

KHẢ NĂNG CHỊU MUỐI CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN PHÂN GIẢI PHỐTPHÁT KHÓ TAN

PHẠM THANH HÀ, NGUYỄN THỊ QUỲNH MAI
NGUYỄN THỊ PHƯƠNG CHI

Viện Công nghệ sinh học

Hiện nay, nhiều nơi trên thế giới và trong nước [3, 4, 8, 9] đang nghiên cứu và sử dụng vi sinh vật phân giải phốtphát khó tan để nhấm vào hạt hoặc bón vào đất làm tăng năng suất và chất lượng cây trồng, bảo vệ môi trường sinh thái đất, góp phần xây dựng nền nông nghiệp bền vững.

Như mọi vi sinh vật khác, khả năng sinh trưởng và hoạt tính của vi sinh vật phân giải phốtphát khó tan chịu ảnh hưởng của rất nhiều yếu tố lý, hóa, sinh học trong môi trường đất, trong rễ quyển (rhizosphere) và rễ cây. Muốn sử dụng thành công một chủng vi sinh vật phân giải phốtphát vào điều kiện đất trồng nào đó, cần phải hiểu rõ nó có thể sinh trưởng và thể hiện hoạt tính trong môi trường sinh thái đó không. Trong bài trước [8], chúng tôi đã trình bày kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của một số nguồn dinh dưỡng (nitơ, cacbon, phốtphát) lên sinh trưởng và hoạt tính phân giải phốtphát của một số chủng nấm sợi và vi khuẩn. Bài báo này muốn nêu lên những kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của các nồng độ muối khác nhau tới một số chủng vi khuẩn hoà tan phốtphát.

Theo tổng kết của Viện Quy hoạch và Thiết kế nông nghiệp năm 1996 [5], đất vùng ven biển đồng bằng Bắc bộ phần lớn là đất chua mặn, thuộc các tỉnh Hải Phòng, Nam Định, Hà Nam, Ninh Bình. Vùng đồng bằng sông Cửu Long (diện tích đất nông nghiệp 2,6 triệu hecta), có tới 40,7% là đất phèn mặn và 18,9% đất mặn. Có lẽ rằng, đối với những diện tích đất mặn này thì chỉ những vi sinh vật có khả năng chịu muối mới phát huy được lợi thế của mình. Các tác giả

Ấn Độ [3, 7] đã quan tâm tìm kiếm các vi khuẩn phân giải phốtphát chịu mặn để sử dụng trong những vùng đất nhiệt đới kiềm, nồng độ muối khoảng 2%, pH tới 10,5 và nhiệt độ dao động từ 35°C đến 45°C. Việc tìm ra những chủng vi sinh vật hữu ích cho cây trồng có khả năng chịu mặn sẽ có ý nghĩa lớn cho công nghệ sản xuất các chế phẩm vi sinh hoặc phân hữu cơ - vi sinh phục vụ cho các vùng đất mặn.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mười chủng vi khuẩn có khả năng phân giải phốtphát khó tan, thuộc bộ sưu tập chủng vi sinh vật của Phòng Vi sinh vật đất, Viện Công nghệ sinh học.

Nuôi cấy vi khuẩn trong 50 ml môi trường dịch thể Gerretsen [1] chứa trong bình nón dung tích 250 ml. Thay đổi các nồng độ NaCl trong dịch nuôi từ 0% đến 5%. Cây huyền phù vi khuẩn đã nuôi lác 24 giờ theo tỷ lệ 1%. Điều kiện nuôi cấy: lác tốc độ 200 vòng/phút, nhiệt độ 30°C. Phân tích mẫu sau 48 giờ nuôi cấy. Các mẫu thí nghiệm đều phân tích so với đối chứng có nồng độ muối tương ứng.

Phân tích mật độ vi khuẩn trong dịch nuôi bằng cách đếm trên thạch đĩa Gerretsen theo phương pháp của Koch [2].

Xác định hàm lượng P_2O_5 tan trong dịch nổi (sau ly tâm) theo phương pháp so màu ở bước sóng $\lambda = 620$ nm, dựa trên phản ứng hỗn hợp xanh molybdophosphoric. Lượng P_2O_5 tan được tính dựa vào đường chuẩn thiết lập theo dung

dịch KH₂PO₄ [6].

Bảng 1

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Mười chủng vi khuẩn có khả năng phân giải photphát khó tan đã được định loại theo Kit chuẩn API 20E, ký hiệu chủng và tên phân loại được trình bày ở bảng 1.

1. Khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn phân giải photphát trong môi trường có độ muối khác nhau

Các kết quả phân tích mật độ vi khuẩn trong dịch nuôi cấy sau 48 giờ trong môi trường dịch thể Gerretsen cho thấy cả 10 chủng đều sinh trưởng tốt khi không bổ sung NaCl vào môi trường (nồng độ 0%). Mức độ chịu muối của 10 chủng có thể chia làm 4 nhóm. Nhóm thứ nhất chịu muối kém nhất, chỉ phát triển trong môi trường 0% và 1% NaCl. Kết quả trình bày ở bảng 2.

Danh sách các chủng được nghiên cứu

STT	Ký hiệu chủng	Tên phân loại theo API 20E
1	RTL 2.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
2	RTL 6	<i>Pseudomonas</i> sp.
3	RTL 1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
4	RTL 7	<i>Achromobacter</i> sp.
5	Q 5.2	<i>Achromobacter</i> sp.
6	ĐTL 2.2	<i>Achromobacter</i> sp.
7	RTL 3	<i>Flavobacterium odoratum</i>
8	ĐĐP 5	<i>Flavobacterium odoratum</i>
9	ĐTL 4	<i>Flavimonas orizihabitans</i>
10	IIIe	<i>Enterobacter aerogenes</i>

Mười chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong 6 nồng độ NaCl (%) : 0, 1, 2, 3, 4, 5.

Bảng 2

Các chủng vi khuẩn phát triển trong nồng độ NaCl 0% và 1%

STT	Ký hiệu chủng	Mật độ VK ban đầu (x10 ⁶ CFU/ml)	Mật độ VK sau 48 giờ trong các nồng độ NaCl (x10 ⁶ CFU/ml)					
			0%	1%	2%	3%	4%	5%
1	RTL 7	102	2900	2250	18,80	16,3	6,9	1,42
2	ĐTL 2.2	46,8	1640	567	21,6	16,1	2,86	2,12

Hai chủng trong nhóm thứ nhất khi được nuôi trong môi trường có nồng độ muối từ 2% trở lên, đã giảm hẳn mật độ. Sau 48 giờ nuôi cấy, chủng RTL 7 còn 18,43% CFU/ml so với mật độ ban đầu, còn ở chủng ĐTL 2.2 là 46,15%. Các tỷ lệ này giảm dần theo nồng độ NaCl tăng lên.

Nhóm thứ hai gồm 3 chủng có khả năng phát triển tốt ở 3 nồng độ NaCl: 0%, 1% và 2%. Khi chuyển từ nồng độ NaCl thuận lợi cho phát triển sang đến nồng độ không thuận lợi (3%), tỷ lệ mật độ vi khuẩn bị giảm theo thứ tự: ĐĐP 5 (87,25%) > Q5,2 (86,40%) > RTL 6 (65,22%) (bảng 3).

Bảng 3

Các chủng vi khuẩn phát triển trong nồng độ NaCl 0%, 1%, 2%

STT	Ký hiệu chủng	Mật độ VK ban đầu (x10 ⁶ CFU/ml)	Mật độ VK sau 48 giờ trong các nồng độ NaCl (x10 ⁶ CFU/ml)					
			0%	1%	2%	3%	4%	5%
1	RTL 6	92,0	1790	850	420	60	13,7	8,6
2	Q5.2	54,4	1530	710	630	47	1,2	5,5
3	ĐĐP 5	102	1970	1090	365	89	19,4	5,5

Bảng 4 trình bày mật độ vi khuẩn trong dịch nuôi cấy sau 48 giờ của nhóm thứ ba, bao gồm 3 chủng có khả năng phát triển tốt trong 4 nồng độ NaCl là 0%, 1%, 2% và 3%.

Bảng 4

Các chủng vi khuẩn phát triển trong nồng độ NaCl 0%, 1%, 2%, 3%

STT	Ký hiệu chủng	Mật độ VK ban đầu ($\times 10^6$ CFU/ml)	Mật độ VK sau 48 giờ trong các nồng độ NaCl ($\times 10^6$ CFU/ml)					
			0%	1%	2%	3%	4%	5%
1	RTL 1	42,4	2150	1510	162	76,2	25,2	10,3
2	RTL3	55,2	2960	1960	157	106	19,0	9,0
3	ĐTL4	53,8	3850	3080	832	301	10,3	1,6

Trong 10 chủng, có 2 chủng là có khả năng phát triển trong cả 6 thử nghiệm về các nồng độ muối (bảng 5).

Bảng 5

Các chủng vi khuẩn phát triển trong cả 6 nồng độ NaCl

STT	Ký hiệu chủng	Mật độ VK ban đầu ($\times 10^6$ CFU/ml)	Mật độ VK sau 48 giờ trong các nồng độ NaCl ($\times 10^6$ CFU/ml)					
			0%	1%	2%	3%	4%	5%
1	RTL 2.2	79,2	1450	1250	660	211	134	104
2	III e	36,8	710	690	508	426	309	87

Như trong bài trước [8] đã trình bày, chủng IIIe là chủng đã sử dụng để sản xuất chế phẩm vi sinh vật cố định nitơ, có khả năng cố định nitơ hội sinh kỵ khí với vài cây trồng và có khả năng hòa tan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ khá khi được nuôi trên 6 nguồn cacbon khác nhau. Trong môi trường dịch thể Gerretsen với các nồng độ muối khác nhau, chủng IIIe phát triển với mật độ tế bào không bằng những chủng khác, nhưng vẫn có khả năng phát triển trong các nồng độ từ 0% đến 5%. Hai chủng RTL2.2 và IIIe là hai chủng có khả năng chịu mặn tốt nhất trong mười chủng.

Cả 10 chủng thử nghiệm trong bài này đều là các chủng Gram âm, không sinh bào tử. Khi tăng nồng độ NaCl trong môi trường nuôi cấy tới 5%, 8 chủng ở nhóm 1, 2 và 3 không chết hoàn toàn, vẫn còn một số lượng tế bào tồn tại sau 48 giờ, thể hiện bằng tạo khuẩn lạc trên thạch đĩa. Phải chăng mật độ CFU/ml huyền phù nuôi (không tăng số lượng so với ban đầu) của mỗi chủng là biểu hiện số lượng tế bào có khả năng tạo dạng cyst trong mỗi nồng độ

muối? Có lẽ những thí nghiệm kéo dài thêm thời gian nuôi cấy sẽ cho những hiểu biết sâu hơn.

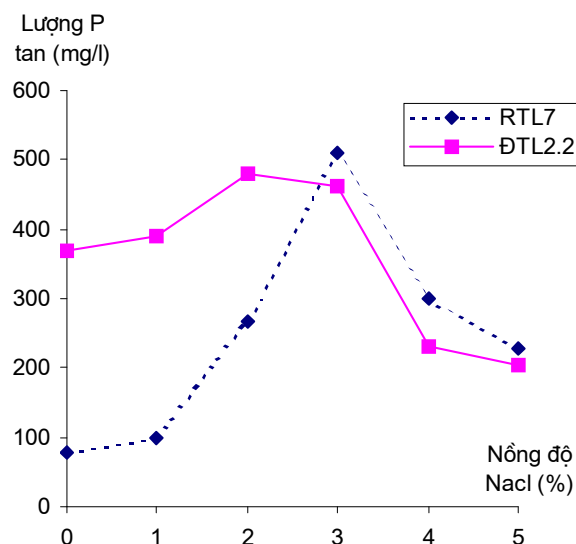
2. Khả năng phân giải photphát của 10 chủng trong các nồng độ muối

Qua nhiều thực nghiệm, chúng tôi cũng đồng ý quan điểm của Jayandra và cộng sự [3] là, phân tích trực tiếp hàm lượng photpho tan trong dịch nuôi cho kết quả sát với thực tế hơn là đo vòng trong phân giải của chủng trên môi trường thạch đĩa. Kết quả về khả năng phân giải photphát khó tan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ của các chủng trong 6 nồng độ muối khác nhau được biểu thị theo 4 nhóm đã chia ở phần 1.

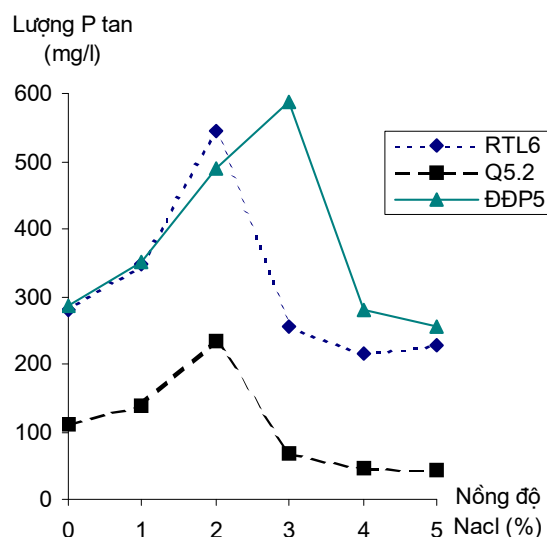
Các số liệu trình bày trên các đồ thị đều là kết quả phân tích hàm lượng photpho tan (mg/l) sau 48 giờ nuôi cấy vi khuẩn. Đây chỉ là những số liệu so sánh giữa các nồng độ muối theo cùng thời điểm, chứ không mang ý nghĩa mức độ phân giải photphát tối đa của từng chủng. Theo những nghiên cứu của chúng tôi cũng như của

một số tác giả [3, 8], thời gian nuôi cấy để đạt mức độ phân giải photphat tối đa của mỗi chủng vi khuẩn rất khác nhau. Từ những kết quả bước đầu trong bài này, có thể đi sâu nghiên cứu động thái phân giải photphat của những chủng chịu muối theo thời gian nuôi cấy. Hình 1, 2, 3 và 4

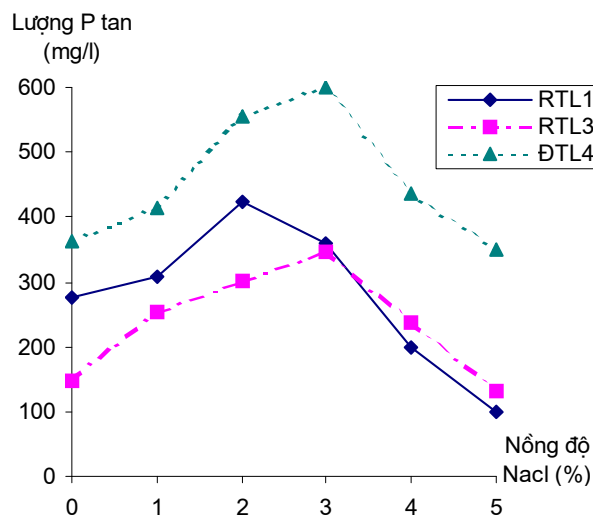
trình bày mức độ phân giải photphat sau 48 giờ nuôi cấy của các chủng thuộc nhóm 1 (nhóm phát triển quần thể tốt trong nồng độ 0% và 1% NaCl), nhóm 2 (trong nồng độ 0, 1%, 2% NaCl), nhóm 3 (trong nồng độ 0%, 1%, 2%, 3% NaCl) và nhóm 4 (trong cả 6 nồng độ).



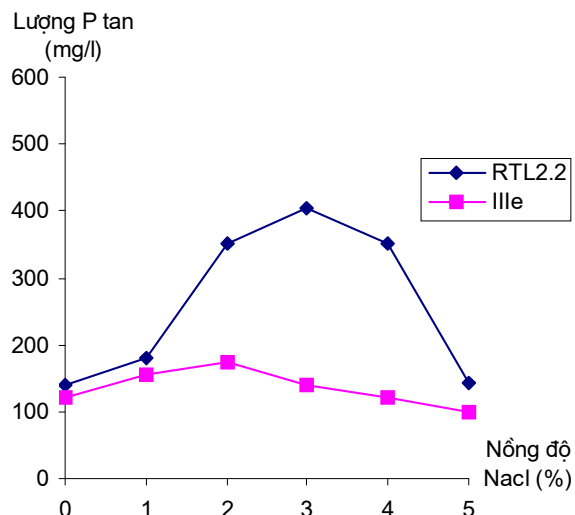
Hình 1. Khả năng phân giải photphat khó tan trong các nồng độ NaCl của nhóm 1



Hình 2. Khả năng phân giải photphat khó tan trong các nồng độ NaCl của nhóm 2



Hình 3. Khả năng phân giải photphat khó tan trong các nồng độ NaCl của nhóm 3



Hình 4. Khả năng phân giải photphat khó tan trong các nồng độ NaCl của nhóm 4

Các dẫn liệu trình bày trên 4 đô thị cho thấy 10 chủng nghiên cứu đều phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ trong cả 6 nồng độ muối không theo khả năng sinh trưởng đã được chia làm 4 nhóm. Có lẽ trong quá trình chuyển sang trạng thái nghỉ (dạng cyst) vi khuẩn vẫn tiết các chất có khả năng phân giải photphát khó tan. Để giải thích cơ chế phân giải photphát của từng chủng, cần có nhiều nghiên cứu sâu hơn. Kapoor [4] đã tổng quan sơ bộ có tới 8 kiểu cơ chế phân giải photphát khó tan nhờ vi sinh vật.

Sau 48 giờ nuôi lác ở 30°C , trong số 10 chủng được nghiên cứu, có 5 chủng thể hiện khả năng phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ cao nhất ở nồng độ 2% NaCl, gồm: ĐTL 2.2, RTL6, Q5.2, RTL1, IIIe. Trong số này, hoạt tính hòa tan photphát cao nhất là các chủng RTL6 544,91 mg/l và chủng ĐTL2.2 480,25 mg/l. Năm chủng còn lại (RTL7, ĐDP5, RTL3, ĐTL4, RTL2.2) có hoạt tính phân giải photphát cao nhất ở nồng độ 3% NaCl. Các chủng có hoạt tính cao nhất là ĐTL4 (600, 46 mg/l) RTL6 (544,91 mg/l) và RTL7 (508,83 mg/l).

Như phần mở đầu đã trình bày, đất canh tác của Việt Nam phần lớn không bị mặn, nhưng cũng có diện tích khá lớn đất nhiễm mặn. Theo thống kê của Viện Quy hoạch thủy lợi Nam Bộ năm 1999 [5], mức độ muối trung bình nhiều năm vào tháng tư của một số vùng thuộc sông Vàm Cỏ Đông và Vàm Cỏ Tây dao động từ 0,41% đến 1,16%; còn độ muối tối đa là 0,69% đến 2,33%. Với những nghiên cứu đầu tiên về ảnh hưởng của độ muối lên sinh trưởng và khả năng phân giải photphát của 10 chủng vi khuẩn này, chúng tôi sẽ có cơ sở khoa học để sử dụng chúng hợp lý cho các vùng sinh thái đất.

III. KẾT LUẬN

Đã nghiên cứu ảnh hưởng của các nồng độ NaCl (0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%) lên sự phát triển và khả năng phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ của 10 chủng vi khuẩn trong điều kiện nuôi lác sau 48 giờ.

Dựa vào mật độ tế bào trong dịch nuôi, đã chia ra 4 nhóm: nhóm 1 gồm 2 chủng RTL7, ĐTL2.2 phát triển tốt trong nồng độ 0% và 1% NaCl; nhóm 2 gồm 3 chủng RTL6, Q5.2, ĐDP5,

phát triển tốt trong nồng độ 0%, 1%, 2%; nhóm 3 gồm 3 chủng RTL1, RTL3, ĐTL4 phát triển tốt trong các nồng độ 0%, 1%, 2%, 3%; nhóm 4 gồm 2 chủng RTL2 và IIIe phát triển tốt trong cả 6 nồng độ NaCl.

Cả 10 chủng đều thể hiện khả năng phân giải photphát sau 48 giờ nuôi cấy. Năm chủng thể hiện khả năng phân giải $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ cao nhất ở nồng độ 2% NaCl, gồm: ĐTL 2.2, RTL6, Q5.2, RTL1, IIIe. Năm chủng còn lại (RTL7, ĐDP5, RTL3, ĐTL4, RTL2.2) có hoạt tính phân giải photphát cao nhất ở nồng độ 3% NaCl.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Babenko Iu. S. et al.**, 1984: Microbiologia, **53**: 533-539 (tiếng Nga).
2. **Egorov N. X.**, 1983: Thực tập Vi sinh vật học. NXB Đại học và Trung học chuyên nghiệp, Hà Nội.
3. **Jayandra Kumar Johri, Sanjay Suraige, Chandra Shekhar Nautiyal**, 1999: Current Microbiology, **39**: 89-93.
4. **Kapoor K. K.**, 1996: Phosphate mobilization through soil microorganisms. In: "Plant microbe interactin in sustainable agriculture". Eds: R.K. Behl; A.L. Khurane; R.C. Dogra; CCSHAU, Hisar and MMB. New Delhi, 46-60.
5. **Lê Huy Bá, Lâm Minh Triết**, 2000: Sinh thái môi trường ứng dụng. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
6. **Lowry O. H., Lopes J. A.**, 1978: Thực tập lớn về sinh lý thực vật. NXB Trường Cao Đẳng, Matxcova, 119-120 (tiếng Nga).
7. **Nautiyal C. S. et al.**, 2000: FEMS Microbiol. Lett. **182** (2): 291-296.
8. **Nguyễn Thị Phương Chi, Phạm Thanh Hà, Nguyễn Thị Quỳnh Mai**, 2000: Ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng lên khả năng phân giải các hợp chất photphat khó tan của một số chủng vi sinh vật. Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong sinh học: 18-22. NXB Đại học Quốc gia, Hà Nội,.
9. **Phạm Văn Toàn**, 2000: Báo cáo tổng kết đề tài KHCN. 02.06b.

THE SALT- TOLERANCE OF SOME PHOSPHATE-SOLUBILIZING BACTERIA STRAINS

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

SUMMARY

The reproduction and the phosphate-solubilizing ability of ten bacterial strains in different NaCl concentrations (0 %, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%) have been studied. The experiments carried out under shaking condition (180 rpm.) for 48 h at 30°C.

Based on the cell densities of cultured broth, we divided 10 strains into 4 groups. The group 1 (well reproductive in the 0% and 1% NaCl mediums) consisted of two strains RTL7, DTL2.2. The group 2 (well reproductive in the 0%, 1%, 2% NaCl mediums) consisted of three strains: RLT6, Q5.2, DDP5. The group 3 (well reproductive in the 0%, 1%, 2%, 3% NaCl mediums) consisted of three strains RTL1, RTL3, DTL4. The group 4 was well reproductive in all 6 different NaCl concentrations.

All ten bacterial strains showed the phosphate- solubilizing ability after 48 hours incubating. Five strains had the highest phosphate-solubilizing ability in the presence of 2% salt (NaCl). They were DTL2.2, RTL6, Q5.2, RTL1 and IIIe strains. Five rest strains solubilized most tricalcium phosphate in the presence of 3% NaCl.

Ngày nhận bài: 13-6-2002