện của các khuẩn lạc vi khuẩn sau 5 ngày ủ ở 30°C. Các thí nghiệm được thực hiện ba lần lặp lại.

2.4. Kiểm tra khả năng tăng trưởng và khả năng hòa tan photphat với sự có mặt của kim loại nặng

Dòng vi khuẩn có khả năng phân giải lân cao nhất và có khả năng kháng kim loại nặng được chọn cho các thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của các nồng độ kim loại nặng khác nhau đến sự phát triển và khả năng phân giải lân của các chủng này.

Anh hưởng của kim loại nặng đến sự phát triển của vi khuẩn được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 660 nm bằng máy đo quang phổ (Shimadzu UV-VIS, Đức). Môi trường lỏng NBRIP bổ sung kim loại nặng ở các nồng độ 100, 200 và 400 mg/L được thêm vào huyền phù vi khuẩn (10^6 CFU/ml) và ủ lắc liên tục ở 30°C. Các mẫu canh trường vi khuẩn từ các công thức này được pha loãng 1: 1 (v/v) bằng dung dịch HCl 1N để hòa tan lượng photphat không hòa tan còn lại và độ hấp thụ được ghi lại ở bước sóng 660 nm để đo sự phát triển của chủng vi khuẩn (Rodriguez *et al.*, 2000). Môi trường nuôi cấy vi khuẩn được cấy vào môi trường không chứa kim loại nặng được coi là đối chứng.

Chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường NBRIP lỏng tiết trùng (20 ml) ở 30°C trong 2 ngày với lắc liên tục ở 150 vòng/phút. Phần dịch nuôi cấy (10^6 CFU/ml) sau đó được chuyển vào bình 500 ml ($n = 3$ cho mỗi chủng) có chứa môi trường NBRIP lỏng đã khử trùng (250 ml) có bổ sung kim loại nặng (Cd, Pb, Cu và Zn) ở nồng độ 100, 200 và 400 mg/L. Các bình được nuôi lắc liên tục ở 30°C. Mẫu môi trường nuôi cấy (10 ml) từ mỗi bình nuôi cấy được lấy ra sau 3 ngày và ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 15 phút. Phần dịch nổi phía trên được sử dụng để xác định lượng P được giải phóng vào môi trường. pH của môi trường nuôi cấy cũng được ghi lại bằng máy đo pH được trang bị điện cực thủy tinh. Lượng P hòa tan được xác định bằng phương pháp màu xanh lam phospho-molybdate [6].

2.5. Định danh chủng vi khuẩn đã chọn

Chủng vi khuẩn có mức độ kháng kim loại cao nhất đã được chọn và giải trình tự 16S rRNA với sự

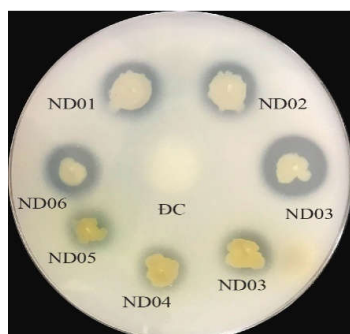
trợ giúp của dịch vụ giải trình tự DNA (Fist Base, Malaysia) bằng cách sử dụng mỗi đa hình, 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Chương trình trực tuyến BLAST đã được sử dụng để xác định các trình tự liên quan với thông tin phân loại đã biết sẵn có trong cơ sở dữ liệu của NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Cây phát sinh loài được xây dựng bằng cách sử dụng chương trình CLUSTAL X trên cơ sở sắp xếp trình tự theo phương pháp liên kết gần và phân tích tối đa bằng chương trình MEGAX. Các chuỗi tham chiếu được lấy từ GenBank theo các mã định danh được chỉ ra trong cây di truyền (Hình 2).

2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm được đánh giá bằng các phương pháp thống kê phân tích biến lượng (Analysis of Variance, ANOVA), so sánh trung bình theo phương pháp trắc nghiệm Duncan. Các số liệu ghi nhận được xử lý bằng Excel và phần mềm Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) phiên bản 19.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập các chủng vi khuẩn hòa tan photphat



Hình 1. Khả năng hòa tan photphat của các chủng vi khuẩn hòa tan photphat sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường NBRIP

ĐC: chủng không có khả năng hòa tan photphat; ND01 đến ND06: chủng vi khuẩn hòa tan photphat số 01 đến 06.

Các mẫu đất được pha loãng và trang trên môi trường NBRIP để phân lập các chủng vi khuẩn hòa tan photphat. Tổng số thu được 11 chủng vi khuẩn (ND1 đến ND11) có các vòng phân giải rõ ràng trên đĩa thạch NBRIP được chọn là các chủng vi khuẩn hòa tan photphat (PSB). Khả năng hòa tan photphat

không hòa tan sau 3 ngày ủ của các chủng vi khuẩn phân lập được trình bày trong bảng 1 và được minh họa trong hình 1. Chủng ND03 cho thấy vòng hòa tan photphat tối đa xung quanh khuẩn lạc. Chỉ số hòa tan của chủng ND03 được tính toán vào cuối thời kỳ ủ và là 3,47.

Bảng 1. Đặc điểm của các chủng vi khuẩn hòa tan photphat sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường NBRIP

Chủng vi khuẩn hòa tan photphat	Chỉ số hòa tan photphat	Lượng P hòa tan (mg L ⁻¹)	pH
ND01	2,52 ± 0,21 ^{bc}	312,84 ± 1,34 ^{bc}	4,46 ± 0,22 ^{ab}
ND02	2,72 ± 0,22 ^b	367,09 ± 1,03 ^{ab}	4,43 ± 0,13 ^{ab}
ND03	3,47 ± 0,12 ^a	573,97 ± 1,12 ^a	4,16 ± 0,12 ^b
ND04	2,02 ± 0,21 ^c	345,30 ± 1,09 ^b	4,51 ± 0,15 ^{aa}
ND05	1,72 ± 0,31 ^d	239,20 ± 1,23 ^c	4,37 ± 0,21 ^{ab}
ND06	2,51 ± 0,02 ^{bc}	332,65 ± 1,11 ^c	4,47 ± 0,13 ^{ab}
ND07	2,07 ± 0,01 ^c	347,54 ± 1,21 ^b	4,36 ± 0,11 ^{ab}
ND08	2,02 ± 0,21 ^c	345,23 ± 1,13 ^b	3,98 ± 0,15 ^b
ND09	2,75 ± 0,31 ^b	237,41 ± 1,11 ^c	4,38 ± 0,11 ^{ab}
ND10	2,31 ± 0,21 ^{bc}	352,35 ± 1,13 ^b	4,44 ± 0,13 ^{ab}
ND11	2,83 ± 0,31 ^{ab}	346,24 ± 1,01 ^c	4,25 ± 0,12 ^{ab}

Ghi chú: ^a Giá trị được đưa ra ở đây là giá trị trung bình ($n = 3$) ± độ lệch chuẩn. Các giá trị có cùng ký tự trong cùng một cột là không khác nhau theo phép thử Duncan ($p < 0,05$).

3.2. Thử nghiệm khả năng hòa tan photphat vô cơ

Kết quả thí nghiệm hòa tan photphat của các chủng PSB phân lập được trong môi trường NBRIP lỏng cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn được phân lập đã hòa tan photphat vô cơ một cách hiệu quả trong môi trường chứa tri canxi photphat (Bảng 1).

Màu đục ban đầu của môi trường NBRIP được chuyển sang trong trong vòng 3 ngày do sự hòa tan của photphat vô cơ bởi các chủng vi khuẩn được thêm vào. Kết quả cho thấy các chủng phân lập có các khả năng khác nhau để giải phóng photpho hòa tan từ photphat vô cơ. Trong số 11 chủng phân lập, ND03 giải phóng hàm lượng photpho hòa tan cao nhất (573 mg/L) vào môi trường, tiếp theo là ND02

và ND07 với lần lượt là 367 và 347 mg/L photpho hòa tan.

Tất cả các chủng phân lập đều làm giảm pH của môi trường nuôi cấy. Độ pH ban đầu của môi trường NBRIP là 7,0 và độ pH sau khi kết thúc thí nghiệm giảm xuống từ 3,98-4,51. Mối quan hệ nghịch đảo giữa pH và nồng độ photpho hòa tan được quan sát thấy ở tất cả các chủng vi khuẩn được phân lập. Điều này cho thấy độ pH thấp của môi trường do các axit hữu cơ phân tử thấp sinh ra bởi vi khuẩn có thể tạo

điều kiện cho quá trình hòa tan photphat vô cơ [2, 13, 15].

3.3. Kiểm tra tính kháng kim loại nặng của các chủng vi khuẩn

Các chủng phân lập được thử nghiệm khả năng chống chịu với bốn kim loại nặng (Cd, Pb, Zn và Cu) ở các nồng độ 100, 200 và 400 mg/L. Kết quả được trình bày trong bảng 2.

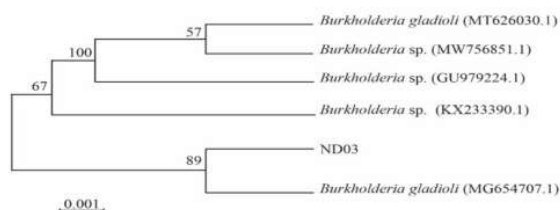
Bảng 2. Khả năng kháng kim loại ở các nồng độ khác nhau của các chủng vi khuẩn hòa tan photphat phân lập được

Chủng vi khuẩn hòa tan photphat	Nồng độ kim loại nặng (mg/L)											
	Cd			Pb			Zn			Cu		
	100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400
ND01	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
ND02	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
ND03	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ND04	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
ND05	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
ND06	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
ND07	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
ND08	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
ND09	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
ND10	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
ND11	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Ghi chú: (+): kháng kim loại; (-): mẫn cảm với kim loại.

Các vi sinh vật trong đất có khả năng kháng kim loại nặng cao hơn được coi là sự lựa chọn tốt nhất cho các nghiên cứu ứng dụng cải tạo đất nhiễm kim loại cho trồng trọt. Kết quả nghiên cứu cho thấy hầu hết các chủng phân lập được thử nghiệm đã được chứng minh là có khả năng chống chịu với kim loại nặng ở nồng độ thấp. Tuy nhiên, khả năng chịu đựng sau đó đã giảm đáng kể khi nồng độ kim loại nặng tăng lên. Trong số 4 kim loại nặng khác nhau được thử nghiệm, hầu hết các mẫu vi khuẩn phân lập có thể phát triển ở nồng độ 100 ppm. Ngoại trừ 3 chủng phân lập (ND02, ND03 và ND07 đối với Cd và ND03, ND08 và ND11 đối với Pb), tất cả các chủng phân lập khác đều được chứng minh là dễ bị tổn thương bởi các kim loại nặng, Cd và Pb, ở nồng độ 400 ppm (Bảng 2). Do đó, Cd và Pb được coi là những kim loại nặng độc nhất đối với các vi sinh vật hòa tan photphat được phân lập. Trong số 11 chủng phân lập được thử nghiệm, ND03 cho thấy khả năng chịu đựng cao nhất và chủng này có khả năng chống chịu

với 100 mg/L, 200 mg/L và 400 mg/L đối với Cd, Pb, Cu và Zn. Thêm vào đó, trình tự đoạn 16S rDNA của chủng ND04 được so sánh độ tương đồng di truyền với các loài trên ngân hàng gen NCBI bằng công cụ BLAST cho thấy ND03 được xác định là *Burkholderia gladioli* (số định danh trên NCBI là MG654707.1) (Hình 2).



Hình 2. Cây phát sinh loài dựa trên trình tự gen 16S rDNA, cho thấy vị trí của chủng vi khuẩn phân lập ND03 đối với các loài có liên quan

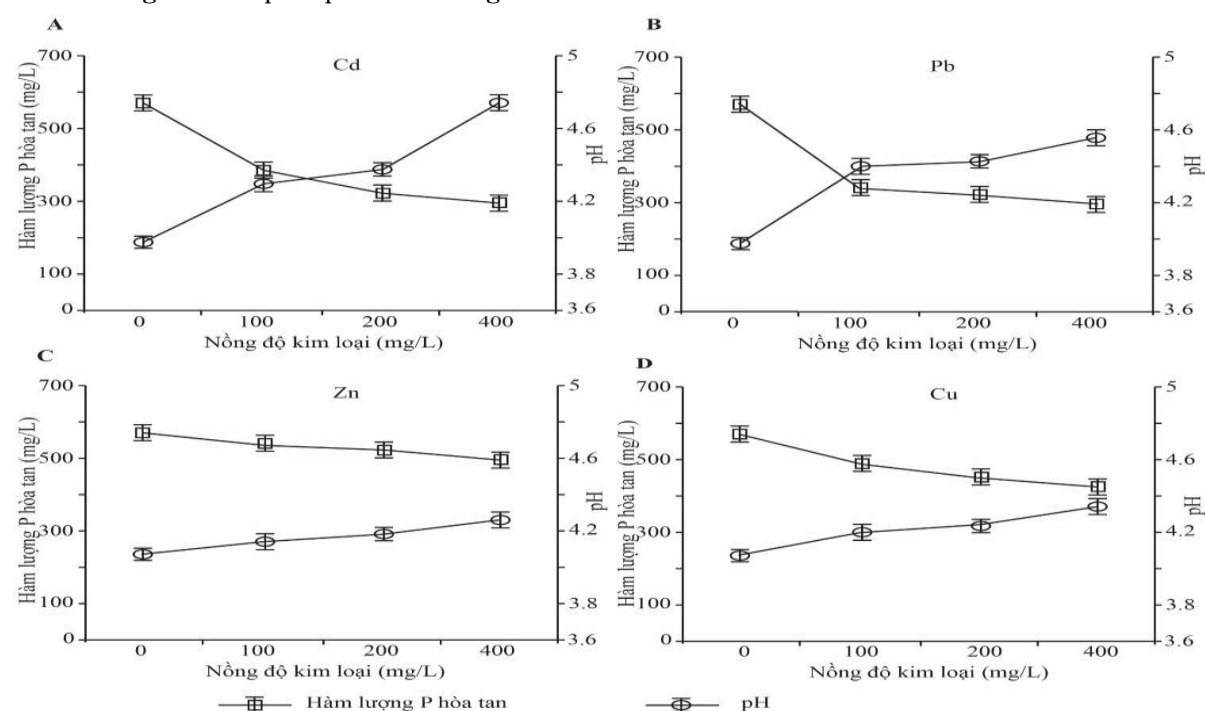
Ghi chú: Thanh tỷ lệ cho biết 0,001 lần thay thế trên mỗi vị trí nucleotide và số định danh được để trong ngoặc đơn.

Tian và cộng sự (2014) [14] đã công bố chủng vi khuẩn hòa tan photphat, *B. gladioli*, được phân lập từ đất mỏ kẽm-chì cho thấy khả năng kháng lên đến 2000 mg/L Zn^{2+} và 1000 mg/L đối với Cr và Pb. Trong một nghiên cứu khác cho thấy chủng *B. gladioli* được phân lập từ đất lúa có khả năng hòa tan photphat và giúp kích thích tăng trưởng của cây cà chua (*Lycopersicon esculentum*) trồng trên đất nhiễm Cd (0,4 mM) [4]. Các nghiên cứu này cho thấy tiềm năng sử dụng của chủng ND03 trong việc nghiên cứu tạo chế phẩm phân sinh học cho đất trồng bị nhiễm kim loại nặng.

3.4. Kiểm tra khả năng hòa tan photphat trong điều kiện ức chế do kim loại nặng

Các nghiên cứu trước đây cho thấy các chủng PSB có mức độ đa dạng trong hoạt động hòa tan photphat khi có mặt các kim loại nặng khác nhau [4, 14, 15]. Trong nghiên cứu này, hoạt tính hòa tan photphat của các chủng phân lập được là khác nhau và đặc biệt là không có kim loại nào được tìm thấy có độc tính cao đối với các chủng phân lập trong thời gian thí nghiệm. Tuy nhiên, sự hiện diện của các kim loại nặng trong môi trường NBRIP đã làm giảm đáng kể khả năng hòa tan photphat. Khả năng hòa tan

photphat giảm khi nồng độ kim loại nặng tăng lên (Hình 3). Chủng vi khuẩn cho thấy mức độ giảm khả năng hòa tan photphat rất cao với sự hiện diện của các kim loại nặng Cd (Hình 3a) và Pb (Hình 3b). Thứ tự độc tính của các kim loại được tìm thấy là $Pb > Cd > Cu > Zn$. Theo kết quả, các kim loại nặng Cd và Pb có tác động mạnh đến quá trình hòa tan photphat (Hình 3a và 3b) và Cu và Zn có tác động tiêu cực nhẹ nhưng ảnh hưởng đáng kể đến quá trình hòa tan photphat (Hình 3c và 3d). Kết quả độc tính tương tự cũng được quan sát bởi Singh và cộng sự (2016) [12], cho thấy tốc độ tăng trưởng chậm hơn của các chủng phân lập khi có các kim loại nặng. Điều này có thể là do sự suy giảm các hoạt động trao đổi chất khác nhau của vi sinh vật, kết quả là giảm lượng axit trong môi trường, do đó pH tăng [2, 15]. Hơn nữa, các vi sinh vật hòa tan photphat được phân lập từ đất bị ô nhiễm kim loại nặng đã phát triển các cơ chế đối phó với nhiều loại kim loại độc để tồn tại trong môi trường được làm giàu với các kim loại đó, do đó, sự thích nghi của vi sinh vật với môi trường ô nhiễm kim loại nặng như vậy có thể là lý do có thể do khả năng chống lại kim loại nặng của chúng [12].



Hình 3. Ảnh hưởng của ba nồng độ khác nhau của Cd (A), Pb (B), Zn (C), và Cu (D) đến quá trình hòa tan photphat và sự thay đổi pH của *Burkholderia gladioli*

Ghi chú: Giá trị được đưa ra ở đây là giá trị trung bình ($n = 3$).

Việc phân lập các vi sinh vật vừa chịu được kim loại vừa có hiệu quả trong việc thúc đẩy tăng trưởng thực vật có tầm quan trọng đặc biệt trong việc cải tạo đất ô nhiễm kim loại nặng, do chúng có khả năng cố định các kim loại nặng trong đất làm giảm độc tính của kim loại nặng, hoặc chúng có thể sản xuất ra các enzyme, các chất có hoạt tính sinh học để phân giải các hợp chất không tan của P, N và K làm tăng hàm lượng dinh dưỡng trong đất giúp cây trồng sinh trưởng và phát triển tốt trên đất nhiễm kim loại [2, 9, 15]. Chúng được coi là công cụ hiệu quả về chi phí và thân thiện với môi trường để hạn chế sự di chuyển của kim loại nặng đến các cơ quan thực vật bằng cách biến đổi các loài kim loại thành dạng bất động để giảm độc tính của kim loại [2, 4]. Chúng có thể trở nên hữu ích để đẩy nhanh quá trình xâm chiếm của thực vật thân rễ trong đất ô nhiễm kim loại nặng. Do đó, cần có thêm các nghiên cứu sâu hơn để đánh giá các hoạt động thúc đẩy tăng trưởng thực vật khác của dòng vi khuẩn hòa tan phốt phát được phân lập dưới tác động của kim loại nặng.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được 11 chủng vi khuẩn phân giải phốt phoát và kháng được một số kim loại nặng ở các nồng độ khác nhau. Trong đó, chủng ND03 được định danh là vi khuẩn *Burkholderia gladioli*, có khả năng hòa tan phốt pho cao nhất và kháng được cả 4 kim loại (Cd, Pb, Zn, Cu) với nồng độ khác nhau. Kết quả cho thấy tiềm năng sử dụng vi khuẩn ND03 làm chế phẩm sinh học để làm tăng hàm lượng phốt pho có sẵn trong đất (lên đến 237,41 đến 573,97 mgP/Kg) và do đó có khả năng giúp cải thiện sự sinh trưởng và phát triển của cây trồng trên nhiễm kim loại nặng. Các nghiên cứu sâu hơn là cần được tiến hành để đánh giá các hoạt động thúc đẩy tăng trưởng thực vật khác của dòng vi khuẩn hòa tan phốt phát được phân lập

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tiến hành trong khuôn khổ đề tài QG.21.59 "Nghiên cứu đánh giá khả năng hấp phụ phốt pho và đề xuất giải pháp nâng cao hiệu lực phân lân trong canh tác lúa vùng ĐBSH" của Đại học Quốc gia Hà Nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ahemad M and Khan MS (2012). Effect of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* isolated

from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere. Chemosphere 86: 945–950.

2. Chen H, Zhang J, Tang L, Su M, Tian D, Zhang L, Li Z and Hu S (2019). Enhanced Pb immobilization via the combination of biochar and phosphate solubilizing bacteria. Environ. Int. 127: 395–401.

3. Huỳnh Thị Cẩm Tiên và Hồ Viết Thế (2019). Phân lập và định danh một số chủng *Bacillus* spp có hoạt tính cao trong tầng đất mặt được thu thập từ tỉnh Bình Thuận, Tạp chí Khoa học và Công nghệ Thực phẩm 18(2):48-62.

4. Khanna K, Jamwal VL, Gandhi SG, Ohri P, and Bhardwaj R (2019). Metal resistant PGPR lowered Cd uptake and expression of metal transporter genes with improved growth and photosynthetic pigments in *Lycopersicon esculentum* under metal toxicity. Scientific Reports. 9: 2019.

5. Mallick I, Hossain ST, Sinha S, and Mukherjee SK (2014). *Brevibacillus* sp. KUMAs2, a bacterial isolate for possible bioremediation of arsenic in rhizosphere. Ecotoxicol. Environ. Saf. 107: 236-244.

6. Murphy J and Riley JP (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal. Chim. Acta 27: 31–36.

7. Nautiyal CS (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol. Lett. 170:265–270.

8. Nguyễn Thị Thanh Mai, Chu Đức Hà, Phạm Phương Thu, Nguyễn Văn Giang (2018). Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn phân giải lân, kali khó tan từ đất trồng cà phê tại khu vực Tây Nguyên. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam 60(5): 34-38.

9. Paul D and Sinha SN (2015). Isolation and characterization of a phosphate solubilizing heavy metal tolerant bacterium from River Ganga, West Bengal, India. Songklanakarin J. Sci. Technol. 37:651-657.

10. Rajkumar M, Ae N, Prasad MNV and Freitas H (2010). Potential of siderophore producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. Trends Biotechnol. 28:142–149.

11. Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH and Gobi TA (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. Springer Plus 2: 587 - 601.
12. Singh S, Parihar P, Singh R, Singh VP and Prasad SM (2016). Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. Front. Plant Sci. 6:1143.
13. Song J, Min L, Wu J, He Q, Chen F, Wang Y (2021). Response of the microbial community to phosphate-solubilizing bacterial inoculants on *Ulmus chenmoui* Cheng in Eastern China. PLoS ONE 16(2): e0247309.
14. Tian J, Peng XW, Li X, Sun YJ, Feng HM, Jiang ZP (2014). Isolation and characterization of two bacteria with heavy metal resistance and phosphate solubilizing capability. Huan Jing Ke Xue. 35(6):2334-2340.
15. Wan W, Qin Y, Wu H, He H, Tan J, Wang Y and He D (2020). Isolation and characterization of phosphorus solubilizing bacteria with multiple phosphorus sources utilizing capability and their potential for lead immobilization in soil. Front Microbiol. 11:752.
16. Wani PA and Khan MS (2010). *Bacillus* species enhance growth parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in chromium stressed soils. Food Chem. Toxicol. 48: 3262–3267.
17. Yahaghi Z, Shirvani M, Nourbakhsh F, de la Peña TC, Pueyo JJ, Talebi M (2018). Isolation and Characterization of Pb-Solubilizing Bacteria and Their Effects on Pb Uptake by *Brassica juncea*: Implications for Microbe-Assisted Phytoremediation. J Microbiol Biotechnol. 28(7):1156-1167.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PHOSPHATE-SOLUBILIZING AND HEAVY-METAL RESISTANCE BACTERIA FROM PADDY SOIL IN NAM DINH

Do Quang Trung^{1*}, Luu The Anh¹, Nguyen Trong Tri²,

Dao Minh Truong¹, Ngo Ngoc Dung¹, Dinh Mai Van²

¹Central Institute for Natural Resources and Environmental Studies, Vietnam Nation University
Ha Noi

²Vietnam National University of Forestry

*Email: trungcnsinh@gmail.com

Summary

This study was conducted to isolate bacteria from paddy soil in Nam Dinh province with phosphate solubilization and heavy metal resistance. The results showed that almost all the isolates could be resistant to heavy metals at low concentrations. However, the resistance decreased significantly as heavy metal concentrations increased. Among the 11 isolates tested, 7 strains were vulnerable to heavy metals Cd and Pb at concentrations of 400 mg/L and three strains presented a better tolerance. Especially, strain ND03 (*Burkholderia gladioli*) showed the highest tolerance to Cd, Pb, Cu and Zn in the range of studied concentrations. However, the phosphate solubility of strain ND03 was also greatly reduced in the presence of heavy metals, Cd and Pb. In general, the influence of heavy metals on the phosphate solubility of bacterial strains was found to decrease in the following order: Pb > Cd > Cu > Zn. The results in this study showed that strain ND03 has potential applications in soil improvement, increasing the solubility of mineral phosphates in heavy metal contaminated soil.

Keywords: Bacteria, metal resistance, phosphate solubilization, paddy soil, 16S rDNA.

Người phản biện: GS.TS. Nguyễn Xuân Cự

Ngày nhận bài: 29/7/2021

Ngày thông qua phản biện: 30/8/2021

Ngày duyệt đăng: 6/9/2021