

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI SINH VẬT PHÂN GIẢI LÂN KHÓ TIÊU DẠNG PHOSPHAT SẮT VÀ PHOSPHAT NHÔM TRONG ĐẤT BAZAN VÀ ĐẤT PHÈN

Trần Thị Lua¹

TÓM TẮT

Nguồn nguyên liệu chính để sản xuất phân lân cung cấp cho đất là các loại đá phosphate, hiện nay đang bị suy nhanh chóng và sẽ bị cạn kiệt trong vòng 100 năm tới (Christen 2007). Một số nghiên cứu gần đây dự báo rằng đến giữa thế kỷ 21 sự thiếu hụt lân sẽ là yếu tố quan trọng hàng đầu đe dọa an ninh lương thực toàn cầu. Vì thế “*Phân lập, tuyển chọn các chủng vi sinh vật phân giải lân khó tiêu dạng phosphat sắt và photphat nhôm trong đất bazan và đất phèn*” để phục vụ nhu cầu dinh dưỡng của cây trồng là hoàn toàn cần thiết và đáng được quan tâm hiện nay.

Từ 21 chủng vi sinh vật phân lập được từ đất bazan và đất phèn đã chọn ra được 9 chủng vi sinh vật có khả năng phân giải được AlPO_4 và FePO_4 .

Các chủng Al 02; Al 03; Al 6; Al 6.1; Al 10; Fe 1; Fe 3; Fe 7; Fe 12 phân lập được đều có hoạt tính phân giải cao hơn chủng B 14 (chủng đối chứng).

Đã định danh được 5 chủng Fe 7, Fe 12, Al 6.1, Al 03, Al 10. Chủng Al 10 thuộc chi *Burkholderia* sp. Chủng Al 12, Al 03 gần với loài *Burkholderia cepacia* với độ tương đồng là 99,9%. Chủng Al 6.1 gần với loài *Agrobacterium radiobacter* với độ tương đồng 98,7% và chủng Fe 7 gần với loài *Aeromonas salmonicida* với độ tương đồng 98,3%.

Từ khóa: lân; vi khuẩn; P-Al; P-Fe

1. Đặt vấn đề

Lân là một trong ba nguyên tố dinh dưỡng đa lượng có vai trò quan trọng quyết định đến năng suất, chất lượng của cây trồng. Lân cũng là nguyên tố then chốt trong việc hình thành và bảo vệ độ phì nhiêu đất (Bùi Đình Dinh, 1999). Lân trong đất tồn tại ở hai dạng: vô cơ và hữu cơ. Lân vô cơ trong đất có nhiều dạng và mức độ hòa tan khác nhau. Trong một số loại đất như đất bazan và đất phèn có sự cố định chặt lân tạo thành các hợp chất lân khó tan là phosphat sắt và phosphat nhôm. Đây là nhóm chiếm ưu thế chiếm từ 90-95% (cây trồng cạn không thể sử dụng được), nhóm phosphat canxi thấp (trên đất chua, pH ≤ 5 không có lân ở dạng này), từ 5-10%, nhóm phosphat hoà tan hầu như không đáng kể, chỉ chiếm từ 0 đến 5% trong tổng số lân vô cơ. Do vậy dù trong đất có lân tổng số khá hoặc giàu nhưng lân dễ tiêu lại rất nghèo (Võ Đình Quang, 1999).

Nguồn nguyên liệu chính để sản xuất phân lân cung cấp cho đất là các loại đá phosphate, hiện nay đang bị suy nhanh chóng và sẽ bị cạn kiệt trong vòng 100 năm tới (Christen 2007). Một số nghiên cứu gần đây dự báo rằng đến giữa thế kỷ 21 sự thiếu hụt lân sẽ là yếu tố quan trọng hàng đầu đe dọa an ninh lương thực toàn cầu. Vì thế “*Phân lập, tuyển chọn các chủng vi sinh vật phân giải lân khó tiêu dạng phosphat sắt và photphat nhôm trong đất bazan và đất phèn*” để

¹ Viện Thổ nhưỡng Nông hóa

phục vụ nhu cầu dinh dưỡng của cây trồng là hoàn toàn cần thiết và đáng được quan tâm hiện nay.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu:

Mẫu đất bazan trồng cà phê, cao su, mía, cam, ngô tại Nghĩa Đàn, Nghệ An. Mẫu đất phèn trồng lúa Kiến An, Hải phòng. Hóa chất và dụng cụ cần thiết sử dụng trong nuôi cấy và đánh giá hoạt tính phân giải hợp chất photphat sắt, photphat nhôm của các chủng vsv. Các môi trường Gerresen, Piko sử dụng trong nuôi cấy vsv.

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

- Kiểm tra mật độ vsv theo phương pháp Koch.
- Xác định ảnh hưởng của một số nguồn đường và đạm khác nhau đến sự sinh trưởng của vsv.

- Xác định khả năng phân giải lân của các chủng vi sinh vật theo TCVN 8559: 2010, so màu vàng Vanadat – molipdat bước sóng 430 nm: Trong môi trường Gerresen thay nguồn dinh dưỡng $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ bằng FePO_4 hoặc AlPO_4 với lượng như nhau, khử trùng 15 phút ở 1 at. Đo lượng lân dễ tiêu trong dung dịch để làm đối chứng. Các chủng vi sinh vật phân lập được nuôi cấy lắc ở máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút, đo lượng lân dễ tiêu trong dung dịch trên sau 2, 3, 5, 7 ngày.

- Phân loại các chủng vi khuẩn gram âm bằng bộ định danh sinh hóa API 20 NE của Biomerieux

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập các chủng vi sinh vật phân giải lân

Bảng 1: Các chủng vi sinh vật phân lập được (tháng 5 – tháng 8 năm 2013)

TT	Ký hiệu	Nguồn gốc phân lập	Đặc điểm hình thái	Gram
1	Al 1	Đất lúa Hải Phòng	Trắng đục, tròn nhỏ, mặt nhẵn, khuẩn lạc nhỏ.	-
2	Al 02	Đất trồng cam Nghĩa Đàn	Trắng đục, tròn nhỏ, mặt nhẵn.	-
3	Al 03	Đất lúa Hải Phòng	Trắng đục, khô, mỏng, bám chặt vào môi trường.	-
4	Al 5	Đất trồng cà phê Nghĩa Đàn	Trắng đục, mặt nhẵn, dính sát vào môi trường	-
5	Al 6	Đất lúa Hải Phòng	Trắng đục, khuẩn lạc tròn, mặt nhẵn bóng.	+
6	Al 6.1	Đất lúa Hải Phòng	Vàng ngà, mặt nhẵn bóng, hơi lồi trên mặt thạch.	-
7	Al 10	Đất trồng cam Nghĩa Đàn	Ngà vàng, khuẩn lạc nhẵn bóng, dính.	-
8	Al 17	Đất lúa Hải Phòng	Trắng đục, mặt nhẵn nheo, dính sát vào môi trường	-
9	Fe 1	Đất trồng ngô Nghĩa Đàn	Khuẩn lạc lồi, hơi trong, dễ lấy	-
10	Fe 2	Đất trồng cam Nghĩa Đàn	Khuẩn lạc trắng ngà, mặt hơi lồi, dễ lấy	-
11	Fe 3	Đất trồng cam Nghĩa Đàn	Ngà vàng, khuẩn lạc nhẵn bóng, dính, trong.	-
12	Fe 4	Đất trồng sắn Nghĩa Đàn	Trắng đục, mặt nhẵn nheo, dính sát vào môi trường	+
13	Fe 7	Đất trồng cam Nghĩa Đàn	Ngà vàng, khuẩn lạc nhỏ, nhẵn bóng, dính.	-
14	Fe 8	Đất trồng cam Nghĩa Đàn	Khuẩn lạc màu xám, tròn nhỏ, dễ lấy	-
15	Fe 12	Đất trồng ngô Nghĩa Đàn	Trắng đục, khuẩn lạc tròn, mặt nhẵn bóng.	-

Từ 60 mẫu đất phèn trồng lúa tại huyện Kiến An, tỉnh Hải Phòng và đất bazan trồng cam, ngô, sắn, cà phê, mía tại huyện Nghĩa Đàn, tỉnh Nghệ An đã phân lập được 15 chủng vi sinh vật có khả năng sinh trưởng, phát triển tốt trên môi trường có chứa FePO_4 và AlPO_4 . Kết quả được trình bày tại bảng 1.

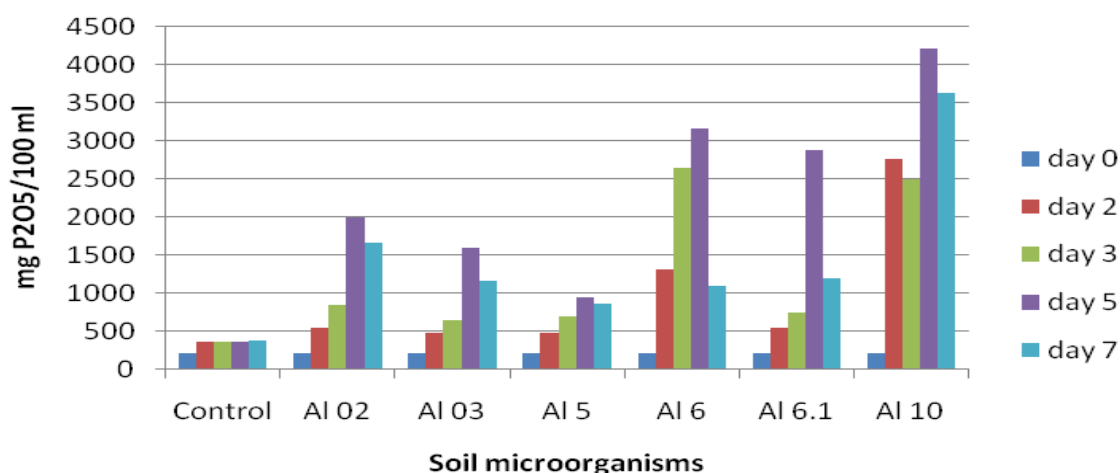
3.2. Tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải lân từ các nguồn FePO_4 , AlPO_4 .

Từ 15 chủng vi sinh vật phân lập được, dựa vào kết quả xác định khả năng lân theo phương pháp so màu vàng Vanadat – molipdat bước sóng 430 nm đã chọn ra được 11 chủng có khả năng phân giải được nguồn FePO_4 , AlPO_4 , 06 chủng phân giải AlPO_4 và 05 chủng phân giải được FePO_4 cao. Kết quả được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2: Khả năng phân giải nguồn FePO_4 , AlPO_4 trong dịch nuôi cấy (tháng 10/2011)

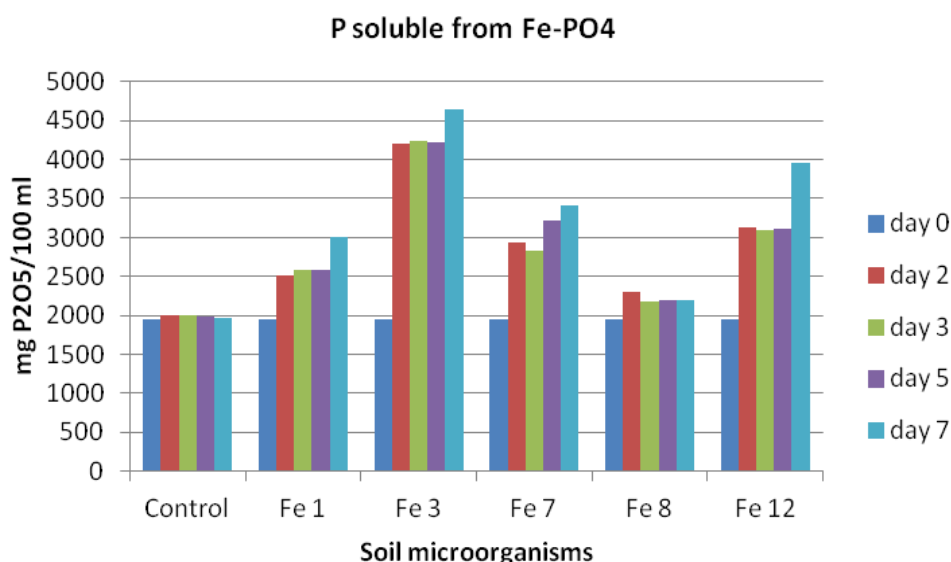
TT	Ký hiệu	mg P_2O_5 /100 ml dung dịch nuôi cấy/ngày					% P_2O_5 dễ tiêu tăng lên so với đối chứng trong dung dịch nuôi cấy
		0	2	3	5	7	
1	ĐC (AlPO_4 + không VSV)	206	206	208	211	215	
2	B14 (VSV đối chứng)	206	357	358	373	391	0.176
3	Al 02	206	542	853	1993	1671	1.778
4	Al 03	206	472	653	1593	1171	1.378
5	Al 5	206	474	699	955	868	0.740
6	Al 6	206	1320	2657	3168	1108	2.953
7	Al 6.1	206	544	756	2886	1207	2.671
8	Al 10	206	2760	2495	4218	3634	4.003
9	ĐC (FePO_4 + không VSV)	1946	1946	1982	1987	1995	
10	B14 (VSV đối chứng)	1946	2010	2031	2032	2015	0.020
11	Fe 1	1946	2520	2618	2618	3057	1.062
12	Fe 3	1946	4213	4283	4255	4693	2.698
13	Fe 7	1946	2928	2872	3253	3465	1.470
14	Fe 8	1946	2308	2223	2237	2251	0.256
15	Fe 12	1946	3126	3126	3154	4015	2.020

P soluble from Al-PO4



Đồ thị 1: Khả năng phân giải lân từ nguồn AlPO_4

Qua bảng 2 và đồ thị 1, 2 cho thấy lượng lân dễ tiêu trong môi trường có nuôi cấy vi sinh vật tăng lên rất cao so với đối chứng. Các chủng Al 02; Al 03; Al 6; Al 6.1; Al 10 phân giải được lân ở dạng AlPO_4 cao hơn so với đối chứng trắng và đối chứng là chủng B 14 (Chủng vi sinh vật phân giải lân có nguồn gốc từ nguồn Quĩ gen vi sinh vật – thuộc bộ môn Vi sinh vật, Viện Thổ nhưỡng Nông hóa cung cấp).



Đồ thị 2: Biểu thị khả năng phân giải lân từ nguồn FePO_4

Qua bảng 2 và đồ thị 2 thấy các chủng Fe 1; Fe 3; Fe 7; Fe 12 cũng là những chủng phân giải được lân ở dạng FePO_4 có hiệu quả cao hơn so với đối chứng trắng và đối chứng là chủng B 14. Lân ở dạng AlPO_4 khó tan trong nước hơn lân ở dạng FePO_4 .

3.3. Nghiên cứu điều kiện nhân sinh khối các chủng vi sinh vật

Vi sinh vật cũng như các loài động thực vật khác, luôn có nhu cầu sử dụng các nguồn dinh dưỡng khác nhau để duy trì các hoạt động sống. Các chất dinh dưỡng đối với vi sinh vật là những chất chúng có thể hấp thu từ môi trường xung quanh và được sử dụng làm nguyên liệu để cung cấp cho quá trình sinh tổng hợp tạo ra các thành phần tế bào hoặc cho các quá trình trao đổi năng lượng. Tuy nhiên không phải mọi thành phần của môi trường nuôi cấy đều được coi là chất dinh dưỡng. Môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng rất lớn đến sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật. Khi thành phần môi trường không đủ cho vi sinh vật sinh trưởng và phát triển thì tốc độ nhân sinh khối sẽ giảm mạnh. Như vậy, tùy theo nhu cầu của vi sinh vật mà cần chọn ra những môi trường có thành phần phù hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của chúng.

3.3.1. Ảnh hưởng của các nguồn đường đến sự phát triển của các chủng vi sinh vật

Trên cơ sở môi trường phân lập thay thế các nguồn đường khác nhau, đánh giá khả năng sinh trưởng của các chủng vi sinh vật. Ảnh hưởng của các nguồn đường đến sự sinh trưởng, phát triển của các chủng vi sinh vật được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3: Ảnh hưởng của các nguồn đường đến sự phát triển của vi sinh vật (tháng 11/2011)

Chủng vi sinh vật	Nguồn đường/mật độ tế bào (CFU/ml)				
	Glucoza	Saccaroza	Manitol	Maltoza	Fructoza
Al 02	$4,44 \times 10^8$	$3,44 \times 10^7$	$5,02 \times 10^6$	$4,37 \times 10^6$	$4,20 \times 10^8$
Al 03	$1,42 \times 10^8$	$1,12 \times 10^6$	$1,34 \times 10^7$	$1,75 \times 10^7$	$3,50 \times 10^8$
Al 6	$1,85 \times 10^8$	$1,80 \times 10^7$	$2,30 \times 10^7$	$3,65 \times 10^7$	$2,68 \times 10^8$
Al 6.1	$1,16 \times 10^9$	$4,36 \times 10^8$	$3,12 \times 10^8$	$1,56 \times 10^7$	$1,10 \times 10^9$
Al 10	$4,02 \times 10^9$	$1,75 \times 10^7$	$3,50 \times 10^8$	$2,30 \times 10^8$	$1,85 \times 10^9$
Fe 1	$1,24 \times 10^8$	$3,65 \times 10^7$	$2,68 \times 10^8$	$1,90 \times 10^7$	$1,53 \times 10^9$
Fe 3	$2,30 \times 10^8$	$1,56 \times 10^7$	$1,10 \times 10^7$	$1,12 \times 10^6$	$8,34 \times 10^7$
Fe 7	$3,62 \times 10^8$	$2,30 \times 10^8$	$1,85 \times 10^8$	$1,80 \times 10^7$	$6,30 \times 10^7$
Fe 12	$1,24 \times 10^8$	$1,16 \times 10^7$	$4,36 \times 10^7$	$4,36 \times 10^6$	$3,12 \times 10^8$

Bảng 3 cho thấy đa số các chủng vi sinh vật đều sinh trưởng và phát triển tốt trong môi trường có nguồn đường là glucoza và fructoza, mật độ các chủng vi sinh vật đạt cao nhất trong môi trường có nguồn đường này và cao hơn trong môi trường có chứa nguồn đường là saccaroza, manitol, maltoza. Mật độ các chủng vi sinh vật thấp nhất khi sử dụng môi trường có chứa maltoza. Chủng Fe 7 sử dụng các nguồn đường là glucoza, saccaroza, manitol.

3.3.2. Ảnh hưởng của các nguồn đạm đến sự phát triển của vi sinh vật

Các nguồn đạm được sử dụng trong môi trường để thay thế cho cao nấm men là peptol, NH_4NO_3 , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ đây là các nguồn đạm dễ kiếm và thường được sử dụng trong nuôi cấy vi sinh vật. Ảnh hưởng của các nguồn đạm đến sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4: Ảnh hưởng của các nguồn đạm đến sinh trưởng phát triển của VSV vật.

Chủng vi sinh vật	Nguồn đạm/mật độ tế bào (CFU/ml)			
	Peptol	NH_4NO_3	NaNO_3	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Al 02	$1,34 \times 10^9$	$1,75 \times 10^8$	$3,50 \times 10^7$	$2,30 \times 10^8$
Al 03	$2,30 \times 10^9$	$3,65 \times 10^8$	$2,68 \times 10^7$	$1,16 \times 10^8$
Al 6	$3,12 \times 10^8$	$1,56 \times 10^8$	$1,10 \times 10^7$	$1,80 \times 10^8$
Al 6.1	$1,56 \times 10^9$	$1,10 \times 10^8$	$4,02 \times 10^7$	$1,75 \times 10^9$
Al 10	$2,30 \times 10^9$	$1,85 \times 10^8$	$1,24 \times 10^7$	$3,65 \times 10^9$
Fe 1	$1,16 \times 10^8$	$4,36 \times 10^8$	$1,80 \times 10^7$	$2,30 \times 10^9$
Fe 3	$1,80 \times 10^8$	$2,30 \times 10^8$	$4,36 \times 10^8$	$3,12 \times 10^8$
Fe 7	$4,36 \times 10^8$	$3,12 \times 10^8$	$1,90 \times 10^7$	$1,53 \times 10^8$
Fe 12	$1,42 \times 10^8$	$1,12 \times 10^8$	$1,12 \times 10^7$	$8,34 \times 10^8$

Các vi sinh vật đều sử dụng tốt nguồn dinh dưỡng đạm là peptol, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 hơn nguồn đạm là NaNO_3 . Khi vi sinh vật sử dụng nguồn đạm là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ thì pH của môi trường thường bị giảm. Khi vi sinh vật sử dụng các nguồn đạm là NO_3^- thì pH của môi trường được nâng cao.

3.4. Phân loại các chủng vi sinh vật được lựa chọn.

Kết quả phân loại các chủng vi khuẩn gram âm theo bộ định danh sinh hóa API 20 NE của Biomerieux cho thấy:

1. Chủng Fe 7-4 gần với loài *Aremonas salmonicida* với độ tương đồng là 98,3%
2. Chủng Al 03-4 gần với loài *Burkholderia cepacia* với độ tương đồng là 99,9%
3. Chủng 12-5 gần với loài *Burkholderia cepacia* với độ tương đồng là 99,9%
4. Chủng Al 14-5 thuộc chi *Burkholderia* sp.
5. Chủng Al 6.1 gần với loài *Agrobacterium radiobacter* với độ tương đồng là 98,7%

Kết luận

Từ 21 chủng vi sinh vật phân lập được từ đất bazan và đất phèn đã chọn ra được 9 chủng vi sinh vật có khả năng phân giải được AlPO_4 và FePO_4 .

Các chủng Al 02; Al 03; Al 6; Al 6.1; Al 10; Fe 1; Fe 3; Fe 7; Fe 12 phân lập được đều có hoạt tính phân giải cao hơn chủng B 14 (chủng đối chứng).

Đã định danh được 5 chủng Fe 7, Fe 12, Al 6.1, Al 03, Al 10. Chủng Al 10 thuộc chi *Burkholderia* sp. Chủng Al 12, Al 03 gần với loài *Burkholderia cepacia* với độ tương đồng là 99,9%. Chủng Al 6.1 gần với loài *Agrobacterium radiobacter* với độ tương đồng 98,7% và chủng Fe 7 gần với loài *Aremonas salmonicida* với độ tương đồng 98,3%

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đoàn Chiến Thắng, 2010 - Nghiên cứu phân lập và tuyển chọn vi sinh vật phân giải phosphate khó tan trên đất bazan nâu đỏ ở Đắk Lak. Đề tài nghiên cứu - Trường Đại học Tây Nguyên.
2. Fox, R., N. B. Comerford and W. W. Mcfee. 199- Phosphorus and aluminium release from a spodic horizon mediated by organic acids - Soil Sci. Soc. Am. J. 1763-1767.
3. Ghaderi, A., N. Aliasgharzad, S. Oustan and P. A. Olsson. 2008 - Efficiency of three *Pseudomonas* isolates in releasing phosphate from an artificial variable-charge mineral (iron III hydroxide) - Soil Environ. 71-76.
4. Khan, M. S., A. Zaidi and P. A. Wani. 2007 - Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review - Agron. Sustain. Dev. 29-43.
5. Stephen, J. and M. S. Jisha, 2009 - Buffering reduces phosphate solubilizing ability of selected strains of bacteria - World J. Agric. Sci. 135-137

SUMMARY

ISOLATION AND SELECTION OF INSOLUBLE P-AL AND P-FE DECOMPOSING MICROORGANISMS SPECIES IN BAZANLTIC AND ACID SULPHATE SOIL

Tran Thi Lua²

P is key element in forming and protecting soil fertility. Main source for producing P fertilizer is phosphate rocks that are rapidly shortened and will be depleted within coming 100 years. P in soil is in form of ortho phosphoric acid (H_3PO_4). In basaltic and acid sulphate soil areas when P is applied which high level but effects is not as expected even it is harmful for plants because of high mobile Fe and Al level in acid soil areas. Fe and Al in low pH condition will closely combine with P to create Fe and Al phosphate (occupy 60 – 80% mineral P total) that plant can not use. However, many bacteria exist in soil to decompose P. Insoluble and fixative P in soil will be decomposed by bacteria into available P and provide for plant. Microorganism biomass assimilates P and protecting it from absorbing or closely fixing.

Isolation and selection insoluble P – Al and P - Fe decomposing microorganism species in basaltic and acid sulfate soil to supply nutrient for plant is very essential in current time. From basaltic and acid sulfate soil, 9 species that are able to decompose $AlPO_4$ and $FePO_4$ have been selected. Species Al 02, Al 03, Al 06, Al 6.1, Al 10, Fe 1, Fe 3, Fe7, Fe 12 that are more active in decomposing than that of 14 (control species). Fe7, Fe 12, Al 6.1, Al 03, Al 10 were determined. They belong to *Burkholderia* sp. Al 12, Al 03 are close to *Burkholderia cepacia* (99,9 %). Al 6.1 is close to *Agrobacterium radiobacter* (98,7 %). Fe 7 is close to *Aeromonas salmonicida* (98,3 %).

Keywords: Phosphate; bacteria; P-Al; P-Fe.

² Soils and Fertilizer Research Institute