

THÀNH PHẦN AXIT HỮU CƠ TRONG DỊCH NUÔI MỘT SỐ CHỦNG VI SINH VẬT HOÀ TAN PHỐT PHAT

NGUYỄN THỊ PHƯƠNG CHI, PHẠM THANH HÀ,
NGUYỄN THỊ QUỲNH MAI
Viện Công nghệ sinh học

Trong quá trình sinh trưởng, một số chủng vi sinh vật có khả năng tiết ra môi trường sống các chất làm hoà tan các hợp chất photphat khó tan. Tổng quan về các cơ chế hòa tan photphat nhờ vi sinh vật, Kapoor [3] đã nêu một số khả năng chính: sản ra các cơ chất phức hóa, các chất humic, sunfua hydrô, các axit khoáng, phức hóa sắt (siderophores) hoặc thải ra các proton, nhưng cơ chế thường hay gặp nhất là sinh tổng hợp các axit hữu cơ. Đã có nhiều công trình nghiên cứu sử dụng các chủng nấm sợi có khả năng sinh tổng hợp các axit hữu cơ với hàm lượng cao để hòa tan các quặng photphat [2, 3, 4, 11].

Trong các bài trước [5, 6, 7, 8], chúng tôi đã xác định khả năng axit hóa môi trường của các chủng vi sinh vật hoà tan photphat. Bài báo này muốn đi sâu tìm hiểu thành phần axit hữu cơ nào có trong các chủng vi sinh vật đó để định hướng trong nghiên cứu điều kiện nuôi cấy cũng như sử dụng chúng.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- Các chủng vi sinh vật, gồm 8 chủng nấm sợi và 10 chủng vi khuẩn được lấy từ Bộ sưu tập chủng vi sinh vật của Phòng Vi sinh vật đất-Viện Công nghệ sinh học.

- Xác định khả năng axit hóa môi trường của các chủng vi sinh vật trên môi trường thạch đĩa dựa theo phương pháp của Cunningham J. E. và cs. [2] bằng cách đo đường kính của vòng môi trường chuyển màu của thuốc thử alizarin sau 7 ngày nuôi cấy.

- Nuôi cấy nấm sợi trong 50 ml môi trường

dịch thể Czapek, trong đó thay nguồn photphat dễ tan bằng 0,5% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Cấy 1 vòng que cấy (chứa khoảng 10^6 bào tử) từ ống giống thạch nghiêng vào môi trường dịch thể. Điều kiện nuôi cấy: tốc độ 200v/phút, nhiệt độ 30°C. Sau 96 giờ nuôi cấy, lọc qua giấy lọc để loại bỏ sinh khối. Xác định thành phần axit hữu cơ trong dịch qua lọc.

- Nuôi cấy vi khuẩn trong 50ml môi trường dịch thể Gerretsen [1] chứa trong bình nón dung tích 250ml. Cấy huyền phù vi khuẩn đã nuôi lác trong 24 giờ theo tỷ lệ 1%. Điều kiện nuôi cấy: tốc độ 200v/ phút, nhiệt độ 28°C. Sau 48 giờ nuôi cấy, ly tâm loại bỏ tế bào để phân tích axit hữu cơ trong dịch nổi.

- Xác định thành phần axit hữu cơ trong dịch nuôi VSV trên máy sắc ký lỏng cao áp Shimadzu. Lượng dịch đưa vào xác định của mỗi mẫu là 20 μl /lần. Các loại axit hữu cơ có thể xác định là: lactic, malic, oxalic, axetic, xitric, tartaric.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Thành phần axit hữu cơ của 8 chủng nấm sợi

Dựa trên các kết quả tuyển chọn các chủng nấm sợi có hoạt tính phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ cao đã trình bày trong các bài trước [5, 6], chúng tôi đã nghiên cứu thành phần các axit hữu cơ trong dịch nuôi lác của 8 chủng nấm sợi tốt nhất. Danh sách các chủng và đường kính (D) của vòng tạo axit của chúng khi nuôi trên môi trường thạch đĩa Czapek chứa $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ và alizarin (sau 7 ngày) được trình bày trong bảng 1.

Công trình được hỗ trợ về kinh phí của Chương trình nghiên cứu cơ bản.

Các chủng nấm sợi được nghiên cứu

| Số thứ tự | Ký hiệu chủng | Phân loại sơ bộ | D sinh axit (cm) |
|-----------|---------------|--|---------------------|
| 1 | MN 1 | <i>Aspergillus awamorii</i> Nakazawa | 7,0 (vàng) |
| 2 | MN 2 | <i>Penicillium aff. vitale</i> Pidopl et Bilai | 3,0 (đỏ tím, trong) |
| 3 | DT 1 | <i>Penicillium cyaneofulvum</i> Biourge | 2,2 (vàng) |
| 4 | DT 2 | <i>Penicillium madriti</i> G. Smith | 2,5 (đỏ tím trong) |
| 5 | D 1.4 | <i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx var. <i>cyclopium</i> (Westling) Samson, Stolk et Madlok | 0,7 (đỏ tím trong) |
| 6 | TS 1 | <i>Penicillium verruculosum</i> Peyronel | 5,5 (vàng) |
| 7 | DCTP 4.2 | <i>Penicillium funiculosum</i> Thom | 2,2 (đỏ tím trong) |
| 8 | DLCHX 2.1 | <i>Penicillium velutinum</i> v. Beyma | 6,5 (vàng) |

Các chủng MN1, DT1, TS1, DLCHX 2.1 đã tạo vòng phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ kèm theo sự chuyển màu alizarin từ đỏ tím sang vàng, thể hiện đã axit hóa mạnh môi trường. Những chủng còn lại đã phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ nhưng không axit hóa môi trường nên chỉ tạo vòng phân giải mang màu đỏ tím trong.

Kết quả phân tích các mẫu dịch nuôi cấy các chủng nấm sợi trong môi trường dịch thể chứa $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ cho thấy: trong 6 loại axit hữu cơ có thể xác định được là lactic, malic, oxalic, axêtic, xitric, tataric, chỉ phát hiện được 2 loại axit xitric và lactic. Hàm lượng của hai loại axit hữu cơ này trong dịch nuôi của 8 chủng sau 4 ngày được trình bày trong bảng 2.

Thành phần axit hữu cơ của 8 chủng nấm sợi chủ yếu đều là axit xitric (trong số 6 axit hữu cơ đã phân tích), phù hợp với tổng kết của Gaur A.C. (1990) [3]: "Axit xitric và axit fumaric là những axit hoà tan photphát tri-canxi và quặng photphát mạnh nhất".

Trong 8 chủng được nghiên cứu, chủng DLCHX 2.1 tiết ra cả 2 loại axit xitric và lactic và có hàm lượng axit xitric cao nhất so với các chủng còn lại. Điều này phù hợp với kết quả xác định khả năng axit hóa môi trường thạch đĩa đã nghiên cứu từ trước [5] được trình bày trong bảng 1. Trong khi đó, chủng MN1 cũng axit hóa mạnh môi trường thạch đĩa và hoà tan nhanh photphát khó tan kèm theo làm giảm độ pH của môi trường dịch nuôi cấy lác [5] nhưng lại tiết

ra lượng axit xitric thấp thua so với các chủng khác (chỉ cao hơn chủng DT1). Có thể nghĩ tới khả năng chủng MN1 hoà tan photphát theo cơ chế sản ra các chất khác như nghiên cứu của một số tác giả đối với một số chủng vi sinh vật [2, 3], thí dụ sinh axit vô cơ hoặc axit 2-ketogluconic, còn cơ chế sản ra axit xitric không đóng vai trò chính như trong trường hợp của chủng DLCHX2.1.

Bảng 2

Thành phần axit hữu cơ trong dịch nuôi cấy của 8 chủng nấm sợi

| Ký hiệu chủng nấm sợi | Hàm lượng axit hữu cơ (g/l) trong dịch nuôi cấy sau 96 giờ | |
|-----------------------|--|--------|
| | Xitric | Lactic |
| MN 1 | 0,09 | 0 |
| MN 2 | 0,34 | 0 |
| DT 1 | 1,24 | 0 |
| DT 2 | 0,01 | 0 |
| D 1.4 | 1,74 | 0 |
| TS 1 | 0,11 | 0 |
| DCTP 4.2 | 1,06 | 0 |
| DLCHX 2.1 | 5,31 | 0,03 |

2. Thành phần axit hữu cơ của 10 chủng vi khuẩn

Danh sách các chủng vi khuẩn hòa tan photphát nghiên cứu trong bài này được trình bày ở bảng 3. Các chủng vi khuẩn được phân loại theo Kit chuẩn API 20E. Kết quả về khả năng axit hóa môi trường thạch đĩa Geretsen của

các chủng vi khuẩn đồng thời với hoà tan photphát sau khi nuôi cấy 7 ngày đã được trình bày trong bài trước [9]. Để tiện theo dõi, trong bảng 3, chúng tôi nêu lại các số liệu về khả năng axit hóa môi trường biểu hiện bằng đường kính (D) của vòng phân giải photphát và chuyển màu chất chỉ thị alizarin S trích từ bài báo trên.

Bảng 3

Danh sách các chủng vi khuẩn được nghiên cứu

| Số thứ tự | Ký hiệu chủng | Tên phân loại theo API 20E | D axit hóa môi trường (cm) |
|-----------|---------------|---------------------------------|------------------------------|
| 1 | RTL.1 | <i>Pseudomonas</i> spp. | 0,93 (tím trong) |
| 2 | RTL.2.2 | <i>Pseudomonas</i> spp. | 3,23 (trắng) |
| 3 | RTL.3 | <i>Flavobacterium odoratum</i> | 3,00 (vàng) |
| 4 | RTL.6 | <i>Pseudomonas</i> spp. | 3,50 (trắng trong) |
| 5 | RTL.7 | <i>Achromobacter</i> spp. | 2,50 (trắng trong) |
| 6 | DDP.5 | <i>Flavobacterium odoratum</i> | 2,53 (trắng trong) |
| 7 | DTL.4 | <i>Flavimonas oryzihabitans</i> | 1,80 (trắng trong) |
| 8 | DTL.2.2 | <i>Achromobacter</i> spp. | 2,83 (trắng trong) |
| 9 | Q.5.2 | <i>Achromobacter</i> spp. | 1,46 (trắng trong) |
| 10 | III e | <i>Enterobacter aerogenes</i> | không xác định |

Trong 9 chủng vi khuẩn đã đo vòng axit hóa môi trường, chỉ có 1 chủng RTL3 là làm chuyển màu đỏ của alizarin S sang màu vàng đặc trưng cho môi trường bị axit hóa mạnh. Những chủng còn lại phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ nhưng không làm giảm độ pH của môi trường tới mức chuyển màu alizarin S đỏ sang màu vàng chỉ thị cho $\text{pH} < 4$. Điều này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu tiếp theo trong điều kiện nuôi cấy trong dịch thể Geretsen. Khi nghiên cứu ảnh hưởng của độ pH của môi trường nuôi cấy ban đầu (các mức pH: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) lên sự sinh trưởng và khả năng hoà tan photphát của 10 chủng vi khuẩn này trong điều kiện nuôi cấy sau 48 giờ, chúng tôi đã nhận thấy [7]: "Các giá trị của độ pH trong dịch nuôi cấy vi khuẩn phần lớn là giảm so với độ pH ban đầu nhưng đều không thấp hơn 4, chứng tỏ các chủng vi khuẩn được nghiên cứu không gây axit hóa mạnh cho môi trường".

Trong 6 loại axit hữu cơ: xitric, tataric, malic, lactic, axêtic, ôxalic được phân tích trên máy sắc ký lỏng cao áp, chỉ phát hiện được 3 loại axit xitric, malic và axêtic trong các mẫu

dịch nuôi của 10 chủng vi khuẩn này nên trong bảng 4, chúng tôi chỉ trình bày 3 loại axit có mặt.

Trong dịch nuôi cấy của 9 trên 10 chủng vi khuẩn được nghiên cứu, đã phát hiện thấy có axit xitric. Cùng với kết quả trong bảng 2, có thể thấy các chủng vi sinh vật được nghiên cứu hầu hết đều hòa tan photphát nhờ khả năng hình thành axit xitric, phù hợp với quan điểm của nhiều tác giả khác [2, 3, 4, 11]. Điều đáng quan tâm là chủng RTL3 axit hóa mạnh môi trường thạch đĩa nhưng không phát hiện thấy có thành phần axit hữu cơ nào trong 6 loại axit hữu cơ được phân tích. Cũng có thể là: chủng vi khuẩn RTL3 cũng tương tự như chủng nấm sợi MN1 hoà tan photphat nhờ khả năng sản sinh ra các chất khác chứ không phải chủ yếu do axit xitric.

Chủng IIIe có khả năng tiết ra 3 loại axit hữu cơ: xitric, malic, axêtic trong số 6 loại axit hữu cơ được phân tích, tuy hàm lượng axit xitric không cao. Đây là chủng vi khuẩn có khả năng sinh nhiều chất có hoạt tính sinh học đã được

Thành phần axit hữu cơ của 10 chủng vi khuẩn

| Số thứ tự | Ký hiệu chủng | Hàm lượng axit hữu cơ (g/l) trong dịch nuôi cấy VK sau 48 giờ | | |
|-----------|---------------|---|-------|--------|
| | | Xitric | Malic | Axetic |
| 1 | RTL.1 | 0,86 | 0 | 0 |
| 2 | RTL.2.2 | 0,09 | 0 | 0 |
| 3 | RTL.3 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | RTL.6 | 0,28 | 0 | 0 |
| 5 | RTL.7 | 0,14 | 0 | 0 |
| 6 | DDP.5 | 0,47 | 0 | 0 |
| 7 | DTL.4 | 0,22 | 0 | 0 |
| 8 | DTL.2.2 | 0,45 | 0 | 0 |
| 9 | Q.5.2 | 0,10 | 0 | 0 |
| 10 | III e | 0,08 | 0,13 | 0,03 |

nghiên cứu trong các bài trước [8, 10] như khả năng cố định nitơ hội sinh, sinh chất kích thích sinh trưởng AIA, phân giải photphát.

Mười tám chủng vi sinh vật được nghiên cứu trong bài này đã được ứng dụng để sản xuất phân bón vi sinh vật cho cây trồng [8, 10]. Những kết quả trong bài này sẽ giúp thêm cơ sở khoa học để cải tiến các bước giữ giống, cơ cấu giống vi sinh vật, thành phần cơ chất, môi trường v.v.. trong quy trình sản xuất các chế phẩm cụ thể.

III. KẾT LUẬN

Phân tích thành phần axit hữu cơ trong dịch nuôi cấy của 18 chủng vi sinh vật có khả năng hoà tan photphát, đã nhận được những kết quả sau:

1. Trong dịch nuôi của các chủng, đều không phát hiện được các axit oxalic và tataric.

2. Axit xitric có trong dịch nuôi cấy của 17/18 chủng vi sinh vật được nghiên cứu, chúng tỏ cơ chế sản ra axit xitric để hoà tan photphát là phổ biến ở đa số vi sinh vật có khả năng hoà tan photphát.

3. Chủng *Flavobacterium odoratum* RTL3 là chủng duy nhất không phát hiện được axit hữu cơ nào trong 6 loại axit hữu cơ được phân tích, mặc dù khả năng axit hóa môi trường thạch

đĩa Geretsen mạnh nhất so với 9 chủng vi khuẩn còn lại.

4. Chủng nấm sợi *Penicillium velutinum* DLCHX 2.1. sản ra hàm lượng axit xitric cao nhất so với các chủng khác, đồng thời cũng sinh tổng hợp axit lactic. Chủng vi khuẩn *Enterobacter aerogenes* IIIe sinh tổng hợp 3 loại axit hữu cơ: xitric, malic và axetic trong dịch nuôi cấy với môi trường chứa photphát canxi khó tan.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Babenko Iu. S. et al., 1984: Microbiologia, 53: 533-539.
2. Cunningham James E., Cathy Kuyack, 1992: Applied & Environmental Microbiology, 58(5): 1451-1458.
3. Kapoor K. K., 1996: In: "Plant microbe interactin in sustainable agriculture": 46-60 Eds: R. K. Behl; A.L. Khurane; R. C. Dogra; CCSHAU, Hisar and MMB, New Delhi.
4. Nahas E., Banzatto D. A. & Assis L. C., 1990: Soil Biol. Biochem., 22(8): 1097-1101.
5. Nguyễn Thị Phương Chi, Phạm Thanh Hà, Hà Hồng Thanh, 1997: Tạp chí Sinh

- học, 19(2): 68-73.
6. Nguyễn Thị Phương Chi, Phạm Thanh Hà, Nguyễn Thị Quỳnh Mai, 2000: Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong Sinh học: 18-22. Nxb. Đại học Quốc gia Hà Nội.
 7. Nguyễn Thị Phương Chi, Phạm Thanh Hà, Nguyễn Thị Quỳnh Mai, 2003: Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống. Hội nghị toàn quốc lần thứ hai nghiên cứu cơ bản trong sinh học, nông nghiệp, y học: 559-562. Huế.
 8. Nguyễn Thị Phương Chi và cs., 2003: Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc: 194-198. Hà Nội.
 9. Phạm Thanh Hà, Nguyễn Thị Phương Chi, 1998: Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học năm 1996: 107-113.
 10. Phạm Thanh Hà và cs., 2003: Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc: 189-193. Hà Nội.
 11. Vassilev N. et al., 1995: Appl. Microbiol. Biotechnol., 44: 546-549.

ORGANIC ACID COMPONENTS IN THE CULTURED MEDIUM OF SOME PHOSPHATE SOLUBILIZING MICROORGANISM STRAINS

NGUYEN THI PHUONG CHI, PHAM THANH HA, NGUYEN THI QUYNH MAI

SUMMARY

The determination of the organic acid components in the shaking cultured media of 18 phosphate solubilizing microorganism strains has recorded the results as follow:

1. The oxalic and tartaric acids were not found out in the cultured medium of all 18 strains.
2. The citric acid was produced in the cultured medium by 17/18 strains. It demonstrated that the production of the citric acid during the growth of the phosphate solubilizing microorganisms was the primary mechanism of the solubilization of insoluble inorganic phosphates.
3. The *Flavobacterium odoratum* RTL.3 strain was the only strain which didn't produce any kind of these 6 determined organic acids, although the acidification of the agar medium was highest.
4. The fungal strain *P. vetulinum* DLCHX 2.1. produced the highest quantitative of citric acid in compare with others and also produced lactic acid. The bacterial strain *Enterobacter derogenes* IIIe biosynthesized citric, malic and acetic acids.

Ngày nhận bài: 8-3- 2004