

KHẢ NĂNG HÒA TAN PHOSPHATE KHÓ TAN CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP PHÂN LẬP TỪ MẪU ĐẤT TRỒNG LÚA VÙNG VEN BIỂN GIAO THỦY- NAM ĐỊNH

Đỗ Thị Liên¹, Cung Thị Ngọc Mai¹, Đỗ Thị Tố Uyên¹, Vương Thị Nga¹,
 Nghiêm Thị Hà Liên², Trần Thị Mai¹, Lê Thị Nhi Công¹

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Vật lý, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Việc sử dụng phân bón vi sinh đã và đang được quan tâm vì phân bón vi sinh không những giúp nâng cao năng suất, cải thiện chất lượng nông sản mà còn thân thiện với môi trường, đặc biệt là trong điều kiện đất nhiễm mặn, nhiễm phèn đang gia tăng do biến đổi khí hậu. Trong nghiên cứu này 13 chủng vi khuẩn tía quang hợp (VKTQH) được phân lập từ ruộng lúa vùng ven biển Giao Thủy, Nam Định. Các chủng phân lập được đều có khả năng sinh trưởng và có hoạt tính hòa tan 3 hợp chất P dạng khó tan như: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 , và FePO_4 . Trong điều kiện vi hiếu khí, có ánh sáng, 13 chủng phân lập có khả năng hòa tan phosphate dạng $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ dao động từ 12,8- 85,8 mg/L, dạng AlPO_4 dao động từ 8,8 - 75,5 mg/L dạng FePO_4 dao động từ 15,0 -78,9 mg/L, trong đó có 2 chủng GT₄ và GT₂₁ có khả năng hòa tan 3 hợp chất P dạng khó tan cao nhất. Khuẩn lạc của chủng GT₄ có hình tròn, bề mặt lồi, rìa phẳng, màu nâu vàng. Dịch huyền phù tế bào có màu nâu đỏ. Tế bào của chủng này có hình ovan, kích thước 0,086 x 0,915 μm , sinh sản bằng cách nhân đôi. Khuẩn lạc của chủng GT₂₁ không tròn, bề mặt lồi, bóng, rìa trong màu nâu đậm. Dịch huyền phù tế bào có màu đỏ nâu. Tế bào của chủng này có hình xoắn dài kích thước chiều dài 3,5-5,21 μm , chiều rộng 0,3-0,5 μm . Cả hai chủng đều không quan sát thấy "giọt" lưu huỳnh tích lũy trong tế bào và đều là vi khuẩn Gram (-). Phổ hấp thụ dịch huyền phù tế bào của 2 chủng có cực đại nằm trong vùng 800 - 900 nm, đặc trưng cho *Bacteriochlorophyll a*. Từ các đặc điểm sinh học cơ bản của 2 chủng VKTQH GT₄ và GT₂₁ như hình dạng tế bào, hình thức sinh sản, sắc tố quang hợp và kết quả phân tích trình tự nucleotide của gene 16S-rDNA, có thể cho rằng chủng GT₄ thuộc loài *Rhodobacter sphaeroides*, chủng GT₂₁ thuộc chi *Rhodospirillum*.

Từ khóa: Phân bón vi sinh, phosphate khó tan, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodospirillum*, vi khuẩn tía quang hợp.

MỞ ĐẦU

Phosphorus (P) là chất dinh dưỡng đa lượng ảnh hưởng đến sinh trưởng của thực vật lớn thứ hai sau N. Phosphorus đóng vai trò quan trọng trong tất cả những tiến trình cũng như hoạt động sinh lý, sinh hóa và chuyển hóa vật chất trong cây như: sự phân chia tế bào, phát triển hệ thống rễ, sử dụng nguồn carbohydrates, quang hợp, chuyển hóa năng lượng, sinh tổng hợp tế bào, hô hấp (Khan *et al.*, 2010). Cây trồng chỉ hấp thu P dạng ion hoà tan (Pi) như: HPO_4^{2-} hoặc H_2PO_4^- (Malboobi *et al.*, 2009). Thế nhưng, trong đất P tồn tại dưới hai dạng là P hữu cơ và P vô cơ. P hữu cơ tồn tại trong xác bã động, thực vật và trong vi sinh vật, thường là các hợp chất chủ yếu như phytin, phospholipid, acid nucleic và các hợp chất hữu cơ khác. P vô cơ trong đất thường ở trong các dạng khoáng như apatit, phosphate sắt, phosphate nhôm và các dạng này khó tan khiến cây trồng không hút được. Ngay cả trong đất giàu P, hầu hết đều ở dạng không hòa tan, và chỉ có một tỷ lệ nhỏ (~ 0,1%phate) khả dụng cho cây trồng (Taurian *et al.*, 2012). Chính vì vậy, để đạt được năng suất cây trồng, người ta thường dùng các dạng phân lân (P) dễ tan để bón cho cây. Tuy nhiên, hiệu quả của phân bón P trên toàn thế giới chỉ đạt khoảng 10 -25% do một tỷ lệ lớn phân lân có thể hòa tan khi bón vào đất dễ dàng bị cố định thành các dạng không hòa tan như calcium monohydrogen dihydrate phosphate ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), calcium monohydrogen phosphate (CaHPO_4) hay calcium orthophosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) và trở nên kém hữu dụng cho cây trồng. Ngoài ra, việc bón quá nhiều P sẽ gây ra ô nhiễm môi trường đất và nước. Để hạn chế những tác động không có lợi của phân bón hóa học đối với môi trường và để tăng hiệu suất sử dụng lân thì việc sử dụng các vi sinh vật chuyển hóa lân bổ sung vào đất là một trong những giải pháp thân thiện với môi trường và hữu hiệu giúp quản lý sự thiếu hụt P trong đất nông nghiệp (Sharma *et al.*, 2013). Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu thành công trong việc sử dụng các nhóm vi sinh vật vùng rễ ứng dụng làm phân bón vi sinh hòa tan phosphate khó tan giúp tăng năng suất cây trồng (Sarkar *et al.*, 2012). Trong các nhóm vi sinh vật vùng rễ thì vi khuẩn tía quang hợp (VKTQH) được quan tâm nghiên cứu, vì đây là nhóm vi khuẩn thủy sinh có khả năng sinh trưởng trong điều kiện kỵ khí bằng cách quang hợp nhưng không thải oxygen như những đối tượng quang dưỡng khác. Nhóm VKTQH có khả năng trao đổi chất rất đa dạng, có thể sinh trưởng được trong điều kiện quang tự dưỡng, quang dị dưỡng, chúng

có khả năng sử dụng đa dạng nguồn carbon trong điều kiện tối và có ánh sáng, trong nhóm này nhiều loài có khả năng loại bỏ sulfide. Chúng còn có khả năng hòa tan phosphate khó tan (Rana *et al.*, 2016), cố định nitrogen phân tử cũng như sản sinh các chất kích thích sinh trưởng như IAA, ALA giúp cây trồng chống chịu lại các điều kiện bất lợi (Sakpirom *et al.*, 2017). Bên cạnh đó, người ta còn quan sát thấy VKTQH có mặt trong các môi trường cực trị về nhiệt độ, pH và độ muối (Sakarika *et al.*, 2020). Vì vậy, sử dụng VKTQH làm phân bón sinh học có tác dụng tăng năng suất và chất lượng sản phẩm cũng như giảm các tác động bất lợi của hạn mặn hay kim loại nặng gây ra, tăng sức đề kháng của cây chống lại sâu bệnh. Sử dụng phân bón VKTQH còn hạn chế được bệnh thối rễ ở lúa do đất nhiễm sulfur vì các VKTQH có khả năng oxy hóa các hợp chất này tới sulfate (Sakarika *et al.*, 2020). Điều quan trọng là ruộng lúa cung cấp các điều kiện thuận lợi cho VKTQH phát triển, đó là môi trường ngập nước thiếu khí và có chứa acetate phân hủy từ rơm rạ và dưới ánh sáng mặt trời. Điều này mang lại cho VKTQH lợi thế về khả năng cạnh tranh đối với các nhóm vi sinh vật khác. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân lập và tuyển chọn các chủng VKTQH có khả năng hòa tan phosphate làm tiền đề ứng dụng VKTQH làm phân bón cho lúa.

NGUYÊN LIỆU PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Đất nông nghiệp chuyên trồng lúa nước (2 vụ/năm), với các mẫu đất và mẫu nước thu thập từ các ruộng lúa nước, ruộng lúa nước nhiễm mặn ven đê biển đã gieo cấy và gieo sạ trong khoảng 1,5 – 2 tháng tại Giao Thủy, Nam Định.

Môi trường phân lập và nuôi cấy VKTQH không lưu huỳnh trong phòng thí nghiệm là môi trường DSMZ 27 bao gồm các thành phần sau: cao nấm men (0,3 g/L), succinate - Na (1 g/L), sodium acetate (0,5 g/L), K_2HPO_4 (1 g/L), KH_2PO_4 (0,5 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,4 g/L), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,05 g/L), NH_4Cl (0,4 g/L), vi lượng cao $SL_6^{(1)}$ (1 mL/L), dung dịch vitamin $B_{12}^{(2)}$ (0,4 mL/L), nước cất (1000 mL), pH (6,8).

Dung dịch vi lượng SL_6 : HCl (25%) 6,5 mL/L; $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 1,5 g/L; H_3BO_3 0,3 g/L; $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,03 g/L; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,2 g/L; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 g/L; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 17 mg/L; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 24 mg/L; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 36 mg/L, H_2O 993 mL.

Dung dịch vitamin B12: 10 mg hòa tan 100 mL nước được khử trùng bằng màng lọc và bổ sung vào môi trường trước khi sử dụng.

Môi trường Pivovskaya's Broth cải tiến để nghiên cứu khả năng hòa tan phosphate: cao nấm men (0,5 g/L), sodium acetate (1,0 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1 g/L), $MnSO_4$ (0,0001 g/L) $FeSO_4$ (0,0001 g/L) vi lượng SL_6 (1 mL/L), dung dịch vitamin B_{12} (0,4 mL/L), nước cất (1000 mL), pH (6,8), sử dụng các nguồn photphat khó tan như: $Ca_3(PO_4)_2$, $AlPO_4$, và $FePO_4$ (5g/L).

Phương pháp nghiên cứu

Làm giàu và phân lập vi khuẩn tia quang hợp không lưu huỳnh

VKTQH không lưu huỳnh trong các mẫu đã được làm giàu bằng cách nuôi tích lũy trong các chai nhựa trong hình trụ có kích thước $\Phi = 5$ cm, $h = 35$ cm. Các chai nhựa này được thiết kế theo kiểu cột Winogradsky có cải tiến. Các mẫu đất ruộng lúa được đưa vào chai với tỷ lệ 9: 1, các mẫu nước đưa vào với tỷ lệ 1:1, sau đó các bình này được làm đầy bằng môi trường DSMZ -27 dạng dịch. Các bình này được đậy kín và ủ dưới ánh sáng đèn sợi đốt cường độ sáng ~5000 lux. Sau khoảng một tuần, các vạch màu từ nâu vàng đến đỏ tím xuất hiện trên thành bình (là biểu hiện sự có mặt sắc tố đặc trưng của VKTQH). Lấy mẫu từ vạch màu rồi tiến hành phân lập trên đĩa petri chứa môi trường thạch DSMZ 27, ủ ở điều kiện kỵ khí (không khí được thay thế bằng khí N_2) với cường độ sáng ~5000 lux từ đèn sợi đốt, sau khoảng 3 - 5 ngày xuất hiện các khuẩn lạc tròn có màu nâu, hồng đến đỏ tím. Các khuẩn lạc này được làm sạch theo phương pháp cấy ria và tiến hành ủ mẫu dưới điều kiện kỵ khí chiếu sáng.

Nuôi cấy vi khuẩn tia quang hợp không lưu huỳnh

VKTQH được nuôi trong ống thủy tinh có nắp đậy cao su hoặc trong các bình thủy tinh hình trụ có thể tích chứa dịch môi trường DSMZ 27. Môi trường trong các bình và các ống thủy tinh được sục khí nitơ qua màng lọc vô trùng thay thế khí oxy trong môi trường sao cho nồng độ oxy hòa tan ~ 0 mg/L. Giống VKTQH được nuôi trong ống thủy tinh $V = 12$ mL chứa môi trường DSMZ 27 ở điều kiện kỵ khí, chiếu sáng và khí sinh trưởng của chúng ở pha log với mật độ tế bào khoảng 10^9 CFU/mL thì được cấy vào bình thí nghiệm khoảng 5 - 10% (v/v) để đạt mật độ ban đầu OD_{800} khoảng 0,1 của các chủng VKTQH.

Đánh giá sinh trưởng các chủng vi khuẩn tia quang hợp không lưu huỳnh

Sinh trưởng của các chủng VKTQH được đánh giá bằng cách xác định độ hấp phụ của dịch huyền phù tế bào tại bước sóng 800 nm (OD_{800}), vì trong tế bào VKTQH bacteriochlorophyll (Bchl) có cực đại hấp thụ ở 800 nm và độ hấp thụ này tỷ lệ với hàm lượng Bchl và do vậy tỷ lệ thuận với sinh khối của tế bào. Các chỉ số này được đo trên máy quang phổ Novaspec II hoặc máy quang phổ UV - 1650PC.

Phương pháp nghiên cứu hệ sắc tố và hình thái của vi khuẩn tía quang hợp: Phổ hấp thụ *Bacteriochlorophyll* ở trong tế bào nguyên được xác định theo phương pháp quang phổ ở vùng 400 - 900 nm trên máy quang phổ Novaspec II (Anh) và máy quang phổ UV - 1650PC (Nhật Bản). Hình thái tế bào được quan sát dưới kính hiển vi quang học OLYMPUS (Nhật Bản).

Khả năng hòa tan phosphate khó tan

Khả năng hòa tan phosphate khó tan được đánh giá bằng cách nuôi chủng vi khuẩn trong môi trường Pikovskaya cải tiến (Liu *et al.*, 2017) có chứa 5 g/L của mỗi loại phosphate khó tan ($Ca_3(PO_4)_2$, $AlPO_4$ và $FePO_4$). Các chủng thử nghiệm được nuôi cấy trong môi trường DSMZ 27 dạng dịch lỏng đạt mật độ 10^9 CFU/mL và được bổ sung vào môi trường với nồng độ 10% (v/v), các bình thí nghiệm được đậy nắp cao su và để ở điều kiện chiếu sáng khoảng 3000 lux, đối chứng chỉ chứa môi trường và không được bổ sung vi khuẩn, trong điều kiện 25 – 35 °C. Sau 7 ngày nuôi cấy, dịch được ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 15 phút thu dịch nổi để đánh giá hàm lượng phosphate hòa tan tạo ra trong môi trường bằng thuốc thử Molipdate.

Phương pháp xác định phosphate dễ tan: Hàm lượng phosphate dễ tan trong môi trường nuôi được xác định theo tiêu chuẩn Việt Nam: TCVN 5256:2009.

Phương pháp tách chiết DNA tổng số: DNA tổng số của các chủng VKTQH được tách chiết theo phương pháp chuẩn thông thường đã được mô tả theo Sambrook và đồng tác giả (2001). Độ tinh khiết và nồng độ nucleotide được xác định bằng máy quang phổ hấp thụ OD_{260} .

Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction)

Gen 16S rDNA của 2 chủng được nhân bản với các cặp mồi tương ứng 27F và 1527 R trong phản ứng PCR có các thành phần sau: thể tích là 25 μ L/mẫu gồm: 2,5 μ L đệm 10x PCR; 2,5 μ L $MgCl_2$ (25 mM); 2 μ L dNTP (2,5 mM); 1 μ L 27F (10 ng); 1 μ L 1527R (10 ng); 2 μ L DNA (~100 ng); 0,25 μ L Taq DNA polymerase (5 U/ μ L); 13,75 μ L H_2O (Mullis *et al.*, 1986).

Chu trình nhiệt để tiến hành phản ứng PCR nhân gen 16S rDNA: 95°C/3 phút; 30 chu kỳ (95°C/30 giây; 50°C/45 giây; 72°C/50 giây); 72°C/8 phút.

Xác định trình tự acid nucleic

Sau khi tinh sạch đoạn gen 16S rDNA, đoạn gen được giải trình tự theo nguyên lý của Sanger, 1977 (Sanger *et al.*, 1977). Sản phẩm PCR đã gắn huỳnh quang được phân tích trên máy xác định trình tự DNA tự động (ABI - Avant Genetic analyzer) với bộ kit của hãng Applied Biosystems tại Viện Nghiên cứu Hệ gen. Các phần mềm BLAST và DNASTar được sử dụng để xử lý trình tự nucleotide.

Phương pháp xử lý thống kê sinh học

Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình của các lần lặp lại thí nghiệm \pm độ lệch chuẩn (Standard Deviation - SD).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân lập vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh

Từ các mẫu nước và bùn thu thập tại các ruộng lúa nước nhiễm mặn sau khi cấy 1,5 – 2 tháng tại Giao Thủy, Nam Định, chúng tôi đã phân lập được 13 chủng VKTQH. Các chủng VKTQH phân lập được có màu sắc, kích thước và hình dáng khuẩn lạc rất đa dạng. Màu sắc khuẩn lạc của chúng chủ yếu là nâu, nâu vàng, nâu đỏ, đỏ tía, đỏ đậm và hồng. Hình thái tế bào của các chủng này cũng rất đa dạng: từ hình que ngắn, hình ovan đến hình cầu. Không quan sát thấy giọt lưu huỳnh bên trong tế bào, chúng sinh sản đa phần theo kiểu phân đôi và nảy chồi. Từ các đặc điểm về hình dạng tế bào và quan sát giọt lưu huỳnh bên trong tế bào chúng tôi thấy 13 chủng phân lập được đều thuộc họ *Rhodospirillaceae* là họ VKTQH không lưu huỳnh.

Kết quả tuyển chọn VKTQH có khả năng hòa tan phosphate khó tan trong điều kiện vi hiếu khí có chiếu sáng

Các chủng phân lập được tiến hành đánh giá khả năng hòa tan phosphate khó tan. Hàm lượng phosphate dễ tan trong dịch nuôi được xác định theo phương pháp hiện màu Molybdate. Sau 7 ngày nuôi cấy, kết quả thu được trình bày trên Bảng 1 và Bảng 2.

Bảng 1. Khả năng sinh trưởng của các chủng VKTQH (OD_{800}) trong môi trường chứa các nguồn phosphate khó tan khác nhau ở điều kiện vi hiếu khí, chiếu sáng

STT	Tên chủng	OD_{800}		
		Nguồn $Ca_3(PO_4)_2$	Nguồn $AlPO_4$	Nguồn $FePO_4$
1	GT ₁	2,08 \pm 0,18	1,98 \pm 0,12	2,00 \pm 0,17
2	GT ₂	2,03 \pm 0,15	2,28 \pm 0,19	2,13 \pm 0,14

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024

3	GT ₂₁	2,32±0,13	2,13±0,60	2,92±0,18
4	GT ₁₁	2,11±0,16	1,95±0,13	2,06±0,27
5	GT ₃	2,25±0,14	2,04±0,21	2,31±0,22
6	GT ₃₁	2,39±0,18	2,05±0,24	2,40±0,27
7	GT ₄	2,43±0,15	2,22±0,23	2,48±0,36
8	GT ₅	2,40±0,18	2,48±0,35	2,35±0,25
9	GT ₆	1,78±0,12	1,78±0,14	2,09±0,22
10	GT ₇	1,64±0,21	1,99±0,24	2,20±0,30
11	GT ₈	2,17±0,19	1,97±0,30	2,07±0,30
12	GT ₉	2,21±0,15	2,07±0,30	2,31±0,25
13	GT ₁₀	2,33±0,30	2,31±0,25	2,53±0,50

Kết quả từ Bảng 1 cho thấy 13 chủng phân lập được đều có khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường Pikovskaya cải tiến có chứa 5 g/L của mỗi loại phosphate khó tan ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 , và FePO_4). Tuy nhiên, tùy từng chủng sinh trưởng khác nhau trên môi trường có chứa nguồn phosphate khó tan khác nhau. Đối với nguồn $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ và FePO_4 hầu như các chủng đều sinh trưởng khá tốt. Riêng nguồn AlPO_4 các chủng phân lập được cũng sinh trưởng khá tốt tuy nhiên, khả năng sinh trưởng trung bình kém hơn đối với nguồn $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ và FePO_4 . Ở điều kiện vi hiếu khí, chiếu sáng ngoài đánh giá khả năng sinh trưởng, các chủng phân lập được xác định khả năng hòa tan phosphate khó tan thành dạng dễ tan cho cây trồng. Kết quả đánh giá được thể hiện trên Bảng 2.

Bảng 2. Hàm lượng phosphate dễ tiêu ($\text{mg P}_2\text{O}_5/\text{L}$) tích lũy trong dịch nuôi của các chủng VKTQH phân lập được trong điều kiện vi hiếu khí có chiếu sáng

STT	Tên chủng	$\text{mg P}_2\text{O}_5/\text{L}$		
		Nguồn $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Nguồn AlPO_4	Nguồn FePO_4
1	GT ₁	12,08±1,2	8,8±2,0	15,0±2,5
2	GT ₂	44,2±2,5	20,0±1,9	45,5±3,1
3	GT ₂₁	85,8±3,1	60,7±2,4	62,3±3,2
4	GT ₁₁	38,4±3,6	60,0±2,5	38,4±2,5
5	GT ₃	15,4±2,4	12,8±2,3	15,3±2,6
6	GT ₃₁	32,5±2,3	23,7±2,1	60,8±2,2
7	GT ₄	77,1±2,2	75,5±3,4	78,9±3,1
8	GT ₅	72,6±2,5	26,3±2,5	60,4±2,3
9	GT ₆	32,3±3,6	21,4±2,1	35,7±2,4
10	GT ₇	17,9±2,1	11,2±1,1	18,9±2,2
11	GT ₈	18,7±2,3	15,7±2,2	16,6±2,1
12	GT ₉	15,3±2,4	16,3±2,5	22,1±2,4
13	GT ₁₀	51,4±3,8	35,7±3,4	75,0±4,6

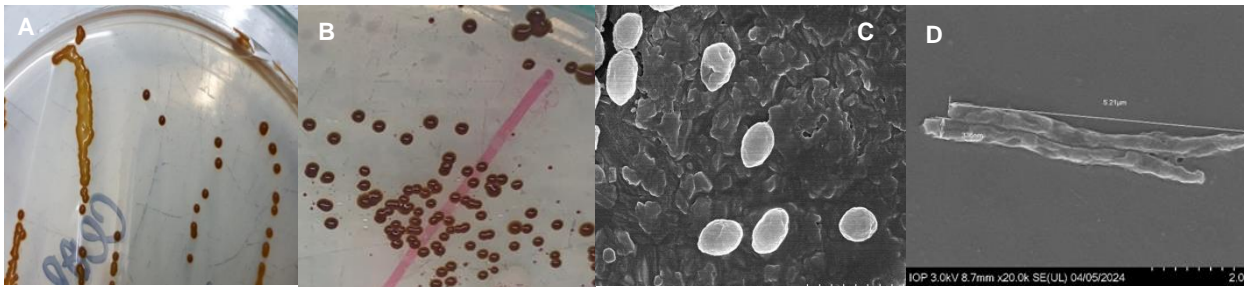
Kết quả cho thấy 13 chủng VKTQH đều có khả năng sinh trưởng và hòa tan các dạng lân khó tan như $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 , và FePO_4 , tuy nhiên, khả năng hòa tan phosphate ở mỗi chủng khác nhau. Trong điều kiện vi hiếu khí, sáng, các chủng sàng lọc có khả năng hòa tan phosphate dạng $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ dao động từ 12,8±1,2 đến 85,8±3,1 mg/L, dạng AlPO_4 dao động từ 8,8±2,0 đến 75,5±3,4 mg/L, dạng FePO_4 dao động từ 15,0±2,5 đến 78,9±3,1 mg/L. Trong số 13 chủng sàng lọc, các chủng hòa tan lân dạng $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ trong môi trường nuôi cấy Pikovskaya cải tiến dạng lỏng là cao nhất, kể đến là nghiệm thức chứa nguồn lân dạng FePO_4 và hòa tan kém hơn là nghiệm thức chứa nguồn AlPO_4 . Điều này có thể giải thích là do hai nguồn FePO_4 và AlPO_4 có cấu trúc phức tạp hơn nhiều so với nguồn lân $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Mendes *et al.*, 2014). Nhiều nghiên cứu công bố vi sinh vật thể hiện khả năng hòa tan lân thấp hơn trong môi trường chứa AlPO_4 và FePO_4 . Mặc dù khả năng hòa tan 2 dạng lân ở 2 dạng AlPO_4 và FePO_4 thấp hơn dạng $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ nhưng kết quả này cho thấy vi khuẩn tía có khả năng hòa tan được 2 dạng khó tan trong đất đặc biệt là vùng đất phèn nơi lân tồn tại dạng khó tan là AlPO_4 và FePO_4 . Khả năng hòa tan lân dạng $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ của các chủng phân lập được tương đương với khả năng hòa tan lân của chủng *Rhodospseudomonas* sp. KL9 do nhóm tác

giả Koh và Song (2007) công bố. Tuy nhiên, các chủng phân lập được hòa tan các dạng lân khó tan thấp hơn so với các chủng có khả năng chống chịu acid phân lập tại Thái Lan do nhóm tác giả Nookongbut và đồng tác giả công bố năm 2019. Trong số 13 chủng sàng lọc thì có các chủng GT₄, GT₂₁ có khả năng hòa tan phosphate cả 3 dạng đều cao nhất và được chúng tôi lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo. Như vậy, các chủng VKTQH phân lập được từ các ruộng lúa nhiễm mặn có khả năng hòa tan các dạng phosphate khó tan, đặc biệt là 2 dạng Al – P và Fe-P. Do đó có thể ứng dụng các chủng này làm phân bón sinh học giúp chuyển hóa các dạng lân khó tan trong đất thành các dạng lân dễ tan cho cây trồng hấp thụ đồng thời cải thiện hiện tượng thiếu hụt lân trong những vùng nhiễm mặn và nhiễm phèn.

Những đặc điểm sinh học cơ bản của các chủng VKTQH không lưu huỳnh được lựa chọn

Hình thái tế bào chủng GT₄: Khuẩn lạc của chủng GT₄ có hình tròn, bề mặt lồi, rìa phẳng, màu nâu vàng, đường kính từ 1,1 - 1,3 mm. Dịch huyền phù tế bào có màu nâu đỏ. Tế bào của chủng này có hình trứng, tồn tại ở dạng đơn bào hoặc có thể tạo chuỗi tế bào, kích thước 0,086 x 0,915 μm, sinh sản bằng cách nhân đôi, không quan sát thấy "giọt" lưu huỳnh tích lũy trong tế bào (Hình 1). Chủng GT₄ là vi khuẩn Gram (-). Các đặc điểm hình thái chủng này tương tự với các loài thuộc chi *Rhodobacter*.

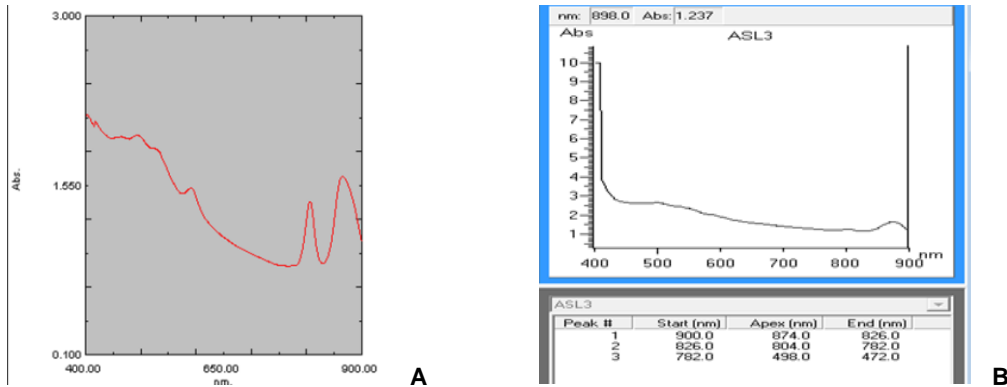
Hình thái tế bào chủng GT₂₁: Khuẩn lạc không tròn, bề mặt lồi, bóng, rìa trong màu nâu đậm d=1,2-1,6 mm. Dịch huyền phù tế bào có màu đỏ nâu. Tế bào của chủng này có dạng hình xoắn dài kích thước chiều dài 3,5-5,21 μm, chiều rộng 0,3-0,5 μm tồn tại ở dạng đơn bào hoặc có thể tạo chuỗi tế bào không quan sát thấy "giọt" lưu huỳnh tích lũy trong tế bào. Chủng GT₂₁ là vi khuẩn Gram (-). Các đặc điểm hình thái chủng này tương tự với các loài thuộc chi *Rhodospirillum*



Hình 1. Hình dạng khuẩn lạc (A), hình dạng tế bào dưới kính hiển vi điện tử JEM (C) của chủng GT₄; Hình dạng khuẩn lạc (B), hình dạng tế bào dưới kính hiển vi điện tử JEM (D) của chủng GT₂₁

Đặc điểm sắc tố quang hợp

Đặc trưng cơ bản nhất để phân biệt VKTQH với các sinh vật quang dưỡng khác là khả năng tổng hợp các loại bacteriochlorophyll (Bchl) khi được chiếu sáng. Hai chủng VKTQH không lưu huỳnh lựa chọn được nuôi cấy kỵ khí, chiếu sáng trong môi trường DSMZ 27 dịch thể. Sau 4 ngày nuôi cấy, các chủng VKTQH không lưu huỳnh đều đạt tới giữa pha sinh trưởng (pha log). Dịch huyền phù tế bào được lấy ra để đo phổ hấp thụ trên máy quang phổ. Kết quả được trình bày ở Hình 2.



Hình 2. Phổ hấp thụ dịch huyền phù tế bào của các chủng lựa chọn (Chú thích; A- Chủng GT₄; B- Chủng GT₂₁)

Kết quả cho thấy, phổ hấp thụ dịch huyền phù tế bào của các chủng có các điểm cực đại khác nhau: Chủng GT₄ có các cực đại tại 447, 476, 506, 588, 800 và 855 nm. Chủng GT₂₁ có cực đại hấp thụ tại bước sóng 782, 804 và 874 nm. Trong vùng phổ 700 - 900 nm, chủng GT₂₁ có cực đại tại bước sóng 804 và 874 nm, chủng GT₄ có cực đại tại 800 và 855 nm. Mặc dù chúng có các điểm cực đại khác nhau nhưng đều ở vùng 800 - 900 nm đặc trưng cho bacteriochlorophyll a. Kết quả này cho thấy cả 2 chủng nghiên cứu đều chứa Bchl a (Plennig & Trueper, 1992).

Xác định trình tự gen 16S - rDNA của các chủng lựa chọn

DNA tổng số của các chủng nghiên cứu được tách chiết và sử dụng đoạn mồi đặc hiệu để khuếch đại gen 16S rDNA. Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR trên bản gel điện di cho thấy chỉ có duy nhất một băng có kích thước khoảng 1500 bp, phù hợp với kích thước của gen 16S rDNA ở vi khuẩn. Sản phẩm PCR trên điện di đồ là một băng DNA duy nhất sáng rõ nét và có kích thước khoảng 1500 bp, kích thước này phù hợp với kích thước của gen 16S rDNA ở vi sinh vật có nhân nguyên thủy. Sản phẩm PCR thu được đủ tiêu chuẩn để tiến hành tinh sạch và đọc trình tự. Kết quả đọc trình tự cho thấy: gen 16S rDNA của các chủng GT₄ và GT₂₁ có kích thước ~1500 bp. Chúng tôi đã tiến hành so sánh mức độ tương đồng của gen 16S- rDNA ở 2 chủng lựa chọn với những kết quả đã công bố trên Ngân hàng gen thế giới (Genbank). Kết quả so sánh được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả so sánh trình tự gen 16S- rDNA của các chủng VKTQH chọn lựa với dữ liệu trên GenBank

Chủng	Tên loài so sánh	Mã số GenBank	% tương đồng
GT ₄	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> strain YL101 16S ribosomal RNA gene,	MG576212.1	99,93
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> strain JA193 16S ribosomal RNA gene	MN605656.1	99,78
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> strain JA192 16S ribosomal RNA gene	MN605655.1	99,78
GT ₂₁	<i>Rhodospirillum centenum</i> SW, complete genome	CP000613.2	99,63
	<i>Rhodocista pekingensis</i> partial 16S rRNA gene, strain JA405	FM177580.11	99,33
	<i>Rhodocista</i> sp. AR2107 partial 16S rRNA gene	AJ401217.1	99,26

Kết quả giải trình tự và phân tích đoạn gen 16S rDNA của 2 chủng vi khuẩn cho thấy đoạn gen 16S rDNA của chủng GT₄ tương đồng cao 99,93% với các đoạn tương ứng của các chủng vi khuẩn thuộc loài *R. sphaeroides* YL101 (MG576212). Chủng GT₂₁ có trình tự gen tương đồng từ 99,93 % so với loài *Rhodospirillum centenum* và tương đồng 99,33% so với loài *Rhodospirillum centenum*. Như vậy, dựa vào hệ thống phân loại của Bergey's (1989, 2005) và từ các đặc điểm sinh học cơ bản của các chủng VKTQH không lưu huỳnh chọn lựa như hình dạng tế bào, hình thức sinh sản, sắc tố quang hợp và kết quả phân tích trình tự nucleotide của gene 16S-rDNA có thể cho rằng chủng GT₄ thuộc loài *Rhodobacter sphaeroides*, chủng GT₂₁ có nhiều đặc điểm giống chi *Rhodospirillum*. Tuy nhiên, để biết chủng GT₂₁ thuộc loài nào thì cần có những nghiên cứu sâu hơn (vì hai loài *Rhodospirillum centenum* và *Rhodospirillum centenum* có nhiều đặc điểm sinh học đặc biệt so với các loài VKTQH). Vì vậy, chúng tôi cho rằng chủng GT₂₁ thuộc chi *Rhodospirillum*.

KẾT LUẬN

Đã phân lập được 13 chủng vi khuẩn tía quang hợp có đặc điểm hình thái khuẩn lạc khác nhau từ các mẫu bùn và đất ruộng lúa thường và ruộng lúa nhiễm mặn ven biển Giao Thủy, Nam Định. Các chủng phân lập được đều có khả năng sinh trưởng và có hoạt tính hòa tan 3 hợp chất P dạng khó tan: Ca₃(PO₄)₂, AlPO₄, và FePO₄, trong đó có 2 chủng GT₄ và GT₂₁ có khả năng hòa tan 3 hợp chất P dạng khó tan cao nhất. Dựa vào hệ thống phân loại của Bergey's (1989 và 2005), các đặc điểm sinh học cơ bản của 2 chủng VKTQH không lưu huỳnh chọn lựa như hình dạng tế bào, hình thức sinh sản, sắc tố quang hợp và kết quả phân tích trình tự nucleotide của gene 16S-rDNA, có thể cho rằng chủng GT₄ thuộc loài *Rhodobacter sphaeroides*, chủng GT₂₁ thuộc chi *Rhodospirillum*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Imhoff JF, Hiraishi A, Suling J (2005). *Anoxygenic phototrophic purple bacteria*. Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. George M. Garrity: 1- 41.

Imhoff JF, Trueper HG (1989). Purple non-sulfur bacteria (Rhodospirillaceae Pfennig and Trueper 197, 17AL), P: 1438-1680. In: Staley JT; Bryant M P; Pfennig N, and Holt JG. (eds.). Bergey' manual of Systematic Bacteriology. Vol. 3. Williams and Wilkins. Baltimore.

Kantachote D, Nunkaew T, Kantha T, Chairapat S (2016) Biofertilizers from Rhodopseudomonas palustris strains to enhance rice yields and reduce methane emissions. *Appl Soil Ecol* 100: 154–161.

Liu M, Liu X, Cheng B, Ma X, Lyu X, Zhao X, Ju Y, Min Z, Fang Y (2017). Selection and evaluation of phosphate-solubilizing bacteria from grapevine rhizospheres for use as biofertilizers. *Span J Agric Res* 14(4):e1106.

Malboobi M A, Owlia P, Behbahani M, Sarokhani E, Moradi S, Yakhchali B, Deljou A, & Morabbi HK (2009). Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(8): 1471-1477.

Mendes GDO, Freitas ALM, Pereira OL, Silva IR, Vassilev NB, Costa MD (2014). Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to differen P sources. *Annals of Microbiology*, 64 (1): 239 -249.

Nookongbut P, Kantachote D, Khương NQ, Sukhoom A, Tantirungkij M, Limtong S (2019). Selection of Acid-Resistant Purple Nonsulfur Bacteria from Peat Swamp Forests to Apply as Biofertilizers and Biocontrol Agents. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*.

Sarkar A, Islam T, Biswas G, Alam S, Hossain M, Talukder N (2012). Screening for phosphate solubilizing bacteria inhabiting the rhizoplane of rice grown in acidic soil in Bangladesh. *Acta Microbiol Immunol Hung* 59(2): 199-213.

- Rana G, Meikap S, Mondol M, and Bose PP (2016). Green-fertilizer, *Rhodospirillum rubrum*, for agricultural development on fly-ash without any toxic metal ion release. *Basic Res J Agric Sci Rev* 5: 109–117
- Sakarika M, Spanoghe J, Sui Y, Wambacq E, Grunert O, Haesaert G, Vlaeminck SE (2020). Purple non sulfur bacteria and plant production: benefits for fertilization, stress resistance and the environment. *Microbial biotechnology* 13 (5):133-1365.
- Sakpirom J, Kantachote D, Nunkaew T, and Khan E (2017). Characterizations of purple non-sulfur bacteria isolated from paddy fields, and identification of strains with potential for plant growth-promotion, greenhouse gas mitigation and heavy metal bioremediation. *Res Microbiol* 168: 1–10.
- Sambrook J, Russell DW (2001). *Molecular cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1997). DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 74, 5463-5467.
- Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus* 2: 565- 587.

ABILITY TO SOLUBILIZE INSOLUBLE PHOSPHATES OF PHOTOSYNTHETIC PURPLE BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM RICE SOIL SAMPLES AT GIAO THUY COAST - NAM DINH

Do Thi Lien¹, Cung Thi Ngoc Mai¹, Do Thi To Uyen¹, Vương Thị Nga¹,
 Nghiem Thi Ha Lien^{2*}, Tran Thi Mai¹, Le Thi Nhi Cong¹

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Institute of Physics, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

The use of microbial fertilizers has been receiving attention because they not only help increase productivity and improve the quality of agricultural products but are also environmentally friendly, especially in saline and acid soil conditions increasing due to climate change. In this study, 13 strains of photosynthetic purple bacteria were isolated from rice fields in the coastal area of Giao Thuy, Nam Dinh. All isolated strains have the ability to grow and solubilize insoluble phosphates such as: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 , and FePO_4 . Under microaerobic, bright condition, 13 isolated strains had the ability to solubilize $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ranging from 12.8 to 85.8 mg/L, AlPO_4 form ranged range from 8.8 to 75.5 mg/L, FePO_4 form ranges from 15.0 to 78.9 mg/L, Among them, strains of GT_4 and GT_{21} were determined to exhibit the highest phosphate solubilisation with 3 insoluble P compounds. Colonies of GT_4 strain were a round shape, convex surface, flat edges, yellow brown color. The cell suspension is reddish brown. Using electron microscope technique shown that, cells of GT_4 strain were ovan with $0.086 \times 0.915 \mu\text{m}$ in size and divided by binary fission. Colonies of strain GT_{21} were not round, the surface was convex, shiny, and the inner was dark brown. The cell suspension is red-brown in color. The cells of this strain have a long spiral shape, measuring $(3.5\text{-}5.21 \mu\text{m} \times 0.3\text{-}0.5 \mu\text{m})$. Photosynthetic pigments were bacteriochlorophyll a in both of them. Globules of elemental sulfur were not invisible inside the cells and are Gram (-) bacteria both of strains. Obtained results of morphological and 16S rDNA gene nucleotide sequences, based on Bergey's systematic of bacteriology (2nd Edition, 2005), it can be assumed that GT_4 strain belongs to the species *Rhodobacter sphaeroides*, GT_{21} strain belongs to the genus *Rhodospirillum*.

Keyword: Insoluble phosphate; Microbial fertilizers; Photosynthetic purple bacteria; *Rhodobacter sphaeroides*; *Rhodospirillum*.

* Author for correspondence: Tel:+84-973161388; Email: lien.ibt@gmail.com