

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY DÒNG VI KHUẨN CHỊU MẶN CÓ KHẢ NĂNG HÒA TAN LÂN *Pantoea* sp. TTB4.1

Trần An Bình, Trương Thị Anh Thư, Nguyễn Vĩnh Thái,
Nguyễn Chánh Tín, Trần Võ Khánh Toàn, Trần Văn Bé Năm, Trần Thị Giang*
Trường Đại học Cần Thơ

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.2023.1.003-011>

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là chọn lọc được nguồn carbon và nitrogen trong môi trường nuôi cấy dòng vi khuẩn chịu mặn có khả năng hòa tan lân *Pantoea* sp. TTB4.1 cho hàm lượng lân hòa tan cao nhất. Đồng thời nghiên cứu này cũng thực hiện tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng hòa tan lân của dòng vi khuẩn *Pantoea* sp. TTB4.1 theo mô hình RSM-CCD (Response surface methodology-Central composite design). Bốn yếu tố được tối ưu bao gồm nồng độ carbon (5-15 g/L), nồng độ nitrogen (0,05-0,15 g/L), pH ban đầu (6,0-8,0), và mật số giống chủng (7,7-11,7 log(CFU/mL)). Kết quả cho thấy rằng glucose và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lần lượt là nguồn carbon và nitrogen thích hợp để dòng vi khuẩn *Pantoea* sp. TTB4.1 hòa tan lân cao nhất. Bên cạnh đó, kết quả tối ưu hóa theo mô hình RSM-CCD xác định nồng độ glucose từ 11,52-12,49 g/L, nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ từ 0,112-0,118 g/L, pH ban đầu từ 7,4-7,5 và mật số giống chủng từ 10,4-10,7 log(CFU/mL) là điều kiện tối ưu để thu được lượng lân hòa tan tốt nhất từ 1.369,99-1.372,62 mg/L, đạt hiệu suất khoảng 44,8% so với lượng $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (5 g/L) được bổ sung ban đầu.

Từ khóa: *Pantoea* sp. TTB4.1, RSM-CCD, tối ưu hóa, vi khuẩn chịu mặn, vi khuẩn hòa tan lân.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Phospho (P) hay còn gọi là lân là một trong những chất dinh dưỡng chính cho sự sinh trưởng và phát triển của thực vật. Phospho được tìm thấy trong tất cả các tế bào sống của thực vật. Nó đóng vai trò quan trọng trong nhiều chức năng của thực vật, chẳng hạn như vận chuyển năng lượng, quang hợp, vận chuyển đường và tinh bột, vận chuyển chất dinh dưỡng trong cơ thể cây trồng và di truyền các đặc tính của gen từ thế hệ này sang thế hệ khác [3]. Trong cây trồng, phospho lưu trữ trong rễ hoặc được vận chuyển đến các bộ phận bên trên của cây. Qua nhiều phản ứng hóa học khác nhau, phospho tham gia vào quá trình hình thành nên các hợp chất hữu cơ như: các nucleic acid (DNA và RNA), các phospholipid, các hợp chất phospho giàu năng lượng như chất andenosine triphosphate (ATP), các enzyme, các phosphoprotein và các đường phosphate [7]. Trong đất, phospho tồn tại ở hai dạng vô cơ và hữu cơ nhưng chủ yếu ở dưới dạng không hòa tan nên cây trồng khó hấp thu được. Để tăng hiệu suất sử dụng lân thì việc sử dụng các vi sinh vật chuyển hóa lân là một trong những giải pháp thân thiện với môi trường và hữu hiệu trong quản lý sự thiếu hụt phospho trong đất nông nghiệp [11]. Vi sinh vật chuyển hóa lân trong đất chủ yếu là nhóm vi khuẩn vùng

rễ kích thích sinh trưởng ở thực vật (Plant Growth Promoting Rhizobacteria – PGPR). PGPR là vi khuẩn trong đất, sinh sống xung quanh hoặc trên bề mặt rễ, trực tiếp hoặc gián tiếp tham gia việc kích thích sinh trưởng và phát triển của thực vật thông qua sản xuất và tiết ra những chất hóa học khác nhau ở xung quanh vùng rễ [5].

Trong những năm gần đây, đồng bằng sông Cửu Long chịu ảnh hưởng của xâm nhập mặn ngày càng sâu hơn và cường độ mặn cũng tăng nhiều hơn [2]. Nhiều nghiên cứu đã tổng hợp và báo cáo về khả năng chịu mặn cao cũng như thúc đẩy cây trồng phát triển tốt ở đất ảnh hưởng mặn của PGPR [1, 15], trong số đó có các vi khuẩn có khả năng hòa tan lân (Phosphate Solubilizing Bacteria-PSB). Chính vì những lý do tiềm năng đó mà PSB đã được ứng dụng nhiều trong sản xuất phân bón sinh học nhằm thay thế hoặc giảm lượng phân bón hóa học. Do đó nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu xác định môi trường tối ưu nhất để nâng cao hiệu quả hòa tan lân nhằm hướng đến việc ứng dụng vào sản xuất nông nghiệp bền vững.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Dòng vi khuẩn *Pantoea* sp. TTB4.1 đã được tuyển chọn từ đất vùng rễ trồng cây ăn quả tại tỉnh Bến Tre, đồng bằng sông Cửu Long trong

Corresponding author: tgiang@ctu.edu.vn

đợt hạn mặn năm 2021 diễn ra tại khu vực đồng bằng sông Cửu Long [16]. Dòng vi khuẩn được phân lập trên môi trường NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate) có bổ sung 10 g/L NaCl. Thành phần 1 lít môi trường NBRIP gồm có 10 g glucose, 5 g Ca₃(PO₄)₂, 5 g MgCl₂·6H₂O, 0,25 g MgSO₄·7H₂O, 0,2 g KCl, 0,1 g (NH₄)₂SO₄.

2.2. Khảo sát ảnh hưởng của các nguồn carbon lên khả năng hòa tan lân của dòng vi khuẩn *Pantoea* sp. TTB4.1

Dòng vi khuẩn chịu mặn có khả năng hòa tan lân *Pantoea* sp. TTB4.1 được nuôi tăng sinh trong môi trường NBRIP lỏng có bổ sung 10 g/L NaCl với các nguồn carbon khác nhau để khảo sát khả năng hòa tan lân của dòng vi khuẩn. Vi

$$\text{Tỷ lệ lân hòa tan (\%)} = \frac{\text{Hàm lượng lân hòa tan (mg PO}_4^{3-}/\text{L)}}{\text{Hàm lượng lân ban đầu (mg PO}_4^{3-}/\text{L)}} \times 100 (\%)$$

2.3. Khảo sát ảnh hưởng của các nguồn nitrogen lên khả năng hòa tan lân của dòng vi khuẩn *Pantoea* sp. TTB4.1

Sau khi chọn được nguồn carbon tối ưu dòng vi khuẩn *Pantoea* sp. TTB4.1 sẽ tiếp tục được nuôi tăng sinh trong môi trường NBRIP lỏng có bổ sung 10 g/L NaCl với các nguồn nitrogen khác nhau kết hợp với nguồn carbon tối ưu nhất để khảo sát khả năng hòa tan lân. Thí nghiệm được thực hiện như sau 0,2 mL dịch huyền phù vi khuẩn (OD₆₀₀ = 0,8) được chủng vào 20 mL môi trường NBRIP lỏng có nguồn nitrogen khác nhau như NH₄Cl, NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄, urea, yeast extract với nồng độ 0,1 g/L. Tất cả các nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Các ống falcon sau đó được đặt trên máy lắc 120 vòng/phút ở nhiệt độ phòng và được thu để đo hàm lượng lân hòa tan sau 5, 10, 15 ngày nuôi cấy bằng phương pháp molybdenum blue (OD₈₄₀) [8, 13].

khuẩn *Pantoea* sp. TTB4.1 được nuôi tăng sinh môi trường LB lỏng sau 18 giờ. Độ hấp thụ của dịch tăng sinh ở bước sóng 600 nm được điều chỉnh về 0,8 [12]. 0,2 mL dịch huyền phù vi khuẩn (OD₆₀₀ = 0,8) được chủng vào 20 mL môi trường NBRIP lỏng có các nguồn carbon khác nhau như glucose, sucrose, mannitol, tinh bột, glycerol với nồng độ 10 g/L. Tất cả các nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Các ống falcon sau đó được đặt trên máy lắc 120 vòng/phút ở nhiệt độ phòng [12] và được thu để đo hàm lượng lân hòa tan sau 5, 10, 15 ngày nuôi cấy bằng phương pháp molybdenum blue (OD₈₄₀) [8, 13]. Tỷ lệ hàm lượng lân hòa tan PO₄³⁻ (%) được tính theo công thức:

2.4. Tối ưu điều kiện nuôi cấy để dòng vi khuẩn chịu mặn có khả năng hòa tan lân *Pantoea* sp. TTB4.1 đạt được hiệu quả hòa tan lân tốt nhất

Sau khi đã xác định được nguồn carbon và nitrogen thích hợp cho dòng vi khuẩn hòa lân có khả năng chịu mặn, tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy cần phải được thực hiện để xác định điều kiện tối ưu cũng như đánh giá sự tương tác giữa các yếu tố đó lên khả năng hòa tan của dòng vi khuẩn được chọn lọc. Môi trường NBRIP có bổ sung 10 g/L NaCl nuôi cấy dòng vi khuẩn *Pantoea* sp. TTB4.1 sẽ được tối ưu theo mô hình RSM-CCD (phương pháp đáp ứng bề mặt -thiết kế cấu trúc có tâm). Các yếu tố được tối ưu bao gồm (A) nồng độ carbon (g/L), (B) nồng độ nitrogen (g/L), (C) pH ban đầu và (D) mật số giống chủng (log(CFU/mL)).

Bảng 1. Nồng độ các yếu tố dùng trong mô hình RSM-CCD

Yếu tố	Mức độ				
	-α	-1	0	+1	+α
A-Carbon (g/L)	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0
B-Nitrogen (g/L)	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50
C-pH ban đầu	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
D-Mật số giống chủng (log(CFU/mL))	7,7	8,7	9,7	10,7	11,7

Mô hình đáp ứng bề mặt theo thiết kế cấu trúc có tâm (RSM-CCD) được sử dụng để xác định các điểm tối ưu của các yếu tố cho khả

năng hòa tan của dòng vi khuẩn. Với 4 yếu tố, mỗi yếu tố được thiết kế với 5 mức độ (-α; -1; 0; +1; +α) (Bảng 1), 30 thử nghiệm (Run) được

thiết lập. Kết quả phân tích lượng lân hòa tan theo mô hình RSM-CCD được đánh giá mức ảnh hưởng và độ tin cậy để xác định phương

$$HLL = x_0 + x_1A + x_2B + x_3C + x_4D + x_5AB + x_6AC + x_7AD + x_8BC + x_9BD + x_{10}CD + x_{11}A^2 + x_{12}B^2 + x_{13}C^2 + x_{14}D^2$$

Trong đó:

A, B, C, D lần lượt là nồng độ nguồn carbon, nitrogen, pH ban đầu, mật số giống chủng;

$x_0, x_1, x_2, x_3, x_4, x_5, x_6, x_7, x_8, x_9, x_{10}, x_{11}, x_{12}, x_{13}, x_{14}$ là các biến độc lập.

Số liệu được phân tích bằng chương trình Design expert 7.0.0. Từ kết quả phân tích xác định mức tối ưu của các yếu tố cho hàm lượng lân đạt cực đại [14].

2.5. Xác nhận lại điều kiện tối ưu

Dựa trên kết quả dự kiến của thí nghiệm tối ưu, tiến hành thí nghiệm xác nhận lại 3 nghiệm thức có điều kiện tối ưu. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Kết quả thu được sẽ được so sánh với giá trị tối ưu dự kiến của mô hình RSM-CCD.

trình hồi quy của mô hình thực nghiệm [14].

Hàm lượng lân hòa tan (mg/L) được biểu diễn bằng phương trình bậc 2:

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của các nguồn carbon lên khả năng hòa tan lân của dòng vi khuẩn *Pantoea* sp. TTB4.1

Dòng vi khuẩn hòa tan lân *Pantoea* sp. TTB4.1 được nuôi trong môi trường NBRIP lỏng với nguồn carbon thay đổi khác nhau. Môi trường được cố định với pH ban đầu là 7,0, nguồn nitrogen là $(NH_4)_2SO_4$ sẽ được thu dịch để đo hàm lượng lân hòa tan sau 5, 10 và 15 ngày. Kết quả hàm lượng lân hòa tan được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Hàm lượng lân hòa tan (mg/L) của *Pantoea* sp. TTB4.1 qua các ngày ở các nguồn carbon khác nhau

Nguồn carbon	Thời gian		
	5 ngày	10 ngày	15 ngày
Glucose	1.032,0±19,8 ^a	1.326,6±16,4 ^a	1.239,9±26,6 ^a
Sucrose	85,9±2,3 ^d	83,4±5,1 ^d	79,2±1,7 ^d
Mannitol	563,7±12,2 ^b	600,0±12,2 ^b	594,0±21,7 ^b
Tinh bột	61,1±2,0 ^d	52,4±2,4 ^c	55,2±5,4 ^d
Glycerol	183,4±10,2 ^c	268,8±5,2 ^c	245,7±14,6 ^c
P	0,00	0,00	0,00
CV(%)	2,97	2,09	3,81

Ghi chú: Các giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. Các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trên cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với độ tin cậy 95%.

Qua Bảng 2, kết quả cho thấy với môi trường nuôi cấy có các nguồn carbon khác nhau thì lượng lân hòa tan được cũng khác biệt nhau rõ rệt. Vượt trội nhất so với các nguồn carbon khác, glucose cho khả năng hòa tan lân cao nhất qua các ngày là: 1.032,0±19,8 mg/L (ngày 5), 1.326,6±16,4 mg/L (ngày 10), 1.239,9±26,6 mg/L (ngày 15). Với lượng lân hòa tan cao nhất vào ngày 10 khoảng 1.326,6 mg/L dòng vi khuẩn đã hòa tan được khoảng 43,35% lượng $Ca_3(PO_4)_2$ ban đầu. Bên cạnh đó, hàm lượng lân hòa tan qua các ngày cũng có sự khác biệt. Nhìn chung hàm lượng lân hòa tan tăng ở ngày 5 và

10, trong đó ngày 10 hàm lượng lân hòa tan thu được cao nhất. Đây có thể là khoảng thời gian vi khuẩn thích nghi được với môi trường và thể hiện khả năng hòa tan lân mạnh nhất. Ở ngày 15 lượng lân hòa tan bắt đầu giảm, nguyên nhân có thể là do hàm lượng dinh dưỡng trong môi trường dần cạn kiệt theo thời gian, một lượng lớn sản phẩm phụ không mong muốn (đặc biệt là các acid hữu cơ) được sinh ra trong quá trình hòa tan lân đã ức chế sự phát triển và chuyển hóa của vi khuẩn [10, 19].

Thí nghiệm của Lebrazi và cộng sự [10] đã tối ưu hóa môi trường và tuyển chọn được

nguồn carbon tối ưu nhất là nguồn glucose cho các dòng vi khuẩn vùng rễ được phân lập từ nốt sần trên rễ *Acacia cyanophylla*. Dòng nấm mốc *Aspergillus* sp. M33 được Phạm Thị Ngọc Lan và Hoàng Dương Thu Hương [9] tối ưu môi trường nuôi cấy với nguồn carbon thích hợp nhất cho sinh trưởng và phát triển là tinh bột. Nghiên cứu của Nguyễn Thu Hương và cộng sự [4] cũng đã tuyển chọn được nguồn carbon là glucose cho môi trường NBRIP nuôi cấy dòng vi khuẩn hòa tan lân *Pseudomonas*

aeruginosa HD3.

3.2 Khảo sát ảnh hưởng của các nguồn nitrogen lên khả năng hòa tan lân của dòng vi khuẩn *Pantoea* sp. TTB4.1

Dòng vi khuẩn hòa tan lân *Pantoea* sp. TTB4.1 sau khi tuyển chọn được nguồn glucose là nguồn carbon tối ưu nhất sẽ được tiếp tục nuôi trong môi trường NBRIP lỏng với nguồn carbon đã được tối ưu và thay đổi nguồn nitrogen khác nhau. Kết quả hàm lượng lân hòa tan sau 5, 10 và 15 ngày được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Hàm lượng lân hòa tan (mg/L) của *Pantoea* sp. TTB4.1 qua các ngày ở các nguồn nitrogen khác nhau

Nguồn nitrogen	Thời gian		
	5 ngày	10 ngày	15 ngày
NH ₄ Cl	984,1±15,2 ^b	1.074,6±14,0 ^c	1.059,6±7,6 ^c
NH ₄ NO ₃	821,2±16,6 ^c	1.199,3±66,9 ^b	1.155,4±11,4 ^b
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.069,0±29,5 ^a	1.329,0±28,5 ^a	1.268,3±10,1 ^a
Urea	959,7±24,6 ^b	1.231,0±23,3 ^b	1.193,3±22,4 ^b
Yeast extract	932,1±11,0 ^b	1.223,3±14,2 ^b	1.177,4±15,1 ^b
P	0,00	0,00	0,00
CV(%)	2,15	2,92	1,22

Ghi chú: Các giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. Các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trên cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với độ tin cậy 95%.

Kết quả Bảng 3 cho thấy hàm lượng lân hòa tan thu được khác nhau khi thay đổi các nguồn nitrogen khác nhau trong môi trường nuôi cấy. Với nguồn nitrogen (NH₄)₂SO₄, dòng vi khuẩn *Pantoea* sp. TTB4.1 cho hàm lượng lân hòa tan cao nhất, cụ thể hàm lượng lân hòa tan thu được lần lượt là 1.069,0±29,5 mg/L (ngày 5), 1.329,0±28,5 mg/L (ngày 10) và 1.268,3±10,1 mg/L (ngày 15). Nhìn chung với các nguồn nitrogen NH₄Cl, NH₄NO₃, Urea, Yeast extract cho lượng lân hòa tan thấp hơn (NH₄)₂SO₄ và khác biệt có ý nghĩa thống kê. Cùng với lượng lân hòa tan khác nhau giữa các nguồn nitrogen thì lượng lân hòa tan qua các ngày cũng có sự khác biệt. Cụ thể hàm lượng lân tăng dần từ ngày 5 đến ngày 10 sau đó giảm vào ngày 15. Nguyên nhân lượng lân hòa tan tăng từ ngày 5 đến ngày 10 do đây là khoảng thời gian dòng vi khuẩn phát triển mạnh nhất. Sau đó giảm ở ngày 15 có thể do các sản phẩm phụ không cần thiết sinh ra trong quá trình hòa tan lân như acid acetic, gluconic, glycolic, isobutyric, isovaleric, lactic, malonic, oxalic, và succinic làm ức chế ngược lại khả năng hòa tan lân [10, 18].

Trong nghiên cứu của Phạm Thị Ngọc Lan và Hoàng Dương Thu Hương [9] đã chọn được cao thịt là nguồn nitrogen tối ưu cho 2 chủng nấm mốc có khả năng hòa tan lân *Aspergillus* sp. M33 và *Aspergillus* sp. M72. Nghiên cứu của Lebrazi và cộng sự [10] về tối ưu hóa khả năng hòa tan phosphate của các chủng vi khuẩn vùng rễ đã chọn được (NH₄)₂SO₄ là nguồn nitrogen cho chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. CS14. Chủng *Pseudomonas aeruginosa* HD3 đã được Nguyễn Thu Hương và cộng sự [4] phân lập và xác định được nguồn nitrogen hữu cơ trong môi trường NBRIP nuôi cấy chủng vi khuẩn này là cao nấm men và nguồn nitrogen vô cơ lần lượt là (NH₄)₂SO₄, NH₄H₂PO₄, NH₄NO₃. Kết hợp kết quả của Bảng 2 và Bảng 3 cho thấy dòng vi khuẩn *Pantoea* sp. TTB4.1 được nuôi trong môi trường NBRIP với nguồn carbon là glucose, nguồn nitrogen là (NH₄)₂SO₄ và được nuôi ở ngày 10 sẽ cho kết quả hàm lượng lân hòa tan cao nhất với tỉ lệ lượng lân hòa tan khoảng 43,43%.

3.3. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy để dòng vi khuẩn chịu mặn có khả năng hòa tan lân *Pantoea* sp. TTB4.1 đạt được hiệu quả hòa tan lân tốt nhất

Sau khi tuyển chọn được nguồn carbon và nitrogen tối ưu nhất cho môi trường NBRIP nuôi cấy dòng vi khuẩn *Pantoea* sp. TTB4.1 là glucose và $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dòng vi khuẩn *Pantoea* sp. TTB4.1 sẽ được tối ưu các yếu tố bao gồm

(A) nồng độ glucose (g/L), (B) nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L), (C) pH ban đầu và (D) mật số giống chủng ($\log(\text{CFU}/\text{mL})$). Các nghiệm thức được thực hiện theo mô hình RSM-CCD để xác định điểm tối ưu của các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng hòa tan lân của dòng vi khuẩn, qua đó tìm được nồng độ thích hợp để nuôi cấy dòng vi khuẩn *Pantoea* sp. TTB4.1.

Bảng 4. Kết quả các nghiệm thức theo mô hình RSM-CCD

Run	Glucose (g/L)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	pH ban đầu	Mật số $\log(\text{CFU}/\text{mL})$	Hàm lượng lân hòa tan thực tế (mg/L)	Hàm lượng lân hòa tan dự đoán (mg/L)
1	12,5	0,075	7,5	10,7	1.241,77	1.235,24
2	10,0	0,100	7,0	9,7	1.302,50	1.290,49
3	7,5	0,075	7,5	8,7	1.123,21	1.141,26
4	12,5	0,075	6,5	8,7	1.186,04	1.183,45
5	12,5	0,125	6,5	10,7	1.348,76	1.316,52
6	10,0	0,050	7,0	9,7	1.017,79	1.011,37
7	10,0	0,150	7,0	9,7	1.156,07	1.185,70
8	10,0	0,100	7,0	9,7	1.324,84	1.290,49
9	7,5	0,075	6,5	8,7	1.008,07	1.013,88
10	12,5	0,125	7,5	8,7	1.352,97	1.321,73
11	10,0	0,100	7,0	9,7	1.264,38	1.290,49
12	12,5	0,075	6,5	10,7	1.262,01	1.239,31
13	7,5	0,125	7,5	10,7	1.259,65	1.248,04
14	12,5	0,125	6,5	8,7	1.280,15	1.249,43
15	15,0	0,100	7,0	9,7	1.195,77	1.275,17
16	10,0	0,100	7,0	11,7	1.302,23	1.299,13
17	7,5	0,125	6,5	10,7	1.061,43	1.093,58
18	12,5	0,125	7,5	10,7	1.378,99	1.364,17
19	10,0	0,100	8,0	9,7	1.347,19	1.361,52
20	10,0	0,100	6,0	9,7	1.177,63	1.186,49
21	7,5	0,075	6,5	10,7	1.019,90	1.036,94
22	10,0	0,100	7,0	7,7	1.207,33	1.233,63
23	10,0	0,100	7,0	9,7	1.289,88	1.290,49
24	12,5	0,075	7,5	8,7	1.245,19	1.204,04
25	10,0	0,100	7,0	9,7	1.272,00	1.290,49
26	7,5	0,125	7,5	8,7	1.224,68	1.238,39
27	7,5	0,125	6,5	8,7	1.066,95	1.059,29
28	7,5	0,075	7,5	10,7	1.117,95	1.139,67
29	5,0	0,100	7,0	9,7	1.045,66	989,46
30	10,0	0,100	7,0	9,7	1.289,35	1.290,49

Từ Bảng 4 cho thấy ở run 18 (glucose 12,5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,125 g/L, pH ban đầu 7,5 và mật số giống chủng 10,7 $\log(\text{CFU}/\text{mL})$ hàm lượng lân hòa tan đạt giá trị cao nhất 1.378,99

mg/L. Nhìn chung kết quả hàm lượng lân hòa tan thu được sau thí nghiệm chênh lệch không đáng kể so với dự đoán của mô hình RSM-CCD, hàm lượng lân hòa tan nằm trong khoảng từ

1.000 đến 1.400 mg/L. Điều này cho thấy các yếu tố thí nghiệm có tác động mạnh đến hàm lượng lân hòa tan.

Từ kết quả hàm lượng lân hòa tan thu được qua mô hình RSM-CCD cho kết quả phân tích ANOVA (Bảng 5) với giá trị p-value của mô hình nhỏ hơn 0,0001 (có ý nghĩa thống kê) và p-value của kiểm định sự không phù hợp (lack

of fit) là 0,0659 (không có ý nghĩa thống kê) ở mức ý nghĩa 5% [17]. Trong 4 nhân tố khảo sát gồm glucose, (NH₄)₂SO₄, pH ban đầu và mật số giống chủng có 3 nhân tố tác động đơn có ý nghĩa với các giá trị p-value <0,0001 gồm có nồng độ glucose, nồng độ (NH₄)₂SO₄ và pH ban đầu.

Bảng 5. Kết quả phân tích ANOVA cho mô hình bậc hai bề mặt đáp ứng

Nguồn	Tổng bình phương	Độ tự do (df)	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P
Model	331644,7	14	23688,91	16,38111	< 0,0001
A-Carbon	122443,6	1	122443,6	84,67097	< 0,0001
B-Nitrogen	45588,53	1	45588,53	31,52492	< 0,0001
C-pH ban đầu	45955,9	1	45955,9	31,77896	< 0,0001
D-Mật số giống chủng	6435,616	1	6435,616	4,450292	0,0521
AB	423,1435	1	423,1435	0,292608	0,5965
AC	11405,27	1	11405,27	7,886859	0,0132
AD	1075,474	1	1075,474	0,743701	0,4021
BC	2675,152	1	2675,152	1,849894	0,1939
BD	126,2965	1	126,2965	0,087335	0,7716
CD	607,3815	1	607,3815	0,42001	0,5267
A ²	42891,8	1	42891,8	29,6601	< 0,0001
B ²	63167,8	1	63167,8	43,68116	< 0,0001
C ²	465,8571	1	465,8571	0,322145	0,5787
D ²	996,368	1	996,368	0,688998	0,4195
Số dư (Residual)	21691,67	15	1446,111		
LOF (Lack of Fit)	19342,23	10	1934,223	4,116353	0,0659
Sai số (Pure Error)	2349,437	5	469,8874		
R ²	0,938609				
C.V. %	3,136713				

Hệ số hồi quy (R²) tính được là 0,9386, cho thấy có 93,86% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu tiên đoán theo mô hình. Hệ số biến thiên (CV%) cho biết mức độ chính xác của thí nghiệm. Các thí nghiệm có độ tin cậy có giá trị CV% thấp. Trong thí nghiệm này, giá trị CV%

là 3,14 cho thấy các thí nghiệm được thực hiện là đáng tin cậy [6, 17].

Từ kết quả thu được sau khi phân tích ANOVA, ta có được phương trình bậc 2 dùng để dự đoán hàm lượng lân hòa tan như sau:

$$\text{Hàm lượng lân hòa tan (mg/L)} = -3.815,96801 + 264,56498A + 7.945,21315B + 548,06755C + 175,61069D + 82,28181AB - 21,35910AC + 3,27944AD + 1.034,43743BC + 112,38170BD - 12,32256CD - 6,32711A^2 - 76.783,21066B^2 - 16,48484C^2 - 6,02710D^2.$$

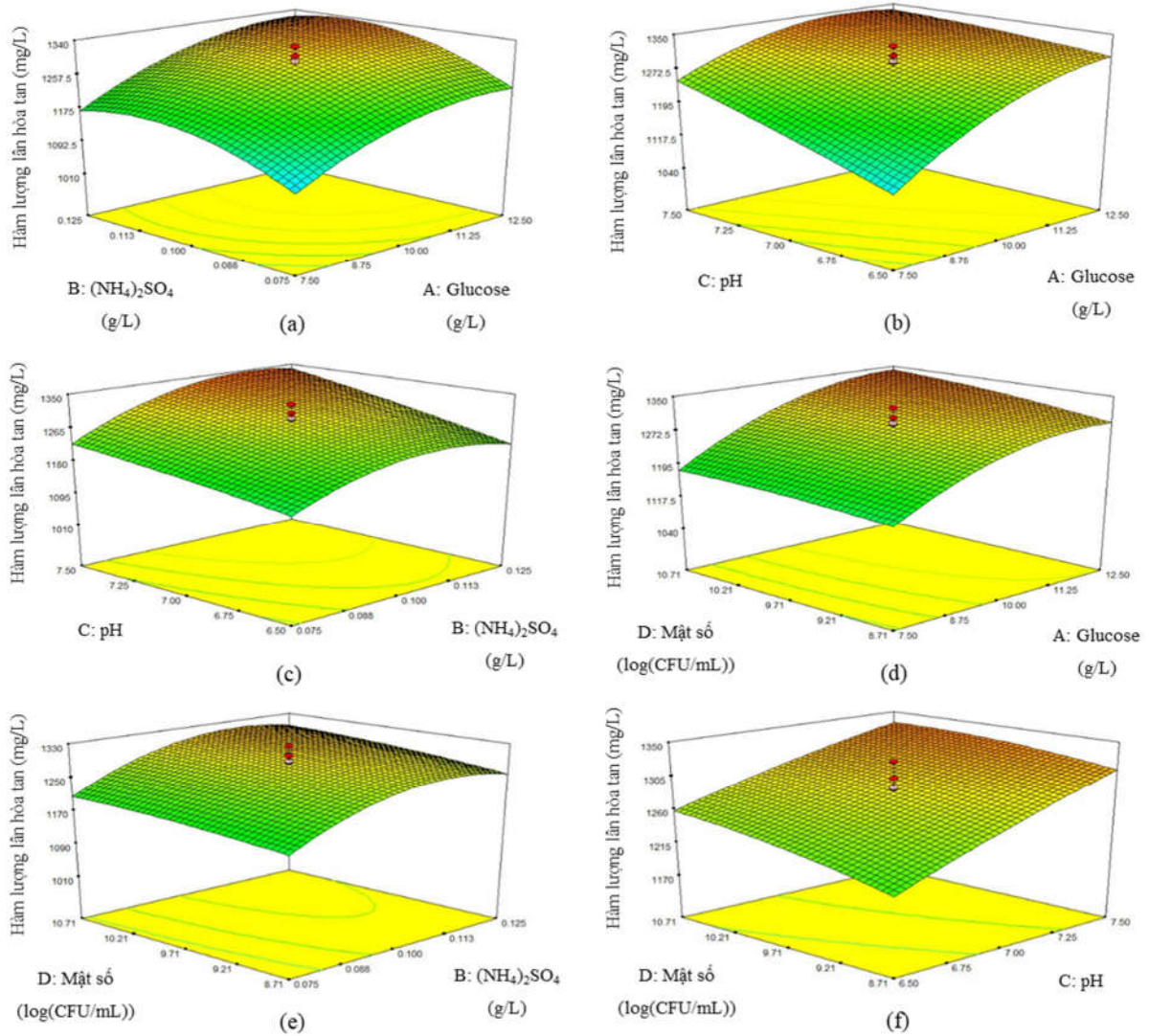
Trong đó:

A: Glucose (g/L);

B: (NH₄)₂SO₄ (g/L);

C: pH ban đầu;

D: Mật số giống chủng (log(CFU/mL)).



Hình 1. Đồ thị bề mặt đáp ứng cho biết ảnh hưởng của các cặp nhân tố đến lượng lân hòa tan
 (a) Glucose - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (b) Glucose - pH; (c) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - pH; (d) Glucose - Mật số;
 (e) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Mật số; (f) pH - Mật số

Mặt đáp ứng Hình 1 (a, b, c, d, e, f) thể hiện sự tương tác của từng cặp yếu tố và từ biểu đồ này có thể xác định được giá trị tối ưu của từng yếu tố để hàm lượng lân đạt cực đại. Qua hình ảnh của các đồ thị cho thấy lượng glucose, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và pH ban đầu có tác động đến hàm lượng lân hòa tan tăng đến điểm tối ưu.

Trong thí nghiệm của Nguyễn Thúy Hương và Mai Thực Di [6] đã sử dụng RSM-CCD đã xác định môi trường lên men bán rắn tối ưu để nuôi cấy *Aspergillus oryzae* BK0 thu lactase cực đại là (4,120 U/g) ở giá trị hàm lượng lactose 13,3%, hàm lượng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ là 1,7%, pH là 5,94, độ ẩm là 61,04%, tỉ lệ giống là 1,05%. Thí nghiệm của Nguyễn Quang Tiên và cộng sự [17] xây dựng được quy trình nuôi cấy xạ khuẩn *Streptomyces albaduncus* từ mô hình RSM-

CCD cho kết quả tiết kiệm thời gian, chi phí và thu được lượng bào tử lớn với độ ẩm ban đầu (54% v/w), thời gian ủ (3,6 ngày) và lượng CaCO_3 (3,0 g). Kết quả tối ưu cho thấy nồng độ glucose từ 11,52-12,49 g/L, nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ từ 0,112-0,118 g/L, pH ban đầu từ 7,41-7,5 và mật số giống chủng 10,4-10,7 log(CFU/mL) cho lượng lân hòa tan tốt nhất trong khoảng 1.369,99-1.372,62 mg/L, đạt hiệu suất khoảng 44,8% so với lượng $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ban đầu.

3.4. Xác nhận điều kiện tối ưu

Dựa theo kết quả phân tích của mô hình RSM-CCD, kết quả các nghiệm thức tối ưu của môi trường được chọn để thực hiện khảo sát được thể hiện ở Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả thí nghiệm xác nhận của mô hình RSM-CCD

Nghiệm thức	Glucose (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	pH ban đầu	Mật số giống chủng Log(CFU/mL)	Hàm lượng lân hòa tan dự đoán (mg/L)	Hàm lượng lân hòa tan thực tế (mg/L)
1	11,75	0,116	7,5	10,5	1.372,17	1.380,82
2	11,52	0,112	7,5	10,5	1.367,44	1.392,33
3	11,95	0,117	7,4	10,7	1.371,86	1.420,35

Dựa vào kết quả xác nhận, các nghiệm thức được thực hiện đều cho hàm lượng lân hòa tan nằm trong khoảng dự đoán của mô hình RSM-CCD. Vậy với điều kiện thực tế các môi trường RSM-CCD dự đoán mang tính chính xác cao và cho hàm lượng lân hòa tan ở mức tối ưu nhất.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được glucose và (NH₄)₂SO₄ là nguồn carbon và nitrogen tốt nhất để nuôi cấy dòng vi khuẩn hòa tan lân có khả năng chịu mặn *Pantoea* sp. TTB4.1. Kết quả tối ưu theo mô hình RSM-CCD xác định được điều kiện nuôi cấy với nồng độ glucose từ 11,52-12,49 g/L, nồng độ (NH₄)₂SO₄ từ 0,112-0,118 g/L, pH ban đầu từ 7,4-7,5 và mật số giống chủng 10,4-10,7 log(CFU/mL) cho lượng lân hòa tan tốt nhất trong khoảng từ 1.369,99-1.372,62 mg/L đạt hiệu suất khoảng 44,8% (so với lượng Ca₃(PO₄)₂ ban đầu). Kết quả thí nghiệm xác nhận cho thấy với điều kiện thực tế các điều kiện được mô hình RSM-CCD dự đoán mang tính chính xác cao và cho hàm lượng lân hòa tan ở mức tối ưu nhất.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả chân thành cảm ơn Trường Đại học Cần Thơ đã hỗ trợ kinh phí thực hiện nghiên cứu thông qua đề tài nghiên cứu khoa học cấp cơ sở, mã số T2021-135.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Rameesha Abbas, Sumaira Rasul, Kashif Aslam, Muhammad Baber, Muhammad Shahid, Fathia Mubeen & Tahir Naqqash (2019). Halotolerant PGPR: A hope for cultivation of saline soils. *Journal of King Saud University-Science*. 31(4): 1195-1201.
 [2]. Lê Tuấn Anh (2019). Quản lý tài nguyên nước bền vững, ứng phó với biến đổi khí hậu ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*. (7A): 13-15.
 [3]. Qian Chen & Shanjiang Liu (2019). Identification and characterization of the phosphate-solubilizing bacterium *Pantoea* sp. S32 in reclamation soil in Shanxi, China. *Frontiers in microbiology*. 10: 2171.

[4]. Nguyễn Văn Giang, Trần Thị Thủy Hà & Nguyễn Thu Hương (2018). Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân giải phosphate khó tan từ đất vùng rẫy lúa ở tỉnh Hải Dương. *Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*. 60(8): 18-22.

[5]. Trần Thị Giang, Cao Ngọc Diệp & Nguyễn Thị Quyên (2014). Phân lập và nhận diện vi khuẩn vùng rễ kích thích sự sinh trưởng (PGPR) từ một số loại rau ăn lá trồng tại thành phố Cần Thơ. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. (35): 65-73.

[6]. Nguyễn Thuý Hương & Mai Thục Di (2013). Tối ưu hóa sinh tổng hợp lactase từ *Aspergillus oryzae* sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt-phương án cấu trúc có tâm. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN*. 29(3): 8-16.

[7]. C. Kaur, G. Selvakumar & A.N. Ganeshamurthy (2016). Organic Acids in the Rhizosphere: Their Role in Phosphate Dissolution. In: Singh, D., Singh, H., Prabha, R. (eds) *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. Springer, New Delhi.

[8]. Ping Kong & Chuanxue Hong (2020). Endophytic Burkholderia sp. SSG as a potential biofertilizer promoting boxwood growth. *PeerJ*. 8. e9547.

[9]. Phạm Thị Ngọc Lan & Hoàng Dương Thu Hương (2014). Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy một số chủng nấm mốc hòa tan phosphate vô cơ và thử nghiệm trồng cây ngập mặn. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*. 12(8): 1294-1301.

[10]. Sara Lebrazi, Karsten Niehaus, Hanna Bednarz, Mouhcine Fadil, Marwa Chraibi & Kawtar Fikri-Benbrahim (2020). Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization by rhizobacterial strains isolated from *Acacia cyanophylla* root nodules and their effects on its plant growth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 18(1): 1-12.

[11]. Bùi Đoàn Phượng Linh, Trần Thị Thủy Tiên, Nguyễn Ngọc Hà & Huỳnh Thanh Hùng (2018). Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn phân giải lân vô cơ khó tan từ đất tại huyện Xuân Lộc, tỉnh Đồng Nai. *Tạp chí Khoa học - Đại học Đồng Nai*. 11: 142-152.

[12]. Ismail Mahdi, Nidal Fahsi, Mohamed Hafidi, Abdelmounaaim Allaoui & Latefa Biskri (2020). Plant growth enhancement using rhizospheric halotolerant phosphate solubilizing bacterium *Bacillus licheniformis* QA1 and *Enterobacter asburiae* QF11 isolated from *Chenopodium quinoa* willd. *Microorganisms*. 8(6): 948.

[13]. Samjhana Pradhan & Megh Raj Pokhrel (2013). Spectrophotometric determination of phosphate in sugarcane juice, fertilizer, detergent and water samples by molybdenum blue method. *Scientific world*. 11(11): 58-62.

[14]. T Agami Reddy (2011). Applied data analysis and modeling for energy engineers and scientists. ed. Springer Science & Business Media.

[15]. Pooja Shrivastava & Rajesh Kumar (2015). Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. Saudi journal of biological sciences. 22(2): 123-131.

[16]. Trần Trương Phương Thắm (2021). Phân lập và tuyển chọn dòng vi khuẩn chịu mặn có khả năng hòa tan lân từ đất vùng rễ cây ăn quả bị nhiễm mặn ở tỉnh Bến Tre. Luận văn tốt nghiệp đại học. Trường Đại học Cần Thơ.

[17]. Nguyễn Quang Tiên, Nguyễn Đắc Khoa & Nguyễn Thị Phi Oanh (2018). Tối ưu hóa quá trình nhân mật số bào tử xạ khuẩn *Streptomyces albaduncus* bằng ma trận Plackett-Burman và phương pháp đáp ứng bề mặt

(RSM)-phương án cấu trúc có tâm (CCD). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(9): 15-22.

[18]. Qingwei Zeng, Xiaoqin Wu, Jiangchuan Wang & Xiaolei Ding (2017). Phosphate solubilization and gene expression of phosphate-solubilizing bacterium *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 under different levels of soluble phosphate. Journal of microbiology and biotechnology. 27(4): 844-855.

[19]. Dorcas Zúñiga-Silgado, Julio C Rivera-Leyva, Jeffrey J Coleman, Ayixon Sánchez-Reyez, Susana Valencia-Díaz, Mario Serrano, Luz E de-Bashan & Jorge L Folch-Mallol (2020). Soil type affects organic acid production and phosphorus solubilization efficiency mediated by several native fungal strains from Mexico. Microorganisms. 8(9): 1337.

OPTIMIZING THE CULTURE CONDITIONS OF A SALT-TOLERANT BACTERIAL STRAIN CAPABLE OF SOLUBILIZING PHOSPHORUS

Pantoea sp. TTB4.1

Tran An Binh, Truong Thi Anh Thu, Nguyen Vinh Thai,
Nguyen Chanh Tin, Tran Vo Khanh Toan, Tran Van Be Nam, Tran Thi Giang*
Can Tho University

ABSTRACT

This study aimed to select carbon and nitrogen sources in the medium of salinity-tolerant phosphate solubilizing bacteria (ST-PSB) *Pantoea* sp. TTB4.1 to obtain the highest dissolved phosphorus content. Moreover, the study optimized the factors affecting the phosphorus solubility of *Pantoea* sp. TTB4.1 using the RSM-CCD model (Response surface methodology-Central composite design). Four optimized factors consisted of carbon concentration (5-15 g/L), nitrogen concentration (0.05-0.15 g/L), initial pH (6.0-8.0), and inoculum concentration (7.7-11.7 log(CFU/mL)). The results showed that glucose and (NH₄)₂SO₄ were suitable carbon and nitrogen sources for the *Pantoea* sp. strain. TTB4.1 leads to the highest phosphorus solubility. Besides, the optimization results from the RSM-CCD model showed that using the glucose concentration of 11.52-12.49 g/L, the (NH₄)₂SO₄ concentration of 0.112-0.118 g/L, the initial pH of 7.4-7.5 and the inoculum concentration of 10.4-10.7 logs(CFU/mL), the soluble phosphorus was attained from 1,369.99-1,372.62 mg/L, with a yield of about 44.8% compared to the initially added amount of Ca₃(PO₄)₂ (5 g/L).

Keywords: Optimization, *Pantoea* sp. TTB4.1, phosphate solubilizing bacteria, RSM-CCD, salinity-tolerant bacteria.

Ngày nhận bài : 19/9/2022
Ngày phản biện : 23/10/2022
Ngày quyết định đăng : 10/11/2022