

**TẠO CHẾ PHẨM SINH HỌC TỪ GIỐNG VI KHUẨN *BACILLUS* SPP.
VÀ *PSEUDOMONAS* SPP. CÓ KHẢ NĂNG HÒA TAN LÂN**

NGUYỄN THỊ NGỌC SƯƠNG*, NGUYỄN ĐỖ THANH PHƯƠNG**, TRẦN HẢI MY***

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, tuyển chọn được dòng vi khuẩn *Bacillus* B68 và *Pseudomonas* T15 có chỉ số hòa tan lân cao và không gây độc đối với cây trồng. Môi trường nhân giống cấp 1, cấp 2 và chất mang thích hợp cho dòng B68 lần lượt là TSB, RD-TB và phân hữu cơ. Đối với dòng T15, môi trường nhân giống cấp 1, cấp 2 và chất mang thích hợp lần lượt là King's B, NBRIP-RD và phân hữu cơ 75% - cám gạo 25%.

Từ khóa: *Bacillus*, hòa tan lân, *Pseudomonas*.

ABSTRACT***Establishing procedure of biopreparation from Bacillus spp. and Pseudomonas spp. having phosphate solubilizing ability***

In this study, B68 isolate and T15 isolate were showed the highest phosphate solubilisation index and were non-toxic for plants. For B68 isolate, the suitable culture medium type I, medium type II and carrier are TSB, molasses - starch, and vermicompost, respectively. For T15 isolate, the suitable culture medium type I, medium type II and carrier are King's B, NBRIP - molasses and 75% vermicompost - 25% rice screenings, respectively.

Keywords: *Bacillus*, soluble phosphorus, *Pseudomonas*.

1. Mở đầu

Lân là một nguyên tố đa lượng quan trọng đối với sự sinh trưởng, phát triển của cây trồng và cũng là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến năng suất cây trồng. Tuy nhiên, hầu như lân tồn tại trong đất ở dạng khó tan nên cây trồng không thể hấp thu. Vì thế, lân thường được bổ sung vào đất dưới dạng phân bón hòa tan mà cây trồng dễ sử dụng nhưng lượng lân vô cơ hòa tan này nhanh chóng bị cố định và kết tủa thành dạng không hòa tan làm cây trồng không hấp thu được [7]. Hơn nữa, việc sử dụng phân bón hóa học gây ô nhiễm môi trường và tổn hại đến sức khỏe con người.

Do đó, sự hiện diện của các vi khuẩn hòa tan lân thuộc các chi như *Pseudomonas*, *Bacillus*... trong đất và vùng rễ của cây có vai trò rất quan trọng trong sự hòa tan những dạng lân khó tan thành dạng dễ tan mà cây trồng có thể hấp thu được. Tiềm

* Kỹ sư Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao, TPHCM;
Email: ngocsuongnguyen10@gmail.com

** ThS, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao, TPHCM

*** Cử nhân, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao, TPHCM

năng ứng dụng vi khuẩn hòa tan lân trong sản xuất chế phẩm sinh học là rất lớn và là một trong những biện pháp hiệu quả để tăng năng suất cây trồng, giảm lượng phân bón hóa học cũng như giảm tác động xấu do phân hóa học gây ra, cải thiện đất trồng và bảo vệ môi trường.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu

Các giống *Bacillus* spp. có nguồn gốc từ Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP HCM và bộ sưu tập của Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao.

Các giống *Pseudomonas* spp. có nguồn gốc từ Trường Đại học Nông lâm TP HCM và bộ sưu tập của Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao.

Than bùn, phân hữu cơ (phân trùn quế), cám gạo, ri đường.

2.2. Môi trường

- Môi trường thử hoạt tính:

Môi trường thạch đĩa Pikovskaya's: Glucose 10 g/L, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (TCP) 5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g/L, NaCl 0,2 g/L, KCl 0,2g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/L, yeast extract 0,5 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,002 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,002 g/L, agar 15 g/L.

- Môi trường nhân giống:

Môi trường Trypticase Soya Broth (TSB), Nutrient Broth (NB), Lubria - Bertani (LB), King's B.

Môi trường NBRIP biến đổi (NBRIP - BĐ) (Nautiyal, 1999): Glucose 20 g/L, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g/L, KCl 0,2 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 g/L.

Môi trường NBRIP ri đường (NBRIP - RĐ): Ri đường 20g/L, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g/L, KCl 0,2 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 g/L.

Môi trường ri đường tinh bột (RĐ-TB): Ri đường 120 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, tinh bột 20g/L.

Môi trường Tryptone Glucose Yeast Extract (TGYE): Casein enzymic hydrolysate 5 g/L, yeast extract 3 g/L, glucose 1 g/L.

Môi trường Tryptone yeast extract (TYE): Tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L.

2.3. Phương pháp

2.3.1. Tuyển chọn giống vi khuẩn *Bacillus* spp. và *Pseudomonas* spp. có khả năng hòa tan lân khó tan

Tuyển chọn giống vi khuẩn có khả năng hòa tan lân: Các giống vi khuẩn được cấy điểm trên thạch đĩa PKV, ủ ở nhiệt độ phòng. Ghi nhận đường kính vòng phân giải và đường kính khuẩn lạc sau 5 ngày nuôi ủ. [10]

Thử tính gây độc cho cây trồng của các chủng vi khuẩn đã tuyển chọn được: Ngâm hạt cà chua đã được xử lí bề mặt lần lượt bằng nước cất vô trùng, cồn 70% và nước Javen 50% và ủ đến khi nảy mầm, ngâm hạt đã nảy mầm với dịch khuẩn có mật độ $10^8 - 10^9$ CFU/ml trong 30 phút, sau đó đặt 5 hạt vào trong ống thạch MS, ủ trong điều kiện 16 giờ sáng và 8 giờ tối ở nhiệt độ 28°C. Theo dõi và tính tỉ lệ cây chết, biên dị và bị bệnh, so sánh với cây đối chứng không xử lí vi khuẩn sau chủng 7-14 ngày.

2.3.2. Nghiên cứu môi trường nhân giống cấp 1

Nuôi cấy lắc (150 vòng/phút) vi khuẩn *Bacillus* lần lượt trong 3 môi trường: NB, TGYE, TSB trong 24 và 48 giờ ở 37°C và vi khuẩn *Pseudomonas* trong 3 môi trường: NB, TSB, King's B trong 24 và 48 giờ ở 28°C. [1], [4], [5]

2.3.3. Nghiên cứu môi trường nhân giống cấp 2

Nuôi cấy lắc (150 vòng/phút) vi khuẩn *Bacillus* lần lượt trong 3 môi trường: RĐ - TB, LB, TYE trong 24 và 48 giờ ở 37°C và vi khuẩn *Pseudomonas* trong 3 môi trường: NBRIP - BĐ, TGYE, NBRIP - RĐ trong 24 và 48 giờ ở 28°C. [4], [10]

2.3.4. Nghiên cứu chất mang thích hợp cho vi khuẩn

Công thức thí nghiệm chất mang: than bùn, than bùn (98%) + cám gạo (2%), than bùn (98%) + rỉ đường (2%), than bùn (98%) + phân hữu cơ (2%), phân hữu cơ, phân hữu cơ (70%) + cám gạo (30%) và phân hữu cơ (75%) + cám gạo (25%), sau đó bổ sung sinh khối vi khuẩn sao cho mật độ cao hơn 10^{11} CFU/g. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 ngày [5], [8].

Xác định mật độ tế bào bằng phương pháp đếm gián tiếp trên môi trường TSA (đối với *Bacillus*) và King's B (đối với *Pseudomonas*); chỉ số hòa tan lân (phosphate solubilizing index, SI). [10]

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tuyển chọn giống vi khuẩn *Bacillus* spp. và *Pseudomonas* spp. có khả năng hòa tan lân khó tan

Qua quá trình tuyển chọn, giống vi khuẩn có khả năng hòa tan lân tốt dựa trên hai chỉ tiêu là chỉ số hòa tan lân và tính gây độc cho cây trồng, kết quả được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Khả năng hòa tan lân và tính gây độc cho cây trồng của *Bacillus* spp.

Chủng	Chỉ số hòa tan lân	Tỉ lệ cây chết (%)
C6	2,19 d	100
A18	2,34 c	0
A30	2,51 b	100

B68	2,84 a	0
A76	2,32 c	0
BS1	0	-
BS5	0	-
BS8	0	-
BS9	0	-
B78	0	-

Các số trung bình theo cột có cùng kí tự kèm theo không khác biệt có ý nghĩa ở mức xác suất $p < 0,05$

* Tỷ lệ cây chết, bị bệnh ở lô đối chứng là 0%.

Bảng 2. Khả năng hòa tan lân và tính gây độc cho cây trồng của *Pseudomonas* spp.

Chủng	Chỉ số hòa tan lân	Tỷ lệ cây chết (%)
T13	3,64 b	100
T14	3,15 d	0
T15	3,98 a	0
T21	3,45 c	0
T6	3,50 bc	100
T1	0	-
T12	0	-
T17	0	-
T18	0	-
T5	0	-

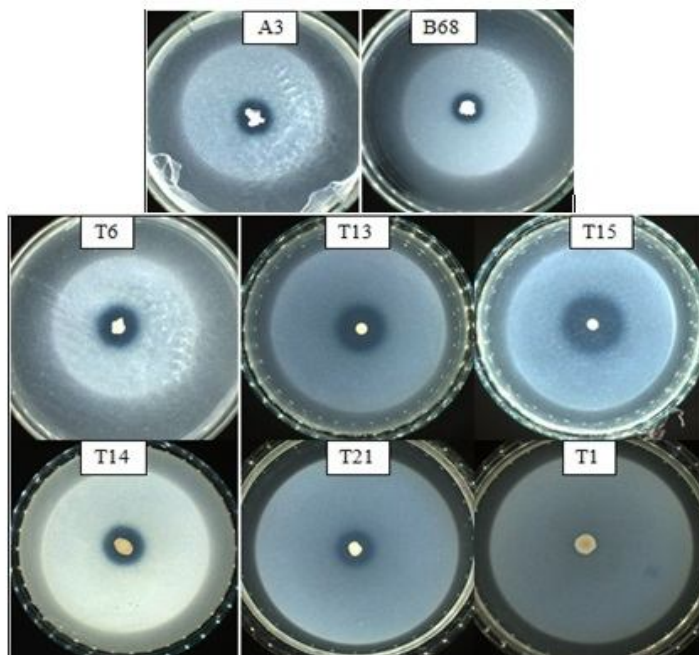
Các số trung bình theo cột có cùng kí tự kèm theo không khác biệt có ý nghĩa ở mức xác suất $p < 0,05$

* Tỷ lệ cây chết, bị bệnh ở lô đối chứng là 0%

Trong 20 chủng vi khuẩn thí nghiệm, có 5 chủng *Bacillus* là C6, A18, A30, B68 và A76 và 5 chủng *Pseudomonas* là T13, T14, T15, T21 và T6 có khả năng hòa tan lân. Tuy nhiên, chỉ có 6 chủng A18, B68, A76, T14, T15 và T21 không gây độc cho cây trồng. Trong đó, chủng *Bacillus* B68 (SI = 2,84) và chủng *Pseudomonas* T15 có chỉ số hòa tan lân cao nhất (SI = 3,98).

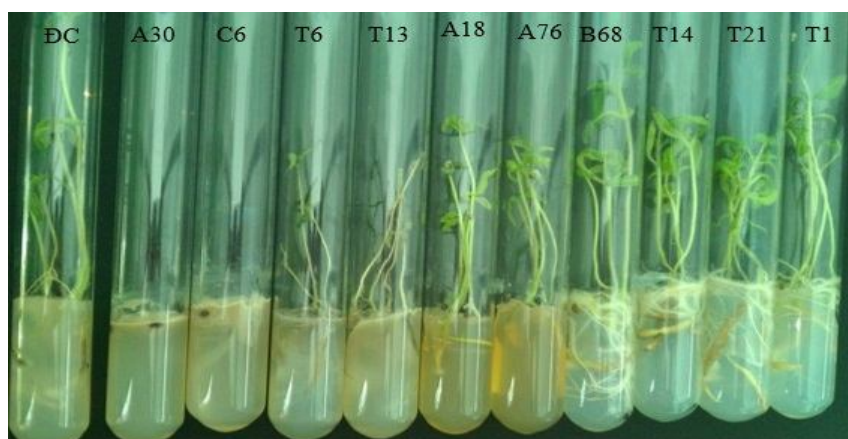
Theo nghiên cứu của Tripti và cs (2012), chủng *Bacillus* có chỉ số hòa tan lân cao nhất là 3,1 và chủng *Pseudomonas* là 3 [10]. Rath và cs (2013) đã nghiên cứu khả năng hòa tan lân của một số chủng vi khuẩn, trong đó các chủng *Bacillus* có hoạt tính hòa tan lân cao nhất có SI từ 1,22 đến 1,26, và chủng *Pseudomonas* 1,93 [6]. Sinha và cs (2013) đã phân lập và tuyển chọn một chủng vi khuẩn có khả năng hòa tan lân, trong đó, chủng *Bacillus* JPSB16 có chỉ số SI cao nhất (3,14) và chủng *Pseudomonas* có chỉ số SI cao nhất là 2,83. [9]

Như vậy, có thể nói chủng *Bacillus* B68 và chủng *Pseudomonas* T15 có chỉ số hòa tan lân khá cao, có tiềm năng ứng dụng cao cho việc hòa tan lân khó tan trong đất.



Hình 1. Khả năng hòa tan lân trên môi trường thạch đĩa Pikovskaya's của một số chủng vi khuẩn *Bacillus* và *Pseudomonas* sau 5 ngày ủ

A30 và B68: các chủng *Bacillus*; T6, T13, T15, T14, T21 và T1: các chủng *Pseudomonas*



Hình 2. Tình gây độc cho cây trồng của các chủng *Bacillus* và *Pseudomonas* có khả năng hòa tan lân ở thời điểm 10 ngày

DC: Đối chứng; A30, C6, A18, A76 và B68: các chủng *Bacillus*;

T6, T13, T14, T21 và T15: các chủng *Pseudomonas*

3.2. Nghiên cứu môi trường nhân giống cấp 1

Sau khi nhân giống trên 3 môi trường thí nghiệm, vi khuẩn B68 còn khả năng hòa tan lân với chỉ số hòa tan lân lần lượt là 2,85; 2,84 và 2,86. Như vậy, các môi trường không có ảnh hưởng nhiều đến hoạt tính phân giải lân của vi khuẩn *Bacillus* B68.

Bảng 3. Mật độ tế bào vi khuẩn *Bacillus* B68 sau 24 giờ và 48 giờ nuôi cấy ở các môi trường nhân giống cấp 1

Môi trường	Mật độ tế bào (CFU/mL)	
	24 giờ	48 giờ
NB	1,54 x 10 ¹⁰ a	1,78 x 10 ⁹ a
TGYEB	2,07 x 10 ⁹ b	1,74 x 10 ⁹ a
TSB	2,03 x 10 ¹⁰ a	8,75 x 10 ⁹ a

Các số trung bình theo cột có cùng kí tự kèm theo không khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,01$

Từ Bảng 2 cho thấy sau 24 giờ nuôi cấy ở môi trường TSB, vi khuẩn *Bacillus* B68 đạt mật độ trung bình cao nhất (2,03 x 10¹⁰ CFU/mL). Tuy nhiên, mật độ vi khuẩn trung bình ở môi trường TSB không có sự khác biệt về mặt thống kê ($p < 0,01$) so với môi trường NB. Sau 48 giờ nuôi cấy, mật độ vi khuẩn trung bình ở cả 3 môi trường đều giảm.

Cả 2 môi trường TSB và NB đều thích hợp cho sự phát triển của vi khuẩn *Bacillus* B68. Tuy nhiên, trong nhiều nghiên cứu, môi trường TSB được sử dụng cho việc nhân nuôi *Bacillus* sp. như sử dụng môi trường TSB để lên men *Bacillus thuringiensis* [3], sử dụng môi trường TSB để nhân nuôi *B. methanolicus* MGA3 và *B. licheniformis* [1], môi trường TSB cũng là môi trường thích hợp để nhân nuôi *Bacillus subtilis* EAG-2 [2]... Vì thế, môi trường TSB với thời gian nuôi cấy 24 giờ được lựa chọn để tiến hành tăng sinh cấp 1 cho vi khuẩn *Bacillus* B68.

Đối với *Pseudomonas* T15, chỉ số hòa tan lân sau khi nuôi cấy trên ba môi trường NB, TSB và King's B lần lượt là 4,55; 4,45 và 4,48 và không có sự khác biệt về mặt thống kê ở 3 môi trường này. Điều này cho thấy cả 3 môi trường đều không ảnh hưởng đến khả năng hòa tan lân của vi khuẩn *Pseudomonas* T15.

Bảng 4. Mật độ tế bào vi khuẩn *Pseudomonas* T15 sau 24 giờ và 48 giờ nuôi cấy ở các môi trường nhân giống cấp 1

Môi trường	Mật độ tế bào (CFU/mL)	
	24 giờ	48 giờ
NB	3,35 x 10 ¹⁴ b	3,23 x 10 ¹¹ c
TSB	1,52 x 10 ¹⁴ c	6,26 x 10 ¹³ b
King's B	2,31 x 10 ¹⁸ a	1,65 x 10 ¹⁵ a

Các số trung bình theo cột có cùng kí tự kèm theo không khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,01$

Kết quả từ Bảng 3 cho thấy sau 24 giờ nuôi cấy ở môi trường King's B, vi khuẩn *Pseudomonas* T15 phát triển tốt và đạt mật độ tế bào trung bình cao nhất ($2,31 \times 10^{18}$ CFU/mL). Tuy nhiên, sau 48 giờ nuôi cấy mật độ tế bào của dòng vi khuẩn T15 ở cả 3 môi trường đều giảm.

Từ kết quả trên, môi trường King's B với thời gian nuôi cấy là 24 giờ được lựa chọn để tiến hành tăng sinh cấp 1 cho vi khuẩn *Pseudomonas* T15.

3.3. Nghiên cứu môi trường nhân giống cấp 2

Kết quả cho thấy chỉ số hòa tan lân của vi khuẩn *Bacillus* B68 trong cả 3 môi trường RĐ – TB, LB, TYE lần lượt là 2,87; 2,86; 2,86 và không có sự khác biệt về mặt thống kê. Vì thế, cả 3 môi trường đều không ảnh hưởng đến hoạt tính hòa tan lân của vi khuẩn *Bacillus* B68.

Bảng 5. Mật độ tế bào vi khuẩn *Bacillus* B68 sau 24 giờ và 48 giờ nuôi cấy trong các môi trường nhân giống cấp 2

Môi trường	Mật độ tế bào (CFU/mL)	
	24 giờ	48 giờ
RĐ - TB	$4,47 \times 10^{11}$ a	$2,97 \times 10^{11}$ a
LB	$2,11 \times 10^{10}$ b	$7,72 \times 10^9$ b
TYE	$1,44 \times 10^{10}$ b	$9,67 \times 10^9$ b

Các số trung bình theo cột có cùng kí tự kèm theo không khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,01$

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy sau 24 giờ cấy trong môi trường RĐ - TB, mật độ tế bào trung bình của dòng vi khuẩn *Bacillus* B68 cao nhất ($4,47 \times 10^{11}$ CFU/mL). Trên cả ba môi trường, số lượng tế bào ở thời điểm 48 giờ nuôi cấy đều giảm so với thời điểm 24 giờ nuôi cấy.

Như vậy, trong 3 môi trường đã khảo sát, môi trường RĐ - TB với thời gian nuôi cấy 24 giờ là thích hợp nhất cho việc tăng sinh cấp 2 *Bacillus* B68 với mật độ tế bào tương đối ổn định. Hơn nữa, môi trường RĐ - TB với thành phần như rỉ đường và tinh bột là nguồn nguyên liệu sẵn có với giá thành thấp. Vì vậy, việc sử dụng môi trường RĐ - TB làm môi trường tăng sinh cấp 2 có ý nghĩa về mặt kinh tế.

Đối với vi khuẩn *Pseudomonas* T15, chỉ số hòa tan lân lần lượt là 4,47; 4,53; 4,77 không có sự khác biệt về thống kê giữa cả 3 môi trường NBRIP-BĐ, TGYE, NBRIP-RĐ. Điều này cho thấy cả 3 môi trường đều không ảnh hưởng đến hoạt tính hòa tan lân của vi khuẩn *Pseudomonas* T15.

Bảng 6. Mật độ tế bào vi khuẩn *Pseudomonas T15* sau 24 giờ và 48 giờ cấy trong các môi trường nhân giống cấp 2

Môi trường	Mật độ tế bào (CFU/mL)	
	24 giờ	48 giờ
NBRIP-BĐ	$1,39 \times 10^{12}$ c	$1,54 \times 10^8$ c
TGYE	$1,73 \times 10^{20}$ b	$1,10 \times 10^{20}$ b
NBRIP-RĐ	$2,04 \times 10^{21}$ a	$1,42 \times 10^{21}$ a

Các số trung bình theo cột có cùng kí tự kèm theo không khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,01$

Kết quả từ Bảng 5 cho thấy sau 24 giờ nuôi cấy, ở môi trường NBRIP-RĐ mật độ tế bào trung bình cao nhất ($2,04 \times 10^{21}$ CFU/mL). Sau 48 giờ nuôi cấy, mật độ tế bào ở cả 3 môi trường đều giảm.

Vì thế, môi trường NBRIP-RĐ và thời gian nuôi cấy là 24 giờ được chọn làm môi trường nhân giống cấp 2 cho đồng vi khuẩn *T15*.

3.4. Nghiên cứu chất mang thích hợp cho vi khuẩn

Đối với vi khuẩn *Bacillus B68*, kết quả cho thấy chỉ số hòa tan lân sau 30 ngày bảo quản ở hầu hết các nghiệm thức đều giảm không đáng kể và không có sự khác biệt có ý nghĩa về thống kê ở 7 nghiệm thức. Điều này chứng tỏ các nghiệm thức này đều không ảnh hưởng đến hoạt tính hòa tan lân của vi khuẩn *Bacillus B68*.

Bảng 6. Mật độ vi khuẩn *Bacillus B68* trong chất mang sau thời gian bảo quản 30 ngày

Nghiệm thức	Mật độ tế bào (CFU/g)	
	02 ngày	30 ngày
NT1	$5,64 \times 10^{15}$ c	$9,40 \times 10^{12}$ b
NT2	$4,71 \times 10^{13}$ c	$2,32 \times 10^{13}$ b
NT3	$4,15 \times 10^{15}$ c	$1,47 \times 10^{15}$ b
NT4	$4,94 \times 10^{13}$ c	$5,74 \times 10^{13}$ b
NT5	$2,60 \times 10^{14}$ b	$5,42 \times 10^{14}$ a
NT6	$4,04 \times 10^{14}$ ab	$1,91 \times 10^{15}$ a
NT7	$5,21 \times 10^{14}$ a	$1,66 \times 10^{15}$ a

Các số trung bình theo cột có cùng kí tự kèm theo không khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,01$

Kết quả từ Bảng 6 cho thấy sau 30 ngày bảo quản, mật độ tế bào ở nghiệm thức 6 (phân hữu cơ 70% + cám gạo 30%) cao nhất ($1,91 \times 10^{15}$ CFU/g) và không có sự khác biệt có ý nghĩa với nghiệm thức 5 (phân hữu cơ) và 7 (phân hữu cơ 75% + cám gạo 25%) ($p < 0,01$). Vi khuẩn *Bacillus* trước khi chủng vào chất mang đã được sốc nhiệt ở 80°C trong 15 phút để tạo bào tử do *Bacillus* có khả năng tạo bào tử giúp chúng có thể tồn tại trong điều kiện bất lợi. Tuy nhiên, có thể vẫn còn một lượng ít vi khuẩn chưa tạo bào tử mà ở nghiệm thức 1, 2 và 3 có thành phần môi trường chất mang chủ yếu là than bùn ở dạng vật chất trơ (mặc dù có bổ sung 2% cám gạo hoặc 2% ri đường) nên sau

một thời gian bảo quản vi khuẩn không được cung cấp dinh dưỡng, khả năng sống suy giảm dần đến sau 30 ngày mật độ tế bào *Bacillus* ở các nghiệm thức này giảm. Thành phần chủ yếu ở nghiệm thức 5, 6 và 7 là phân hữu cơ (ở đây là phân trùn quế) chứa hàm lượng dinh dưỡng nên sau khi bào tử *Bacillus* B68 được chủng vào, bào tử *Bacillus* B68 có thể nảy mầm lại và tiếp tục phát triển dẫn đến tăng mật độ tế bào. Vì thế, cả 3 nghiệm thức 5, 6 và 7 đều đảm bảo mật độ *Bacillus* B68 sau thời gian 30 ngày bảo quản nên nghiệm thức 5 với thành phần là phân hữu cơ có giá thành rẻ và dễ kiếm được chọn là chất mang thích hợp cho *Bacillus* B68.

Đối với vi khuẩn *Pseudomonas* T15, chỉ số hòa tan lần giảm không đáng kể sau 30 ngày bảo quản và không có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê giữa các nghiệm thức. Điều này cho thấy các chất mang thí nghiệm đều không ảnh hưởng nhiều đến khả năng hòa tan lần của vi khuẩn *Pseudomonas* T15.

Bảng 7. Mật độ vi khuẩn *Pseudomonas* T15 trong chất mang sau thời gian bảo quản 30 ngày

Nghiệm thức	Mật độ tế bào (CFU/g)	
	02 ngày	30 ngày
NT1	$7,47 \times 10^{23}$ c	$1,98 \times 10^{10}$ f
NT2	$2,13 \times 10^{24}$ ab	$3,17 \times 10^{12}$ d
NT3	$8,69 \times 10^{23}$ c	$1,29 \times 10^{11}$ e
NT4	$1,81 \times 10^{24}$ b	$7,30 \times 10^{13}$ c
NT5	$3,57 \times 10^{24}$ a	$9,54 \times 10^{15}$ b
NT6	$3,75 \times 10^{24}$ a	$2,11 \times 10^{17}$ a
NT7	$3,65 \times 10^{24}$ a	$1,92 \times 10^{17}$ a
CV (%)	0,40	1,10

Các số trung bình theo cột có cùng kí tự kèm theo không khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,01$

Bảng 7 cho thấy mật độ vi khuẩn của tất cả nghiệm thức môi trường chất mang đều giảm đáng kể sau 30 ngày ủ. Trong đó, nghiệm thức 6 và 7 với thành phần là phân hữu cơ và cám gạo có mật độ vi khuẩn còn sống cao hơn (lần lượt là $2,11 \times 10^{17}$ CFU/g và $1,92 \times 10^{17}$ CFU/g). Mật độ vi khuẩn *Pseudomonas* T15 giảm do chúng không có khả năng tạo bào tử để tồn tại lâu dài nên sau một thời gian bảo quản, khả năng sống suy giảm dần đến mật độ giảm đi.

Nghiệm thức 6 (phân hữu cơ 70% + cám gạo 30%) và nghiệm thức 7 (phân hữu cơ 75% + cám gạo 25%) không có sự khác biệt về thống kê ($p < 0,01$). Điều này cho thấy 2 nghiệm thức này đều là chất mang phù hợp cho vi khuẩn *Pseudomonas* T15. Tuy nhiên, do tính kinh tế, nghiệm thức 7 có thành phần phân hữu cơ 75% + cám gạo 25% được chọn là chất mang thích hợp cho vi khuẩn *Pseudomonas* T15.

4. Kết luận

Đã tạo ra chế phẩm hòa tan lần từ vi khuẩn *Bacillus* B68 và vi khuẩn *Pseudomonas* T15 có khả năng hòa tan lần khó tan khá cao và không gây độc cho cây trồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chi O.C. (2008), *Growth of B. methanolicus MGA3 and B. licheniformis in artificial seawater media*, Master's Theses and Graduate Research, San Jose State University.
2. Ghafoor A. and Hasnain S. (2009), "Production dynamics of *Bacillus subtilis* strain AG-1 and EAG-2, producing moderately alkaline proteases", *African Journal of Microbiology Research*, 3(5), pp.258-263.
3. Khanh Dang Vu, Tyagi R.D., Surampalli R.Y. and Valéro J.R. (2012), "Mathematical relationships between spore concentrations, delta-endotoxin levels, and entomotoxicity of *Bacillus thuringiensis* preparations produced in different fermentation media", *Bioresource Technology*, 123, pp.303-311.
4. Nautiyal C.S. (1999), "An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms", *FEMS Microbiology Letters*, 170, pp.265-270.
5. Parani K. and Saha B.K. (2012), "Prospects of using phosphate solubilizing *Pseudomonas* as bio fertilizer", *European Journal of Biological Sciences*, 4(2), pp. 40-44.
6. Rath C.C. and Jena S.K. (2013), "Optimization of culture on conditions of phosphate solubilizing activity of bacterial sp. isolated from simlipal biosphere reserve in solid-state cultivation by response surface methodology", *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(5), pp. 47-59.
7. Rodríguez H. and Fraga R. (1999), "Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion", *Biotechnol. Adv.*, 17(4-5), pp. 319-339.
8. Shariati S., Alikhani H.A. and Pourbabaie A. (2013), "Application of vermicompost as a carrier of phosphate solubilizing bacteria (*Pseudomonas fluorescens*) in increase growth parameters of maize", *Intl. J. of Agron. and Plant. Pro.*, 4(8), pp. 2010-2017.
9. Sinha S.N. and Paul D. (2013), "Phosphate solubilizing activity of some bacterial strains isolated from jute mill effluent exposed water of river Ganga", *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, 3(3), pp.39-45.
10. Tripti, Vipin K. and Anshumali (2012), "Phosphate solubilizing activity of some bacterial strains isolated from chemical pesticide exposed agriculture soil", *International Journal of Engineering Research and Development*, 3(9), pp.01-06.

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 04-9-2015; ngày phản biện đánh giá: 01-02-2016;
ngày chấp nhận đăng: 17-3-2016)