

Isolation, immobilization of salt-tolerant and inorganic phosphate solubilizing bacteria for producing controlled-release inorganic fertilizer in combination with microorganisms

Linh P. D. Bui^{1,2*}, Hung T. Huynh³, & Ha N. Nguyen^{2,4}

¹Department of Biology, Dong Nai University, Dong Nai Province, Vietnam

²Faculty of Biological Sciences, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Faculty of Agronomy, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁴Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: October 7, 2022

Revised: October 17, 2022

Accepted: October 21, 2022

Keywords

Bacterial immobilization
Controlled-release inorganic fertilizer
Insoluble inorganic phosphate solubilizing
Salt-tolerant

*Corresponding author

Bui Doan Phuong Linh
Email: plindh12@gmail.com

ABSTRACT

Salt tolerance is one of the characteristics to ensure the viability of microorganisms when combined with chemical fertilizers. This research aimed to isolate bacteria that had both phosphate-solubilizing and salt-tolerant abilities for production of controlled-release inorganic fertilizer-incorporated microorganisms. Of twenty-five phosphate solubilizing bacteria strains isolated from soil samples collected from Ho Chi Minh City, Dong Nai, and Long An provinces on Pikovskaya medium (PVK), there were three strains of bacteria that had both phosphate solubilizing activity and salt tolerance. The analysis results on PVK medium supplemented with 3% and 4% NaCl showed that only PSM₅₄ strain had phosphorus-degrading ring. Species identification based on 16S-rRNA sequence showed that PSM₅₄ was 99.9% similar to *Bacillus velezensis*. The controlled-release fertilizer was made by coating biodegradable polymers incorporated with PSM₅₄ bacteria that met standards for slow dissolution according to The Association of American Plant Food Control Officials. After 60 days of being immobilized in the membrane of controlled release, the PSM₅₄ bacteria remained at 88.3% compared to the initial density.

Cited as: Bui, L. P. D., Huynh, H. T., & Nguyen, H. N. (2022). Isolation, immobilization of salt-tolerant and inorganic phosphate solubilizing bacteria for producing controlled-release inorganic fertilizer in combination with microorganisms. *The Journal of Agriculture and Development* 21(5), 38-45.

Phân lập, cố định vi khuẩn có khả năng phân giải lân vô cơ khó tan và chịu mặn tạo phân bón vô cơ tan chậm kết hợp vi sinh vật

Bùi Đoàn Phượng Linh^{1,2*}, Huỳnh Thanh Hùng³ & Nguyễn Ngọc Hà^{2,4}

¹Bộ Môn Sinh Học, Trường Đại Học Đồng Nai, Tỉnh Đồng Nai

²Khoa Khoa Học Sinh Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

³Khoa Nông Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

⁴Viện Nghiên Cứu Công Nghệ Sinh Học và Môi Trường, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 07/10/2022

Ngày chỉnh sửa: 17/10/2022

Ngày chấp nhận: 21/10/2022

Từ khóa

Chịu mặn

Cố định vi khuẩn

Phân bón vô cơ tan chậm

Vi khuẩn phân giải lân vô cơ khó tan

***Tác giả liên hệ**

Bùi Đoàn Phượng Linh

Email: plindh12@gmail.com

TÓM TẮT

Khả năng thích nghi của vi sinh vật với môi trường muối cao là một trong các yếu tố thuận lợi để đảm bảo khả năng sống của vi sinh vật khi kết hợp với phân hóa học. Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng phân giải lân và chịu mặn nhằm tạo phân bón vô cơ tan chậm kết hợp vi sinh vật. Hai mươi lăm chủng vi khuẩn có khả năng phân giải lân được phân lập từ các mẫu đất thu thập ở Đồng Nai, Thành phố Hồ Chí Minh và Long An trên môi trường Pikovskaya (PVK), trong đó có ba chủng vi khuẩn có khả năng chịu mặn. Trên môi trường PVK bổ sung 3% và 4% NaCl chỉ có chủng vi khuẩn PSM₅₄ xuất hiện vòng phân giải. Kết quả định danh dựa vào trình tự 16S-rRNA cho thấy chủng PSM₅₄ tương đồng 99,9% với *Bacillus velezensis*. Phân tan chậm được tạo ra nhờ lớp vỏ bọc là các polymer phân hủy sinh học có bổ sung chủng vi khuẩn PSM₅₄ thỏa mãn tiêu chuẩn về phân tan chậm theo quy định của AAPFCO (Association of American Plant Food Control Officials), (1997). Kết quả khảo sát cho thấy sau 60 ngày được cố định trong màng bao, chủng vi khuẩn PSM₅₄ vẫn sống và mật số vi khuẩn trên màng bao đạt 88,3% so với mật số ban đầu.

1. Đặt Vấn Đề

Phân bón tan chậm kết hợp vi sinh vật là một giải pháp vừa tận dụng được hoạt động cố định của vi sinh vật, vừa góp phần tăng hiệu suất sử dụng phân bón và hạn chế tác động của phân bón tới môi trường (Shaviv, 2001; Trenkel, 2010; Azeem & ctv., 2014).

Lân là nguyên tố đa lượng cần thiết cho sự sinh trưởng, phát triển bình thường của cây trồng. Lân là thành phần cấu tạo của nhiều chất hữu cơ quan trọng trong cây và còn có vai trò tạo môi trường đệm, ảnh hưởng đến khả năng hút các chất khoáng khác của cây. Khi cây được bón đủ lân, cây sẽ sinh trưởng phát triển xanh tốt, khỏe mạnh và đạt năng suất cao (Hoang & ctv., 2004). Tuy lân có nhiều trong môi trường đất nhưng chủ yếu ở dưới dạng không hòa tan nên cây trồng khó hấp

thu được. Trong nông nghiệp lân thường được bổ sung vào đất dưới dạng phân lân hóa học nhưng tới hơn 80% lượng phân này bị cố định trong đất bởi các phức hợp kim loại - cation trở thành dạng khó tiêu hoặc bị rửa trôi gây ra những vấn đề về môi trường và làm tăng chi phí trong sản xuất nông nghiệp (Sharpley, 1995; Gyaneshwar & ctv., 2002; Syers & ctv., 2011). Trong tự nhiên, cây trồng muốn hấp thu được các dạng lân khó tan trong đất thường cần có sự hỗ trợ của các vi sinh vật, nhất là các vi khuẩn có khả năng chuyển hóa lân khó tan để tạo ra các dạng lân dễ tan (Bhattacharyya & Jha, 2012). Để hạn chế những tác động bất 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 trong đất là một trong những giải pháp thân thiện với môi trường và hữu hiệu giúp quản lý sự thiếu hụt lân trong đất nông nghiệp

(Sharma & ctv., 2013). Tuy nhiên, khi kết hợp vi sinh vật vào phân bón vô cơ thì độ mặn tạo ra khi phân bị hòa tan là một trong các yếu tố có thể ảnh hưởng và làm chết vi sinh vật (Geisseler & Scow, 2014).

Phương pháp cố định tế bào là một kỹ thuật đã được sử dụng nhiều trong lĩnh vực lên men và xử lý môi trường. Việc cố định sẽ giúp bảo vệ tế bào chống lại tác động bất lợi của môi trường như pH, nhiệt độ, dung môi (Kourkoutas & ctv., 2004). Dựa trên ưu điểm này nếu vi sinh vật được cố định trong một vi hạt sẽ giúp hạn chế tác động của phân bón hóa học tới vi sinh vật khi kết hợp vi sinh vật vào màng bao phân. Thêm vào đó, việc tuyển chọn được các chủng vi sinh vật có lợi có khả năng chịu mặn là một giải pháp khả thi để tăng khả năng sống của vi sinh vật khi cố định trong màng bao phân. Nghiên cứu này trình bày kết quả phân lập tuyển chọn các chủng vi khuẩn vừa có hoạt tính phân giải lân vừa có khả năng chịu mặn và tạo phân bón tan chậm kết hợp vi sinh vật.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Thu thập mẫu

Mẫu đất được thu thập tại Đồng Nai (huyện Nhơn Trạch, Long Khánh), Thành phố Hồ Chí Minh (Thủ Đức, Cần Giờ), Long An. 0,5 kg đất ở tầng mặt có độ sâu từ 2 - 10 cm được cho vào túi nylon sạch, ghi thông tin địa điểm, thời gian thu mẫu. Mẫu được bảo quản trong thùng lạnh khoảng 5°C trong quá trình vận chuyển về phòng thí nghiệm. Mẫu được sử dụng phân lập vi khuẩn ngay hoặc bảo quản trong điều kiện lạnh khoảng 5°C nhưng không quá một tuần.

2.2. Phân lập vi sinh vật phân giải lân

Cân 10 g mẫu đất thu thập, nghiền nhỏ cho vào bình tam giác chứa 90 mL nước cất vô trùng, lắc trên máy lắc xoay vòng ở tốc độ 100 vòng/phút, trong 30 phút. Sau đó, pha loãng mẫu ở nồng độ thích hợp. Ở mỗi nồng độ pha loãng, dùng pipet vô trùng hút 0,1 mL mẫu đưa lên môi trường thạch đĩa Pikovskaya (PVK, gồm glucose 10 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g, KCl 0,2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, MnSO_4 0,002 g, FeSO_4 0,002 g, cao nấm men 0,5 g, agar 20,0 g và nước cất vừa đủ 1000 mL). Dùng que trang trải đều mẫu rồi ủ ở 35°C. Theo dõi sự xuất hiện khuẩn lạc, lựa chọn các khuẩn lạc có xuất hiện vòng phân giải

lân. Mỗi khuẩn lạc khác nhau về mặt hình thái được coi là một chủng vi khuẩn. Các chủng vi khuẩn được tiếp tục làm thuần và bảo quản ở nhiệt độ 5°C.

2.3. Khảo sát khả năng chịu mặn của các chủng vi khuẩn phân giải lân

Các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải lân phân lập được nuôi trên môi trường PVK bổ sung 2%, 3%, 4% NaCl. Chủng vi khuẩn có khả năng chịu mặn được xác định dựa vào vòng phân giải lân bao quanh khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy. Quan sát sự xuất hiện khuẩn lạc có vòng phân giải bao quanh để chọn ra được chủng vi khuẩn vừa có hoạt tính phân giải lân vừa có khả năng chịu mặn.

2.4. Đánh giá hoạt tính phân giải lân vô cơ khó tan của vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải lân và chịu mặn được nuôi trên môi trường PVK. Hoạt tính phân giải lân của vi khuẩn được xác định dựa trên đường kính vòng phân giải và đánh giá bằng hiệu số D - d (mm), với D (mm) là đường kính vòng phân giải, d (mm) là đường kính khuẩn lạc.

2.5. Định danh chủng vi khuẩn

Tiến hành nhuộm Gram vi khuẩn, hình thái khuẩn lạc và tế bào được quan sát dưới kính hiển vi. Chủng vi khuẩn được lựa chọn được gửi đi giải trình tự tại công ty Nam Khoa Biotech (Quận 7, Thành phố Hồ Chí Minh). Kết quả giải trình tự được hiệu chỉnh và tra cứu độ tương đồng nhờ công cụ 16S-based ID trên EzBioCloud và công cụ BLAST trên NCBI. Phân tích quan hệ di truyền bằng phần mềm MEGAX với trình tự các loài vi khuẩn *Bacillus* hiện có trên Genbank.

2.6. Cố định vi khuẩn và tạo phân tan chậm kết hợp vi sinh vật

Chủng vi khuẩn chuyển hóa lân được lựa chọn từ kết quả phân lập là PSM₅₄ được tăng sinh trong môi trường LB (NaCl 10 g, peptone 10 g, cao nấm men 5 g, H₂O đủ 1000 mL) thu sinh khối, tạo dung dịch huyền phù vi khuẩn với mật số 10⁹ tế bào/mL.

Chuẩn bị dung dịch sodium alginate 1%, calcium chloride 1%, hấp khử trùng ở 120°C trong

30 phút. Trộn dịch huyền phù vi khuẩn thu được với dung dịch sodium alginate đã chuẩn bị tạo hỗn hợp đồng nhất. Cho dung dịch calcium chloride 1% vào cốc, đặt trên máy khuấy rồi cho từ từ dung dịch sodium alginate đã trộn sẵn vi khuẩn cho tới khi đạt được dung dịch đồng nhất thì ngưng khuấy, tiến hành lọc để loại bỏ phần dung dịch calcium chloride.

Phân tan chậm với vỏ bọc có bổ sung vi khuẩn được tạo ra bằng cách cho các viên phân vào thiết bị trống quay với tốc độ quay 450 vòng/phút. Phun dung dịch polyurethane lên bề mặt viên phân với tỷ lệ nhất định. Sản phẩm được sấy khô đến khi đạt khối lượng không đổi, được đưa vào thiết bị vo viên và được trộn đều cùng với chất mang bentonite đã trộn lẫn với các vi hạt sodium alginate có chứa vi khuẩn PSM₅₄ với tỷ lệ nhất định sao cho mật số vi khuẩn > 10⁹ CFU/g, bổ sung polyvinyl alcohol để làm chất kết dính. Sản phẩm được sấy ở nhiệt độ dưới 45°C đến khối lượng không đổi và được đưa vào trống quay để phun phủ lớp polymer tạo bởi carboxyl methyl cellulose - polyvinyl alcohol - glycerol-urea có bổ sung vi hạt chứa vi khuẩn PSM₅₄ và parafin. Sản phẩm sau khi làm khô bề mặt được bảo quản trong bao nylon để tránh hút ẩm.

2.7. Khảo sát quá trình tan chậm của phân bón trong mô hình mô phỏng điều kiện tự nhiên

Kỹ thuật cột rửa trôi dựa trên việc ủ hiếu khí hỗn hợp cát, đất và phân bón tiếp xúc với quá trình rửa trôi không liên tục trong khoảng thời gian xác định được dùng để đánh giá quá trình tan chậm của phân (Sartain & ctv., 2004; Medina & ctv., 2008; Mayer, 2010). Hỗn hợp gồm 90 g đất bề mặt vô trùng trộn với 1.710 g cát thạch anh và 10 g phân bón tan chậm thử nghiệm được cho vào ống nhựa PVC dài 30 cm, đường kính 8 cm có nắp đậy ở trên và van xả ở dưới. Hỗn hợp được giữ lại trong ống PVC nhờ vào một lớp lưới và giấy lọc đặt ở đáy ống. Hỗn hợp được làm ẩm đạt 10% bằng cách thêm 180 mL nước cất. Sau mỗi khoảng thời gian xác định (1, 3, 5, 7, 14, 21, 28, 45, 60, 90 ngày), 500 mL citric acid 0,01% được thêm vào ống để rửa trôi các chất hòa tan có trong hỗn hợp. Dung dịch thu được từ ống PVC được hút ra bằng máy hút chân không. Sau đó lấy một lượng xác định dung dịch thu được đem phân tích hàm lượng nitơ tổng theo TCVN 8557: 2010 và hàm lượng phosphor tổng theo TCVN 8563 : 2010.

2.8. Đánh giá khả năng tồn tại của vi khuẩn trên màng bao phân tan chậm theo thời gian

Khả năng tồn tại của vi khuẩn trên màng bao phân tan chậm theo thời gian được đánh giá thông qua mật số vi khuẩn trên môi trường PVK. Định kỳ theo thời gian ở thời điểm 0, 7, 14, 21, 28, 45, 60 ngày, cân 10 g phân thử nghiệm cho vào bình tam giác chứa 90 mL dung dịch muối ăn NaCl 0,85%, pH 7 đã khử trùng ở 121°C, trong 30 phút và đặt trên máy lắc vòng với tốc độ 450 vòng/phút cho tới khi lớp màng bao bentonite tan vừa hết, loại bỏ lõi viên phân. Dùng pipet vô trùng hút 0,1 mL dịch thu được cấy vào đĩa petri chứa môi trường PVK đã chuẩn bị, ủ ở nhiệt độ 35°C, xác định mật số vi khuẩn sau 48 giờ và so sánh với mật số vi khuẩn ở mốc thời gian 0 ngày.

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên một yếu tố (CRD), mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Số liệu được tính toán bằng phần mềm Microsoft Excel 2016, phân tích thống kê ANOVA và trắc nghiệm phân hạng bằng phần mềm Minitab 18.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Phân lập các chủng vi khuẩn phân giải lân vô cơ khó tan từ đất

Từ 77 mẫu đất thu thập đã phân lập được 25 chủng vi khuẩn hình que có khả năng phân giải lân vô cơ khó tan, trong đó có 6 chủng vi khuẩn Gram dương, 19 chủng vi khuẩn Gram âm. Các chủng vi khuẩn được ký hiệu từ PSM₃₆ đến PSM₆₀. Kích thước vòng phân giải lân tăng dần theo thời gian và đa số các chủng đều có đường kính vòng phân giải lân lớn nhất ở 192 giờ – 240 giờ (Bảng 1).

3.2. Xác định chủng vi khuẩn phân giải lân có khả năng chịu mặn

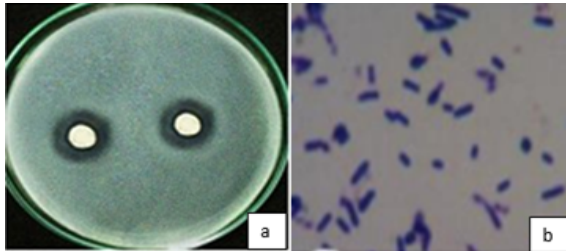
Các chủng vi khuẩn phân giải lân phân lập được nuôi trên môi trường PVK bổ sung 2, 3, 4% NaCl để xác định chủng vi khuẩn vừa có hoạt tính phân giải lân vừa có khả năng chịu mặn. Kết quả cho thấy ở nồng độ 2% NaCl, ba chủng vi khuẩn PSM₄₈, PSM₅₄, PSM₅₅ tương ứng với các mẫu đất thu được ở Nhơn Trạch, Cần Giờ và Long An xuất hiện vòng phân giải lân. Ở môi trường PVK bổ sung 3% và 4% NaCl chỉ có chủng PSM₅₄ tạo vòng phân giải lân và sinh trưởng bình thường.

Bảng 1. Đường kính vòng phân giải của các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải lân

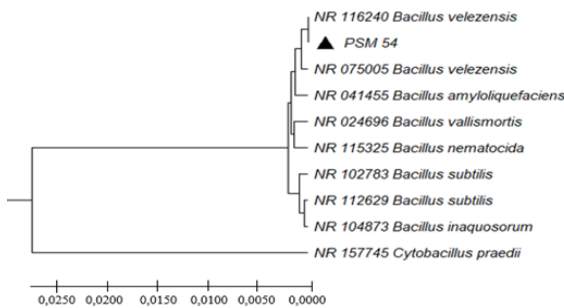
STT	Chủng vi khuẩn	Địa điểm thu mẫu	Đường kính vòng phân giải (mm)					
			48 giờ	96 giờ	144 giờ	192 giờ	240 giờ	288 giờ
1	PSM ₃₆	Thủ Đức	2,7 ± 0,15	3,2 ± 0,20	5,5 ± 0,06	7,0 ± 0,15	7,4 ± 0,06	7,1 ± 0,06
2	PSM ₃₇	Thủ Đức	2,3 ± 0,06	4,5 ± 0,06	6,0 ± 0,10	6,8 ± 0,15	7,2 ± 0,10	6,9 ± 0,06
3	PSM ₃₈	Thủ Đức	4,5 ± 0,21	5,5 ± 0,06	6,1 ± 0,10	7,2 ± 0,11	7,4 ± 0,12	7,7 ± 0,06
4	PSM ₃₉	Thủ Đức	2,0 ± 0,21	4,8 ± 0,06	5,7 ± 0,10	6,4 ± 0,25	6,8 ± 0,15	6,5 ± 0,06
5	PSM ₄₀	Thủ Đức	2,2 ± 0,15	4,2 ± 0,06	6,3 ± 0,06	7,3 ± 0,15	8,7 ± 0,06	7,7 ± 0,10
6	PSM ₄₁	Thủ Đức	3,3 ± 0,15	5,3 ± 0,12	6,7 ± 0,15	7,4 ± 0,15	7,3 ± 0,06	6,3 ± 0,06
7	PSM ₄₂	Nhơn Trạch	3,5 ± 0,10	7,0 ± 0,15	7,3 ± 0,06	8,5 ± 0,06	8,6 ± 0,10	8,5 ± 0,06
8	PSM ₄₃	Nhơn Trạch	2,1 ± 0,10	3,7 ± 0,15	4,6 ± 0,06	6,3 ± 0,12	6,3 ± 0,06	5,1 ± 0,06
9	PSM ₄₄	Cần Giở	3,8 ± 0,15	4,3 ± 0,06	6,1 ± 0,06	7,3 ± 0,15	7,2 ± 0,10	6,2 ± 0,06
10	PSM ₄₅	Cần Giở	4,0 ± 0,10	4,4 ± 0,15	8,2 ± 0,17	10,3 ± 0,06	11,3 ± 0,06	10,8 ± 0,15
11	PSM ₄₆	Thủ Đức	1,0 ± 0,06	1,2 ± 0,06	1,5 ± 0,06	1,8 ± 0,06	1,8 ± 0,06	1,7 ± 0,10
12	PSM ₄₇	Thủ Đức	0,8 ± 0,06	1,0 ± 0,06	1,3 ± 0,06	2,0 ± 0,06	2,0 ± 0,06	1,8 ± 0,06
13	PSM ₄₈	Nhơn Trạch	4,0 ± 0,12	6,9 ± 0,06	7,8 ± 0,06	9,3 ± 0,15	10,9 ± 0,10	10,7 ± 0,12
14	PSM ₄₉	Long An	3,8 ± 0,12	4,4 ± 0,06	6,5 ± 0,21	7,2 ± 0,10	9,4 ± 0,06	9,2 ± 0,06
15	PSM ₅₀	Long Khánh	1,3 ± 0,10	1,8 ± 0,15	2,3 ± 0,10	3,2 ± 0,15	3,2 ± 0,10	2,2 ± 0,15
16	PSM ₅₁	Long Khánh	3,2 ± 0,06	3,8 ± 0,10	5,8 ± 0,06	7,6 ± 0,10	7,6 ± 0,10	6,5 ± 0,06
17	PSM ₅₂	Nhơn Trạch	3,5 ± 0,06	4,7 ± 0,10	5,5 ± 0,10	6,6 ± 0,10	8,7 ± 0,06	7,1 ± 0,06
18	PSM ₅₃	Long An	2,8 ± 0,06	3,2 ± 0,12	4,3 ± 0,10	5,1 ± 0,06	6,2 ± 0,06	5,8 ± 0,06
19	PSM ₅₄	Cần Giở	3,8 ± 0,06	6,7 ± 0,06	8,7 ± 0,21	10,5 ± 0,10	12,8 ± 0,06	11,8 ± 0,10
20	PSM ₅₅	Long An	3,4 ± 0,06	6,3 ± 0,06	7,7 ± 0,06	9,1 ± 0,06	10,7 ± 0,10	10,5 ± 0,10
21	PSM ₅₆	Long An	2,9 ± 0,06	3,1 ± 0,10	3,3 ± 0,15	4,3 ± 0,15	4,6 ± 0,10	3,8 ± 0,15
22	PSM ₅₇	Long Khánh	4,5 ± 0,10	7,9 ± 0,06	9,2 ± 0,11	12,3 ± 0,06	13,6 ± 0,15	12,4 ± 0,06
23	PSM ₅₈	Long Khánh	0,8 ± 0,10	1,3 ± 0,06	2,3 ± 0,10	3,6 ± 0,15	2,7 ± 0,06	1,9 ± 0,06
24	PSM ₅₉	Long Khánh	1,9 ± 0,15	2,1 ± 0,06	2,3 ± 0,06	3,3 ± 0,06	3,6 ± 0,06	2,8 ± 0,06
25	PSM ₆₀	Long Khánh	1,8 ± 0,10	2,1 ± 0,06	2,2 ± 0,06	6,2 ± 0,06	5,2 ± 0,06	3,8 ± 0,06

3.3. Kết quả định danh chủng vi khuẩn PSM₅₄

Kết quả quan sát hình thái cho thấy chủng PSM₅₄ là trực khuẩn Gram (+) (Hình 1b). Trình tự vùng 16S-rRNA của dòng PSM₅₄ được kiểm tra bằng công cụ 16S based ID từ EzbioCloud, BLAST từ NCBI và phân tích UPGMA cho thấy dòng PSM₅₄ tương đồng 99,9% với loài *Bacillus velezensis* (Hình 2).



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc (a) và nhuộm Gram (b) của PSM₅₄.

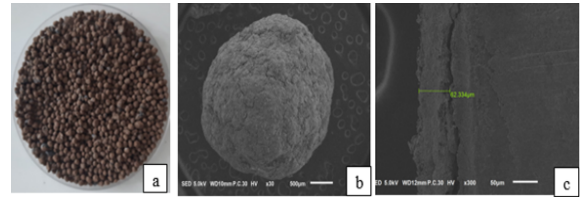


Hình 2. Mối quan hệ di truyền giữa chủng PSM₅₄ và các loài *Bacillus* hiện có trên Genbank phân tích bằng phương pháp UPMGA, giá trị bootstrap 1000. Loài *Cytobacillus praedii* được sử dụng làm nhóm ngoài (outgroup).

3.4. Khả năng phóng thích dinh dưỡng của phân tan chậm kết hợp vi khuẩn phân giải lân trong mô hình mô phỏng điều kiện tự nhiên

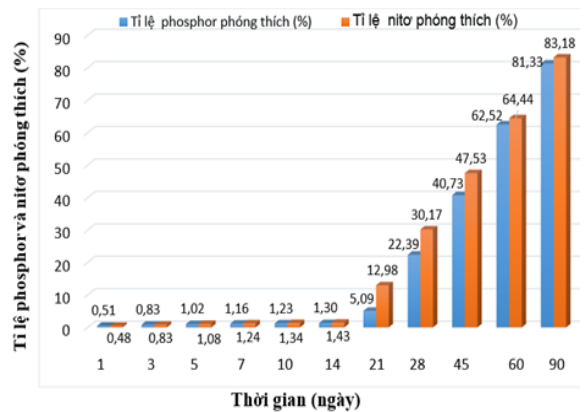
Viên phân tan chậm kết hợp vi khuẩn phân giải lân vô cơ khó tan được tạo ra có các lớp màng bao tạo bởi các vật liệu là polyurethane, bentonite, polyvinyl alcohol, carboxymethyl cellulose, glycerol, urea và paraffin được đem đi khảo sát sự phóng thích nitơ và phosphor trong thời gian 90 ngày (Hình 3).

Kết quả khảo sát cho thấy trong môi trường đất và cát ẩm, tỉ lệ giải phóng nitơ và phosphor



Hình 3. Phân tán chậm kết hợp vi khuẩn phân giải lân vô cơ khó tan (a. Sản phẩm phân, b. Hình chụp SEM viên phân, c. Lớp màng bao phân chứa vi khuẩn phân giải lân).

của phân trong vòng 14 ngày đầu tiên chậm dần lượt là 1,43% và 1,30%. Sau 21 ngày tỉ lệ giải phóng chất dinh dưỡng của phân bắt đầu tăng lên và sau 90 ngày tỉ lệ nitơ được giải phóng đạt 83,18%, hàm lượng phosphor được giải phóng là 81,33% (Hình 4).



Hình 4. Tỉ lệ phosphor và nitơ được phóng thích từ phân tan chậm kết hợp vi khuẩn phân giải lân theo thời gian trong mô hình mô phỏng điều kiện tự nhiên.

3.5. Khả năng tồn tại của vi khuẩn trên màng bao phân tan chậm theo thời gian

Khả năng tồn tại của vi khuẩn trong màng bao phân bón theo thời gian được đánh giá thông qua mật số vi khuẩn trên môi trường PVK (Bảng 2).

Mật số vi khuẩn phân giải lân trong màng bao ổn định trong khoảng thời gian 14 ngày, mật số 9,43 Log.CFU/g không khác biệt so với thời điểm 0 ngày. Sau đó, mật số vi khuẩn giảm dần theo thời gian, ở thời điểm 21 ngày (9,35 Log.CFU/g), 28 ngày (8,43 Log.CFU/g), 45 ngày (8,36 Log.CFU/g), và ở 60 ngày mật số vi khuẩn giảm còn 8,33 Log.CFU/g, đạt 88,34% mật số vi khuẩn so với thời điểm ban đầu.

Bảng 2. Mật số vi khuẩn trong màng bao theo thời gian

Thời gian (ngày)	Mật số vi khuẩn (Log.CFU/g)
0	9,43 ^a ± 0,00
7	9,43 ^a ± 0,00
14	9,43 ^a ± 0,00
21	9,35 ^b ± 0,01
28	8,43 ^c ± 0,00
45	8,36 ^d ± 0,00
60	8,33 ^e ± 0,01

Các giá trị trung bình của cùng một cột theo sau bởi chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$).

Bacillus velezensis là trực khuẩn Gram dương, hình thành nội bào tử, sinh trưởng tốt trong điều kiện hiếu khí (Madhaijan & ctv., 2010). *Bacillus velezensis* là vi khuẩn an toàn, sở hữu nhiều đặc tính quý có lợi cho cây trồng như khả năng hòa tan lân, tiết ra chất kháng nấm, kháng vi khuẩn gây bệnh, khả năng sản sinh chất kích thích sinh trưởng thúc đẩy sự phát triển của cây trồng và có khả năng chịu mặn (Hwangbo & ctv., 2016; Saxena & ctv., 2020; Joly & ctv., 2021). Chủng vi khuẩn PSM₅₄ có khả năng phân giải lân và chống chịu mặn được tuyển chọn bổ sung tạo phân bón tan chậm bổ sung vi sinh vật.

Theo AAPFCO (1997), phân bón tan chậm là loại phân bón mà chất dinh dưỡng hoặc các chất dinh dưỡng trong phân được phóng thích thông qua một lớp màng bao ở nhiệt độ phòng đáp ứng được một trong ba tiêu chí sau: không quá 15% các chất khoáng được phóng thích trong vòng 24 giờ, không quá 75% các chất khoáng được phóng thích trong vòng 28 ngày, và ít nhất 75% các chất khoáng được phóng thích trong toàn bộ thời gian phóng thích của phân đã đề ra. Trong nghiên cứu này mẫu phân vô cơ được bọc màng polymer chứa vi khuẩn PSM₅₄ thỏa mãn các tiêu chuẩn về phân tan chậm do Ủy ban chuẩn hóa Châu Âu đưa ra. Khả năng phân giải lân của chủng vi khuẩn PSM₅₄ tích hợp trong màng bao phân đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng và năng suất của cây trồng đang tiếp tục được nghiên cứu điều kiện nhà lưới và đồng ruộng.

4. Kết Luận

Nghiên cứu đã phân lập được 25 chủng vi khuẩn phân giải lân vô cơ khó tan, trong đó có 3 chủng vi khuẩn có khả năng chịu mặn. Chủng vi

khẩn PSM₅₄ có khả năng chịu mặn ở nồng độ muối lên tới 4% được xác định là vi khuẩn *Bacillus velezensis*. Phân tan chậm kết hợp vi khuẩn phân giải lân vô cơ khó tan đã được chế tạo thành công trong đó chủng vi khuẩn PSM₅₄ được cố định trong vi hạt sodium alginate của màng bao đáp ứng tiêu chuẩn của AAPFCO về phân bón tan chậm. Các nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của phân bón đối với sinh trưởng và năng suất của cây trồng đang được tiếp tục thực hiện.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có bất kỳ mâu thuẫn nào giữa các tác giả.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- AAPFCO (Association of American Plant Food Control Officials). (1997). *Official publication - Association of American plant food control officials issue 50*. Indiana, USA: AAPFCO Inc.
- Azeem, B., KuShaari, K., Man, Z. B., Basit, A., & Trinh, T. H. (2014). Review on materials and methods to produce controlled release coated urea fertilizer. *Journal of controlled Release* 181, 11-21, from <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.02.020>.
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28(4), 1327-1350 <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>.
- Geisseler, D., & Scow, K. M. (2014). Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms - A review. *Soil Biology and Biochemistry* 75, 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.03.023>.
- Gyaneshwar, P., Kumar, G. N., Parekh, L. J., & Poole, P. S. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil* 245(1), 83-93. <https://doi.org/10.1023/A:1020663916259>.
- Hoang, M. T., Vu, Q. S., & Nguyen, K. T. (2004). *A textbook of plant physiology*. Ho Chi Minh City, Vietnam: Pedagogical Publishing House.
- Hwangbo, K., Um, Y., Kim, K. Y., Madhaiyan, M., Sa, T. M., & Lee, Y. (2016). Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* CBMB205, a phosphate-solubilizing bacterium isolated from the rhizosphere of rice in the Republic of Korea. *ASM Journal - Genome Announcements* 4(4), 16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00654-16>.
- Joly, P., Calteau, A., Wauquier, A., Dumas, R., Beuvin, M., Vallenet, D., Crovadore, J., Cochard, B., Lefort, F., & Berthon, J. Y. (2021). From strain characterization to field authorization: Highlights on *Bacillus velezensis* strain B25 beneficial properties for

- plants and its activities on phytopathogenic fungi. *Microorganisms* 9(9), 1924. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091924>.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I. M., Marchant, R., & Koutinas, A. A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology* 21(4), 377-397. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.10.005>.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Kwon, S. W., & Sa, T. M. (2010). *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60(10), 2490-2495. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.015487-0>.
- Mayer, H. (2010). *Nutrient release patterns of controlled release fertilizers used in the ornamental horticulture industry of south Florida* (Unpublished doctoral dissertation). The University of Florida, The State of Florida, USA.
- Medina, L. C., Obreza, T. A., Sartain, J. B., & Rouse, R. E. (2008). Nitrogen release patterns of a mixed controlled-release fertilizer and its components. *HortTechnology* 18(3), 475-480. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.18.3.475>.
- Sartain, J. B., Hall, W. L., Littell, R. C., & Hopwood, E. W. (2004). New tools for the analysis and characterization of slow-release fertilizers. In Hall, W. L., & Robarge, W. P. (Eds.). *Environmental Impact of Fertilizer on Soil and Water* (180-195). Oxford, UK: Oxford University Press. <https://doi.org/10.1021/bk-2004-0872.ch013>.
- Saxena, A. K., Kumar, M., Chakdar, H., Anuroopa, N., & Bagyaraj, D. J. (2020). Bacillus species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *Journal of Applied Microbiology* 128(6), 1583-1594. <https://doi.org/10.1111/jam.14506>.
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus* 2(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>.
- Sharpley, A. N. (1995). Soil phosphorus dynamics: agronomic and environmental impacts. *Ecological Engineering* 5(2-3), 261-279. [https://doi.org/10.1016/0925-8574\(95\)00027-5](https://doi.org/10.1016/0925-8574(95)00027-5).
- Shaviv, A. (2001). Advances in controlled-release fertilizers. *Advances in Agronomy* 71, 1-49. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(01\)71011-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(01)71011-5).
- Syers, K., Bekunda, M., Cordell, D., Corman, J., Johnston, J., Rosemarin, A., Salcedo, I., & Loughheed, T. (2011). Phosphorus and food production. *UNEP Year Book*, 34-45. https://fsc.uni-hohenheim.de/fileadmin/einrichtungen/fsc/Intranet/Intranet_MOSA/MOSA_Updated/5_UNEP_2011.pdf.
- Trenkel, M. E. (2010). *Slow-and controlled-release and stabilized fertilizers: An option for enhancing nutrient use efficiency in agriculture*. Paris, France: Published by the International Fertilizer Industry Association (IFA). http://repo.upertis.ac.id/1628/1/2010_Trenkel_slow%20release%20book.pdf.