

PHÂN LẬP VÀ NHẬN DIỆN VI KHUẨN HÒA TAN LÂN VÀ KALI TỪ MẪU VẬT LIỆU PHONG HÓA ĐÁ HOA CƯƠNG NÚI SẬP, TỈNH AN GIANG

Nguyễn Thị Don¹, Nguyễn Thị Kiều Diễm² và Cao Ngọc Diệp³

ABSTRACT

*Phosphorus (P) and potassium (K) are two essential nutrients for plant growth but the biggest proportions of P and K in soil are insoluble rocks, minerals and deposits. However, many groups of bacteria in the nature are able to convert insoluble P and K form into soluble ones (P and K), especially those bacteria are capable of dissolving both P and K. The aim of study was isolation of bacteria dissolve P and K strains from weathering material of granite rock of Sap mountain, An Giang province, identify these bacteria by PCR technique. From 9 weathered material samples of granite rock of Sap mountain, An Giang province, twenty-six P- and K-solubilizing bacteria were isolated. Their colonies were round or irregular, white or pale yellow and their cell were rod shape or the short chain and nonmotile or motile. Band of approximately 1500bp were obtained from the amplification of 16srRNA gene from 26 isolates that were identified by PCR technique with specific primers *fd1* and *rP*. After 10 days of incubation in the liquid Aleksandrov medium, 18/26 isolates had phosphate and potassium dissolution capacity were higher than 10mg/l P₂O₅ and 25mg/l K₂O (12/16 isolates). Four isolates had high phosphate and potassium dissolution capacity (>10mg/l P₂O₅ and >30mg/l K₂O) effectively and they were chosen to sequence, DNA sequence were compared with GenBank database of NCBI by BLAST N software. The results showed that NS3 isolate was similarity of 99% with JQ428828 *Bacillus pumilus* strain R71 and JQ320096 *Bacillus altitudinis* strain XjGEB-71; NS6 isolate was 97% similarity with JQ419715 *Bacillus sp.* strain L2276 and JN644556 *Bacillus nealsoni* strain BP11-4A; NS7 isolate was 97% similarity with EF690427 *Brevibacillus formosus* isolate M13-7, HM590701 *Brevibacillus choshinensis* strain MHN5D, NS12 isolate was 99% similarity with HQ670584 *Acinetobacter soli* strain AIMST-PV1.0 and 99% similarity with GQ258635 *Acinetobacter soli* strain SR2.*

Keywords: Granite rock, PCR-16S rRNA, P and K-solubilizing bacteria, Sap mountain, weathered material

Title: Isolation and identification of phosphorus and potassium-solubilizing bacteria from weathered materials in granite rock of Sap mountain, An Giang province

TÓM TẮT

Lân và kali là hai nguyên tố cần thiết cho sự phát triển của cây trồng nhưng phần lớn lượng P và K trong đất ở dạng khó tan, tinh khoáng và cận khoáng. Tuy nhiên nhiều dòng vi khuẩn trong tự nhiên có khả năng chuyển P và K khó tan thành dạng dễ tan, đặc biệt những dòng vi khuẩn này có khả năng hòa tan cả lân và kali. Mục tiêu nghiên cứu của đề tài là phân lập được những dòng vi khuẩn có khả năng hòa tan lân và kali khó tan trong mẫu vật liệu phong hóa đá hoa cương ở Núi Sập, An Giang và nhận diện những dòng vi khuẩn này bằng kỹ thuật PCR. Từ 9 mẫu vật liệu phong hóa của núi đá hoa cương (Núi Sập, An Giang) đã phân lập được 26 dòng vi khuẩn có khả năng hòa tan lân và kali. Phần lớn khuẩn lạc của chúng có dạng tròn hay không đều, màu trắng hoặc vàng nhạt, những dòng vi khuẩn này có dạng que hoặc kết chuỗi ngắn, không chuyển động đến chuyển động. Tất cả các dòng vi khuẩn phân lập cho băng DNA ở vị trí khoảng 1500 bp

khi nhận diện bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu fD1 và rP. Sau 10 ngày nuôi trong môi trường Aleksandrov lỏng, có 18/26 dòng vi khuẩn có khả năng hòa tan trên 10mg/l P_2O_5 , 12/16 dòng vi khuẩn có khả năng hòa tan trên 25mg/l K_2O . Giải trình tự 4 dòng vi khuẩn, sử dụng phần mềm BLAST N để so sánh chúng với trình tự các dòng vi khuẩn có trong ngân hàng gen của NCBI. Kết quả cho thấy dòng NS3 có tỉ lệ đồng hình 99% với JQ428828 *Bacillus pumilus* strain R71 và JQ320096 *Bacillus altitudinis* strain XjGEB-7, dòng NS6 có tỉ lệ đồng hình là 97% với JQ419715 *Bacillus* sp. strain L2276 và JN644556 *Bacillus nealsoni* strain BP11-4A; dòng NS7 có tỉ lệ đồng hình là 97% với EF690427 *Brevibacillus formosus* isolate M13-7 và HM590701 *Brevibacillus choshinensis* strain MHN5D; dòng NS12 có tỉ lệ đồng hình là 99% với HQ670584 *Acinetobacter soli* strain AIMST-PV1.0 và có tỉ lệ đồng hình là 99% với GQ258635 *Acinetobacter soli* strain SR2.

Từ khóa: Đá hoa cương, núi Sập, PCR-16S rRNA, vật liệu phong hóa, vi khuẩn hòa tan lân và kali

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Lân và kali là 2 nguyên tố hóa học đa lượng thiết yếu cho sự sinh trưởng và phát triển của cây trồng. Tuy nhiên, trong đất lượng lân và kali ở dạng hòa tan rất thấp, phần lớn lân và kali tồn tại ở dạng không tan trong đá, muối khoáng và trầm tích (Goldstein, 1994). Tuy nhiên, những dạng lân và kali không tan này lại là nguồn dự trữ lân và kali cho cây, trong điều kiện thích hợp chúng có thể chuyển thành dạng hòa tan và trở nên sẵn sàng cung cấp cho thực vật. Một số công trình nghiên cứu khoa học đã chứng minh vi sinh vật đóng vai trò trọng tâm trong chu trình lân và kali tự nhiên. Các dòng vi khuẩn khác nhau như *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Rhizobium* và *Flavobacterium* có khả năng hòa tan các hợp chất lân vô cơ như tricalcium phosphate, hydroxyapatite và đá phosphate (Goldstein, 1986). Vi khuẩn silicate có khả năng hòa tan các khoáng P, Si, Al vô cơ không tan (Aleksandrov et al, 1967). Bên cạnh đó, theo Rajan *et al.* (1996) sử dụng trực tiếp đá chứa lân và kali có thể có lợi cho nông nghiệp và khả thi cho môi trường hơn lân và kali ở dạng hòa tan. Đá chứa lân và kali là nguồn lân và kali rẻ tiền, nhưng hầu hết chúng không dễ dàng cung cấp cho cây trồng do sự phóng thích khoáng xảy ra chậm (Zapata và Roy, 2004). Tuy nhiên, vi khuẩn hòa tan lân và kali có mật độ đáng kể trong đất và trong vùng rễ cây trồng (Sperberg, 1958), do đó lân và kali dễ dàng trở thành dạng hữu dụng cho cây trồng.

Ở nhiều nước, từ lâu vi khuẩn hòa tan lân và kali được ứng dụng trên sự phát triển của cây trồng, chúng được sử dụng như những chất cải thiện năng suất, chất lượng nông nghiệp và bảo vệ môi trường (Glick, 1995; Sheng *et al.*, 2003; Deng *et al.*, 2003) và là một trong những biện pháp phát triển nông nghiệp bền vững đồng thời góp phần bảo vệ môi trường. Tuy nhiên, ở Việt Nam hiện nay phân bón được sử dụng chủ yếu trong nông nghiệp là phân hóa học, việc lạm dụng nhiều phân bón hóa học đã gây ra những vấn đề về ô nhiễm môi trường, làm đất bị hoang hóa, mất cân bằng dinh dưỡng, mất khả năng canh tác, làm chết vi sinh vật có ích... Vì vậy, để cùng phát triển nông nghiệp bền vững đồng thời bảo vệ môi trường, chúng ta cần đầu tư nhiều hơn cho những nghiên cứu về đặc điểm, khả năng hòa tan lân và kali của vi sinh vật trên đất, đá, vật liệu phong hóa từ đá cũng như môi trường tối ưu để chúng phát triển, từ đó ứng dụng sản xuất những sản phẩm rẻ tiền, dễ sử dụng, dễ bảo quản để thay thế phân bón hóa học. Phân lập, nhận diện được một số dòng vi khuẩn có khả năng hòa tan lân và kali ở mẫu vật liệu phong hóa của núi đá

hoa cương - núi Sập, An Giang và đánh giá khả năng hòa tan lân và kali của các dòng vi khuẩn phân lập được.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Mẫu vật liệu phong hóa được thu từ những bụi cây mọc trên đá (Hình 1). Mỗi mẫu vật liệu (2 g được lấy ngẫu nhiên từ 2kg mẫu) được cho vào bình tam giác 100 mL có chứa sẵn 25 ml môi trường Aleksandrov lỏng (Xiufang *et al.*, 2006) đã được bổ sung 0,2% kaolinite và 0,2% apatite, các bình tam giác được đặt trên máy lắc nằm ngang và lắc ở vận tốc 50 vòng/phút trong suốt 24 giờ ở nhiệt độ 28°C-30°C (nhiệt độ phòng thí nghiệm).

Mẫu được pha loãng 10 lần với nước cất tiệt trùng, nhiều lần suất 10^{-1} , 10^{-2} 10^{-6} ; mỗi lần suất pha loãng được trải trên môi trường Aleksandrov đặc, và được ủ ở 30°C trong 24 giờ.



Hình 1: Mẫu vật liệu phong hóa được thu để phân lập vi khuẩn trong đá hoa cương Núi Sập

Mỗi khuẩn lạc trong các tần suất pha loãng nào riêng rẽ được cấy chuyển sang môi trường Aleksandrov đặc mới đến khi các khuẩn lạc rời, được xem như là 1 chủng (isolate) và cấy trên môi trường Aleksandrov đặc trong các ống nghiệm nắp đen (12x100 mm), trữ ở 4°C và được trữ trong môi trường bổ sung glycerol ở -20°C.

Bảng 1: Đặc tính lý-hóa tính của các mẫu vật liệu phong hóa đá hoa cương Núi Sập, An Giang

pH (H ₂ O)	N _{tổng số} (%)	Lân dễ tiêu mg P ₂ O ₅ /100g	K trao đổi mg K ₂ O/kg	Chất hữu cơ (%)	Cát (%)	Thịt (%)	Sét (%)
7,19	0,19	15,34	133,60	3,02	81,24	5,16	13,60

Nguồn: Mẫu được phân tích tại Phòng thí nghiệm chuyên sâu, Đại học Cần Thơ

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Hòa tan khoáng chất

Lân apatite Lào Cai (chứa 30-40% P tổng số) và Kaolinite (chứa 10% sét Kaolin) thương mại được bổ sung vào trong môi trường Aleksandrov lỏng như là nguồn P và K để đánh giá khả năng hòa tan hai loại khoáng khó tan này. Những chủng vi

khuẩn có khả năng hòa tan P và P cao nhất được tồn trữ để tiếp tục nghiên cứu bước kế tiếp. Để đánh giá khả năng hòa tan P và K, các chủng vi khuẩn được bố trí trong các ống falcon 50-mL chứa 30 ml môi trường Aleksandrov lỏng, các ống này được khử trùng nhiệt ướt ở 121°C trong 15 phút, và được chủng vào 1 ml dịch vi khuẩn (mật số 10^9 tế bào/ml), mỗi chủng (dòng) vi khuẩn lặp lại 3 lần cùng với đối chứng (không chủng vi khuẩn). Các ống falcon được đặt trên máy lắc nằm ngang và được lắc với tốc độ 10 vòng/phút trong 10 ngày ở nhiệt độ 28-30°C (nhiệt độ phòng thí nghiệm). Mẫu được thu tại 2 thời điểm 5 và 10 ngày sau khi chủng và được đo pH, sau đó mẫu được ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 10 phút, phần trong bên trên (supernatant) được sử dụng để đo P hòa tan bằng phương pháp so màu (Oniani)(thời điểm 5 và 10 ngày) và K hòa tan bằng máy hấp thụ nguyên tử (atomic absorption spectrometry)[ở phòng thí nghiệm chuyên sâu, Đại học Cần Thơ]. Trị số trung bình của từng nghiệm thức được ghi nhận và xử lý thống kê (ANOVA), so sánh sự khác biệt nhỏ nhất có ý nghĩa ở 1% hay kiểm định Duncan bằng phần mềm Minitab 16.

Đặc tính khuẩn lạc và quan sát kính hiển vi điện tử

Đặc tính khuẩn lạc như kích thước, màu sắc, hình dạng, độ nổi... hình dạng tế bào được quan sát và chụp hình bằng kính hiển vi điện tử tại phòng thí nghiệm chuyên sâu, Đại học Cần Thơ.

Phân tích sự đa dạng di truyền trên cơ sở trình tự gen 16S rRNA

Vi khuẩn được nhân nuôi trong ống nghiệm chứa môi trường LB (lỏng) để thu sinh khối, DNA vi khuẩn được tách chiết theo quy trình của Neumann *et al.* (1992).

Gen 16S rRNA của các dòng vi khuẩn có hàm lượng P và K hòa tan cao nhất được nhận diện như sau:

Mũi xuôi fD1:5' - AAG AGT TGA TC(CA) TGG CTC AG - 3';

Mũi ngược rP:5'-TAC GG(TC) TAC CTT GTT ACG ACT T-3' (Xiufang *et al.*, 2006)

Phản ứng PCR: 94°C/5'; 30 chu kỳ: (94°C/60", 55°C/50", 72°C/105"); 72°C/10'.

Sử dụng đoạn mũi xuôi trong phản ứng PCR để nhận diện vi khuẩn hòa tan P và K đã mô tả ở phần trên. Sản phẩm PCR được tinh sạch theo kit Invitrogen và giải trình tự bằng hệ thống máy giải trình tự tự động ABI 3130. Sử dụng chương trình BLAST N để so sánh trình tự DNA của các chủng vi khuẩn chọn lọc [có độ hòa tan lân và kali cao] với trình tự DNA của bộ gen ở các loài vi khuẩn trong GenBank và xây dựng cây phả hệ gen giữa các dòng vi khuẩn được giải trình tự bằng phần mềm MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập vi khuẩn và đặc tính khuẩn lạc

26 dòng vi khuẩn được phân lập từ 9 mẫu vật liệu phong hóa trên môi trường Aleksandrov. Chúng phát triển nhanh trên môi trường này từ 36-48 giờ ở 30°C, điều này cho thấy những dòng vi khuẩn này có khả năng hòa tan K và P. Khuẩn lạc đa số có dạng tròn, nhày, bóng loáng, không màu hay màu trắng sữa, cá biệt có vài khuẩn có kích thước khá lớn (Hình 2).



Hình 2: Đặc tính khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn phát triển trên môi trường Aleksandrov đặc

Kết quả của chúng tôi cũng tương tự như kết quả của Xiufang *et al.* (2006) đã thực hiện tại núi Tianmu, Trung Quốc. Tuy nhiên khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn của chúng tôi phát triển nhanh hơn trong môi trường Aleksandrov (2 ngày thay vì 4 ngày như thí nghiệm của Xiufang, *et al.*). Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của vi khuẩn được phân lập từ vật liệu phong hóa của núi đá hoa cương Ba Hòn Kiên Giang (Cao Ngoc Diep *et al.*, 2012).

Cả hai mươi sáu dòng vi khuẩn đều có khả năng hòa tan K và P cao hơn đối chứng tuy nhiên các dòng vi khuẩn hòa tan K cao nhất chỉ trong khoảng 30 đến 48 mg K₂O/l trong khi đó có 4 dòng vi khuẩn hòa tan P khá cao (>40 mg P₂O₅/l) vì vậy chúng tôi chọn 4 dòng vi khuẩn (NS3, NS6, NS7 và NS12) vì tất cả 4 dòng vi khuẩn đều có làm tăng pH môi trường (>6,5) để nhận diện chúng bằng phương pháp giải trình tự.

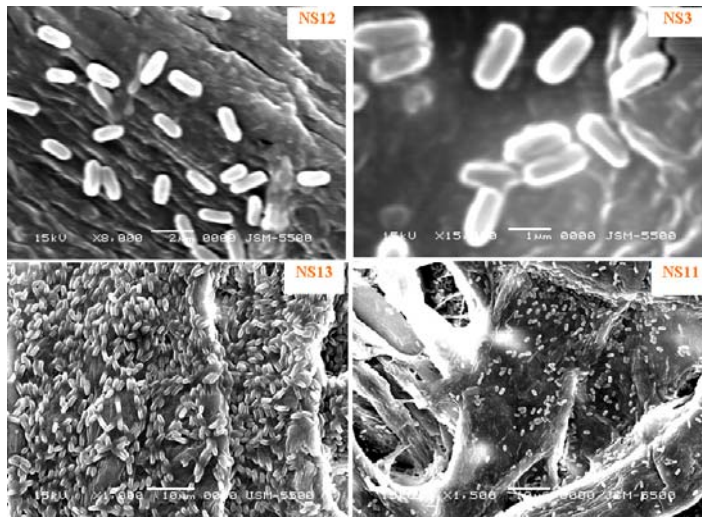
Một số dòng vi khuẩn tiêu biểu được quan sát và chụp hình ở kính hiển vi điện tử quét [phòng thí nghiệm chuyên sâu, Đại học Cần Thơ] Kết quả cho thấy tất cả các dòng vi khuẩn này có dạng hình que ngắn, kích thước khoảng 0,50-0,75 μm x 1,20-1,50 μm, các dòng vi khuẩn này chuyển động rất nhanh (Hình 3).

Bảng 2: Khả năng hòa tan Kali và Lân của 16 dòng vi khuẩn

Tên dòng vi khuẩn	Lượng Kali hòa tan (mg K ₂ O l ⁻¹)	Lượng Lân hòa tan (mg P ₂ O ₅ l ⁻¹)	
		Ngày 5*	Ngày 10*
NS1	25,66e	12,79h	17,51g
NS2	26,0e	30,13e	33,71d
NS3	32,19c	18,71g	22,17f
NS4	28,62d	23,37f	23,27f
NS5	26,07e	30,67e	30,67e
NS6	31,10c	13,57h	17,98g
NS7	48,76a	14,14h	14,37h
NS8	28,59d	63,64a	85,66a
NS9	25,11e	42,25c	21,21f
NS10	19,90f	40,08d	45,50c
NS11	27,49b	60,97b	70,32b
NS12	36,06b	10,97k	16,14g
NS13	33,94c	10,70k	12,67k
NS14	21,04f	11,29k	10,95k
NS15	21,00f	8,67i	16,87g
NS16	21,54f	12,17h	17,74g
Đối chứng	5,18g	2,18l	2,22i
C.V	3,11%		5,87%

* ngày sau khi chủng

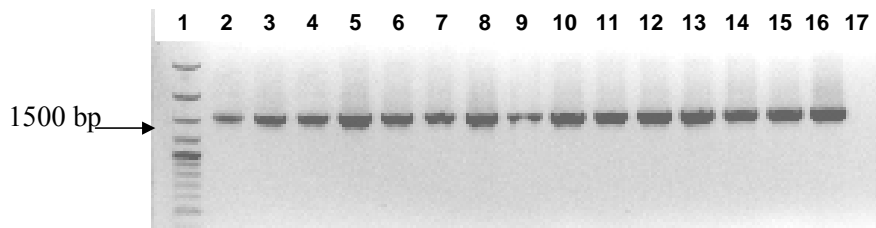
** những số theo sau cùng một chữ không khác biệt ý nghĩa ở mức độ 1%



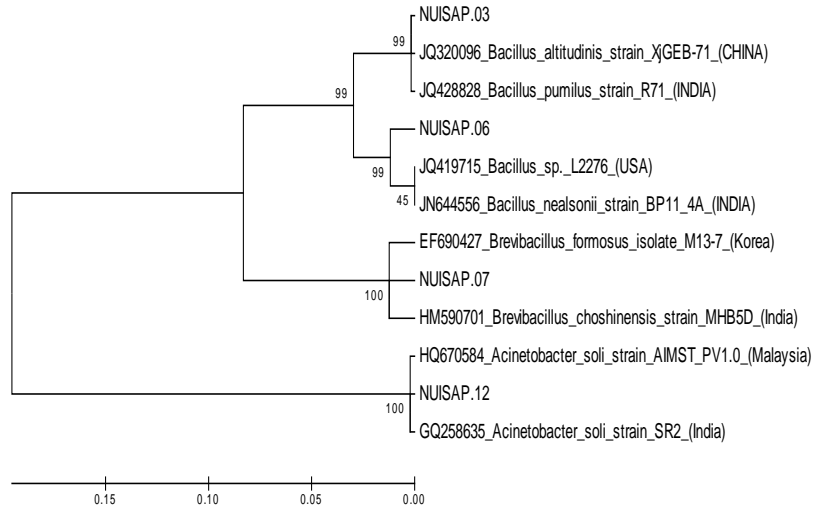
Hình 3: Hình dạng của 4 dòng vi khuẩn được chụp hình ở kính hiển vi điện tử quét

3.2 Nhận diện và phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên giải trình tự gen 16S rRNA

Tất cả 26 dòng vi khuẩn được xác định là vi khuẩn hòa tan K và P vì tất cả phổ điện di sản phẩm PCR đều nằm trong khoảng 1500bp là kết quả từ sự khuếch đại chuỗi trình tự 16S rRNA của các dòng vi khuẩn này (Hình 4), kết quả của chúng tôi phù hợp với kết quả của (Cao Ngoc Diep *et al.*, 2012). khi nhận diện các dòng vi khuẩn có khả năng hòa tan K và P phân lập từ vật liệu phong hóa của núi đá granite Bahon Kiengiang.



Hình 4: Phổ điện di của sản phẩm PCR từ sự nhân DNA của 15 dòng vi khuẩn hòa tan K và P (1: thang chuẩn, 2 – 16 là 15 dòng vi khuẩn và 17: đối chứng)



Hình 5: Cây phả hệ trình bày mối quan hệ giữa các dòng vi khuẩn hòa tan P và K với các dòng vi khuẩn trong ngân hàng dữ liệu NCBI (theo phương pháp Neighbor-joining)

Từ hình 5 cho thấy cây phả hệ phân chia thành 2 nhánh (cluster), nhánh 1 với dòng NUISAP.12 đồng hình với loài *Acinetobacter soli*, đây là các dòng vi khuẩn mà các nhà khoa học tìm thấy chúng sống trong vùng rễ cây cọ dầu và nội sinh trong cây này. Nhánh 2 chia thành 2 nhánh nhỏ với nhánh 2.1 gồm các dòng NUISAP.03 và NUISAP.06 đồng hình với chi *Bacillus*, đây là chi rất phổ biến trong đất trong đó có loài *Bacillus altitudinis* được các nhà khoa học Trung Quốc ở Đại học Nông nghiệp Xiujiang đã xác định là loài vi khuẩn nội sinh trong họ Graminae và nhánh 2.2 gồm dòng NUISAP.07 đồng hình với chi *Brevibacillus* nhất là loài *B. formosus* là vi khuẩn vùng rễ kích thích sự tăng trưởng thực vật (PGPR). Trong các dòng vi khuẩn có khả năng hòa tan P và K được phân lập từ vật liệu phong hóa của đá hoa cương NÚI SẬP đều là những dòng vi khuẩn an toàn không gây bệnh và có ích cho cây trồng; các dòng vi khuẩn đã được phân lập này rất có triển vọng để sản xuất phân bón sinh học cung cấp cho cây trồng trong tương lai gần.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Vật liệu phong hóa của Núi Sập có 26 dòng vi khuẩn được phân lập, các dòng vi khuẩn này đều có khả năng hòa tan cả K và P. Trong đó có bốn dòng có khả năng hòa tan P và K cao nhất và các dòng vi khuẩn này có mức độ đồng hình với các chi *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Acinetobacter soli*. Các dòng vi khuẩn có hiệu quả hòa tan lân và kali cao có triển vọng được sử dụng để sản xuất phân sinh bón học cho cây trồng nhằm cung cấp lân và kali hòa tan.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aleksandrov V.G, R.N. Blagodyr and I.P. Ilev .1967. Liberation of phosphoric acid from apatite by silicate bacteria. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal (Kiev)* .29:111 - 114.
- Cao Ngoc Diep, Nguyen Thi Don and Duong Thi Xuan Dao. 2012. Isolation and identification of phosphate and potassium – solubilizing bacteria from weathered materials of granite brock of BaHon mountain, KienGiang, Vietnam. *International Conference on Enviromental Research and Technology*. 3: 133-138.
- Deng, S.B., R.B. Bai, X.M. Hu and Q. Luo. 2003. Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60:588-593.
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian journal of Microbiology*. 41:109-117.
- Goldstein, A.H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and furture prospects. *American Journal of Alternative Agriculture*. 1:51- 57.
- Goldstein, A.H. 1994. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphate by gram-negative bacteria. In: Torriani-Gorini, A., E. Yagil, S. Silver. *Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology*. Washington, DC. ASM Press:197 - 203
- Neumann, B.A, H. Pospiech and H.U. Schairrer . 1992. Rapid isolation of genomic DNA from Gram – negative bacteria. *Trends Genet*, 8:332 - 333.
- Rajan, S.S.S., J.H. Watkinson and A.G. Sinclair . 1996. Phosphate rock of for direct application to soils. *Adv. Agron*. 57: 77-159.
- Sheng, X.F., Y. He, W.Y. Huang . 2002. The coditions of rekeasing potasium by a silicate-dissolving bacterial strain NBT. *Agr. Sci. China*. 10:662-666.
- Sperberg, J.I. (1958). The incidence of apatite- solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Australian Journal of Agricultural and Resource Economics*. 9:778.
- Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimorcy Methods, 2011. In: *MBE Advance Access published*. (<http://mbe.oxfordjournals.org>)
- Xiufang H, C. Jishuang and G. Jiangfeng . 2006. Two phosphate- and potassium- solubilizing bacteria isolated from Tianmu Moutain, Zhejiang, China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22: 983 - 990.
- Zapata, F. and R.N. Roy . 2004 . Use of phosphate rock for Sustainable agriculture. *FAO and IAEA*. Rome, Italy.