

Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật sản xuất phytase trong đất tại xã Hòa An, huyện Phú Hòa, tỉnh Phú Yên

Isolation and selection of phytase producing microorganisms from the soil of Hoa An
commune, Phu Hoa district, Phu Yen province

Đặng Thị Mỹ Hạnh^a, Nguyễn Văn Trung^b, Nguyễn Thị Tho^c, Đỗ Thu Hà^{d,e},
Nguyễn Thị Mộng Điệp^{f*}
Dang Thi My Hanh^a, Nguyen Van Trung^b, Nguyen Thi Tho^c, Do Thu Ha^{d,e},
Nguyen Thi Mong Diep^{f*}

^aTrường THPT Trần Quốc Tuấn, Hòa Định Đông, Phú Hòa, Phú Yên, Việt Nam

^bKhoa Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Quang Trung, Việt Nam

^cKhoa Giáo dục Tiểu học và Mầm non, Trường Đại học Quy Nhơn, Việt Nam

^dViện Nghiên cứu và Đào tạo Y Sinh Dược, Trường Đại học Duy Tân, Đà Nẵng, Việt Nam

^eInstitute for Research and Training in Medicine, Biology and Pharmacy, Duy Tan

^eKhoa Dược, Trường Đại học Duy Tân, Đà Nẵng, Việt Nam

^eDepartment of Pharmacy, Duy Tan University, Da Nang, 550000, Vietnam

^fKhoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Quy Nhơn, Việt Nam

^fFaculty of Natural Science, Quy Nhon University, Vietnam

(Ngày nhận bài: 5/7/2022, ngày phản biện xong: 8/7/2022, ngày chấp nhận đăng: 30/7/2022)

Tóm tắt

Phytase là một enzyme phân hủy các dạng phospho hữu cơ phức tạp như axit phytic thành các dạng vô cơ đơn giản hơn. Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập và sàng lọc các chủng vi sinh vật sản xuất phytase trên môi trường hòa tan phosphat. Chúng tôi đã phân lập được 18 chủng vi khuẩn và 02 chủng nấm mốc sinh phytase. Sau khi sàng lọc các chủng này, một trong những chủng tốt nhất của mỗi loại đất sẽ được chọn để nhân nuôi sinh khối và thử nghiệm ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển trong giai đoạn đầu của cây lúa. Kết quả thử nghiệm cho thấy enzyme phytase thu được từ môi trường nuôi cấy chủng nấm mốc VN1 và VN2 cho hiệu quả tốt nhất đến sự sinh trưởng phát triển của cây lúa, có thể được sử dụng làm chế phẩm phân bón vi sinh bổ sung trong cho cây trồng bản địa.

Từ khóa: Axit phytic, phytase, sự suy thoái, vi khuẩn, nấm.

Abstract

Phytase is an enzyme that breaks down the complex organic (unavailable) forms of phosphorus such as phytic acid into simpler inorganic (available) forms. The objective of the present study was to isolate and screen phytase-producing microorganisms on phosphate-soluble media. We isolated 18 phytase-producing bacteria strains and 02 phytase-producing fungi strains. After screening these strains, one of the best for each soil type was selected for biomass culture and tested for its effect on early stages growth and development of rice. The test results showed that the enzyme phytase obtained from the VN1 and VN2 fungi strains had the best effect on the growth and development of rice plants, and could be used as a microbial fertilizer supplement for native crops.

Keywords: Phytic acid, phytase, degradation, bacteria, fungi.

* Email : nguyenthimongdiep@qnu.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Phospho là một trong những chất dinh dưỡng quan trọng và là thành phần thiết yếu của sự sống [1]. Phospho có mặt ở cả dạng hữu cơ và vô cơ trong đất. Thực vật chỉ hấp thụ dạng lân vô cơ từ đất, đây thường là một yếu tố hạn chế tăng trưởng vì tính sẵn có của nó [2]. Để đối phó với tình trạng thiếu phospho, một lượng lớn phân bón chứa phospho được sử dụng. Tuy nhiên, phân bón hóa học được bổ sung vào đất không chỉ làm tăng chi phí sản xuất mà còn gây ô nhiễm môi trường.

Phytate là một trong những dạng dự trữ chính của phospho trong thực vật nhưng thực vật phần lớn không thể sử dụng nó từ thân rễ do hoạt động thủy phân phytate thấp trong rễ cây [3]. Đối với động vật, axit phytic là thành phần dinh dưỡng trong chế độ ăn nhưng nó không được tiêu hóa bởi vì trong dạ dày động vật không chứa enzyme phytase để phá vỡ axit phytic và do đó, axit phytic hoạt động như một chất chống tạo chelat cho các kim loại khác nhau. Các ion như Ca, Mg, Fe, Zn,... làm giảm chất lượng dinh dưỡng của thực phẩm. Ngoài ra, phytate có khả năng liên kết mạnh mẽ với các cation hóa trị một hoặc hai trong đất. Do cấu trúc phân tử bất thường của nó, phytate cũng có thể tạo thành phức hợp với các chất dinh dưỡng khác như kim loại (Ca, Mg, Fe, Cu, v.v...) làm cho chúng không thể sử dụng được [4].

Enzyme phytases (myo-inositol hexakisphosphat phosphohydrolases) xúc tác quá trình thủy phân phytate thành myo-inositol, inositol phosphate, và phosphate vô cơ [5]. Các phytases lần đầu tiên được xác định bởi Suzuki et al. (1907) người đã tìm thấy một loại enzyme có trong cám gạo. Hơn nữa, phytase phổ biến trong tự nhiên và có thể được sản xuất từ nhiều nguồn vật chủ khác nhau bao gồm thực vật, động vật và vi sinh vật (VSV) [6]. Dựa trên chức năng xúc tác và cấu trúc của chúng, nhóm phytases đầu tiên và được nghiên cứu rộng rãi

nhất được phân loại là axit histidine phosphatases đã được phân lập từ nấm sợi, vi khuẩn, nấm men và thực vật [7]. Enzyme phytase là một loại enzyme tự nhiên được sử dụng để phá vỡ và tăng chất lượng dinh dưỡng của các hợp chất chứa phytate. Sự phân hủy sinh học trong đất nhờ VSV sản xuất phytase làm tăng khả năng sử dụng phospho đối với thực vật, tăng sự phát triển của thực vật và giảm ô nhiễm phospho. Do các ứng dụng công nghệ sinh học tiềm năng của nó, nên mối quan tâm đến việc phân lập các VSV mới, tạo ra enzyme phytase mới và hiệu quả ngày càng gia tăng [8]. Trên cơ sở đó, nghiên cứu hiện tại của chúng tôi được thiết kế để phân lập và tuyển chọn các chủng VSV sản xuất phytase trong đất mà sau này có thể phát triển làm chế phẩm phân bón sinh học đặc trưng cho địa phương.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Mẫu đất trồng trọt (trồng lúa và trồng rau laghim) và chăn nuôi (nuôi gà, nuôi vịt và nuôi lợn) được lấy tại xã Hòa An, huyện Phú Hòa, tỉnh Phú Yên.

Một số hóa chất và vật tư thiết yếu phục vụ cho nghiên cứu thực hiện đề tài: Agar, đường glucose, hộp petri, ống nghiệm, dao cắt mẫu, panh, đèn cồn, ống đong, giấy lọc, lam kính, lamén, chậu, vại, que cấy, tủ sấy, nồi hấp, tủ lạnh, tủ ẩm, buồng cấy nấm, kính hiển vi.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và sàng lọc VSV phân giải phytate [9]

Các mẫu đất (n = 5) được thu thập từ các khu vực khác nhau ở độ sâu 0-20cm xung quanh các khu chuồng trại chăn nuôi, đất trồng lúa tại xã Hòa An, huyện Phú Hòa, tỉnh Phú Yên và được chuyển đến phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học, Trường Đại học Quy Nhơn.

Một gam đất từ mỗi mẫu được hòa tan trong 0,9% NaCl vô trùng để pha loãng nối tiếp đến 10^{-7} . Sau đó, 0,1ml dung dịch mẫu (độ pha loãng 10^{-4} , 10^{-5} và 10^{-6}) được cho vào đĩa Petri vô trùng và dung dịch thạch môi trường sàng lọc phytase (PSM) có chứa (2% thạch, 1,5% glucose, 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% NaCl, 0,05% KCl, 0,001% FeSO_4 , 0,01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,001% MnSO_4 , pH 6 với 0,5% natri phytate) và sau đó ủ trong 4 ngày ở nhiệt độ 30°C . VSV sản sinh phytase phát triển được đặc trưng bởi sự hiện diện của một vùng rõ ràng xung quanh khuẩn lạc [9]. Các dòng phân lập được chọn sau đó được lưu trữ trên môi trường thạch nghiêng LB, PDA để phân tích.

VSV có khả năng phân giải natri phytate sẽ tạo vùng không màu (halo) xung quanh khuẩn lạc. Khả năng phân giải natri phytate của VSV (%) được xác định bằng công thức:

$$\left(\frac{\text{Đường kính halo} - \text{Đường kính khuẩn lạc}}{\text{Đường kính halo}} \times 100 \right)$$

2.2.2. Phương pháp sơ bộ ứng dụng dịch nuôi cấy của các chủng VSV tuyển chọn đến giai đoạn đầu của sự sinh trưởng và phát triển cây lúa (*Oryza sativa* L.)

Cách tiến hành thí nghiệm

- Tiến hành thí nghiệm trồng lúa trong 9 khay có kích thước 60cm x 20cm x 5cm trên nền đất thịt nặng lấy từ xã Hòa An.

- Thí nghiệm được tiến hành theo 3 công thức, mỗi công thức được nhắc lại 3 lần.

CTĐC1 (Công thức đối chứng 1): 500g đất trồng khử trùng + dịch nuôi cấy không bổ sung

các chủng VSV tuyển chọn + natri phytate + lúa nảy mầm.

CTĐC2 (Công thức đối chứng 2): 500g đất trồng khử trùng + 0.5g natri phytate + lúa nảy mầm.

CTTN (Công thức thí nghiệm): 500g đất trồng khử trùng + dịch nuôi cấy bổ sung chủng VSV tuyển chọn + 0.5g natri phytate + lúa nảy mầm.

- Chuẩn bị giống: Tiến hành ngâm trong nước theo tỉ lệ 2 sôi: 1 lạnh đến khi hạt thóc no nước thì vớt ra (4-6 giờ), rửa sạch, để ráo, dùng khăn ẩm bọc lại, ủ kín, để chỗ ẩm trong vòng 48 giờ để hạt nảy mầm. Sau đó tiến hành gieo trồng, quan sát sự phát triển và đo chiều cao phát triển của cây sau 8 ngày gieo.

- Chế độ chăm sóc và điều kiện phát triển giữa các công thức là như nhau.

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thực nghiệm được tính giá trị trung bình và phân tích ANOVA (Duncan's test, $p < 0,05$) bằng chương trình SAS 6.01.

3. Kết quả và thảo luận

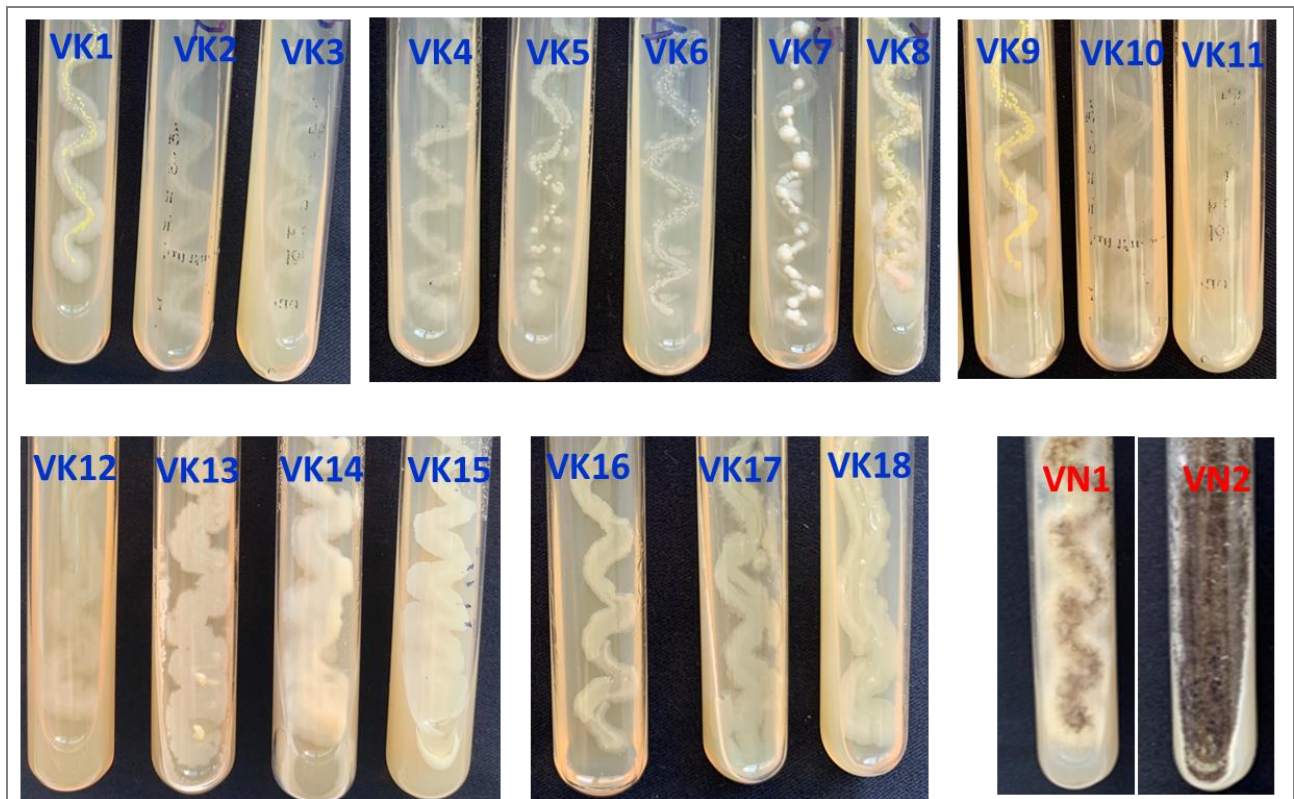
3.1. Thành phần các chủng VSV sinh phytase phân lập từ đất tại xã Hòa An.

Từ những mẫu đất trồng trọt (trồng lúa và trồng rau laghim) và chăn nuôi (nuôi gà, nuôi vịt và nuôi lợn) tại xã Hòa An, chúng tôi đã phân lập và sơ tuyển được 20 chủng VSV sinh phytase sinh trưởng và phát triển trên môi trường sàng lọc. Kết quả được trình bày qua Bảng 3.1 và Hình 3.1.

Bảng 3.1. Số lượng, thành phần các chủng VSV sinh phytase trong đất tại xã Hòa An

STT	Mẫu đất	Số lượng, thành phần các chủng VSV sinh phytase		
			Số lượng chủng	Thành phần
1	Đất chăn nuôi	Chăn nuôi lợn	3	VK1 – VK3
		Chăn nuôi gà	5	VK4 – VK8

			1	VN1
		Chăn nuôi vịt	3	VK9 – VK11
			1	VN2
2	Đất trồng trọt	Trồng lúa	4	VK12 – VK15
		Trồng rau laghim	3	VK16 – VK18



Hình 3.1. Một số chủng vi khuẩn và nấm mốc sinh phytase trong đất phân lập được tại xã Hòa An. Hình chụp sau 3 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C

Phytase, một loại enzyme chịu trách nhiệm phân hủy các hợp chất chứa phospho hữu cơ, được phân bố rộng rãi trong thực vật, VSV và trong một số mô động vật [10]. Mặc dù, nhiều loài thực vật sản xuất enzyme phytase ở một mức độ nào đó, nhưng sự hiện diện của phytase sinh ra từ vi khuẩn, vi nấm trong đất đã được cho là làm tăng khả năng sinh trưởng của thực vật có sẵn và phát triển cao hơn [11]. Nhiều nhà nghiên cứu khác nhau đã sàng lọc trên các môi trường sống khác nhau để tìm vi khuẩn sản sinh phytase, bao gồm cả phân gia cầm [12], nước lầy [13], đất [14], đất của chuồng gia súc và gia cầm, cánh đồng ngũ cốc và xung quanh, trái cây và rau thối, và đất thân rễ [15].

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy trong đất chăn nuôi vịt và gà xuất hiện 2 chủng nấm mốc, các mẫu đất còn lại không phát hiện có khuẩn lạc của nấm mốc. Chúng tôi cũng đã phân lập được 18 chủng vi khuẩn khác nhau trên các nền đất khác nhau. 18 chủng vi khuẩn phân lập được đều có khuẩn lạc trắng trong, trắng đục. Các dạng khuẩn lạc gồm: bề mặt trơn nhẵn, bóng ướt. Chủng vi khuẩn VK1, VK9, VK10 có sinh sắc tố trên môi trường, các chủng còn lại không sinh sắc tố. Chủng nấm mốc VN1 khuẩn lạc màu xám bên trong và ngoài rìa có màu trắng đục, chủng nấm mốc VN2 khuẩn lạc có duy nhất màu đen. Khuẩn ty dạng nhưng mịn (Hình 3.1).

3.2. Sự phân bố của VSV sinh phytase theo tính chất đất

Sự sinh trưởng phát triển của VSV phụ thuộc nhiều vào các yếu tố vật lý như nhiệt độ, độ ẩm, pH đất, thành phần cơ giới đất cũng như các yếu tố hóa học như hàm lượng axit phytate có trong đất, nguồn cacbon, nitơ, thành phần

khoáng...[16]. Do vậy, chúng tôi thu thập các mẫu đất từ nhiều nguồn khác nhau nhằm phân lập và sàng lọc các chủng VSV sinh phytase khác nhau. Kết quả về sự phân bố của VSV sinh phytase trên các nền đất khác nhau được thu thập tại xã Hòa An được trình bày ở Bảng 3.2 (sau 3 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C).

Bảng 3.2. Số lượng VSV sinh phytase theo môi trường đất tại xã Hòa An

Loại đất		Số tế bào VSV (đơn vị hình thành khuẩn lạc) trong 1g đất		
		(x 10 ⁴ CFU/g)	(x 10 ⁵ CFU/g)	(x 10 ⁶ CFU/g)
Đất chăn nuôi	Chăn nuôi lợn	74,00±7,43 ^{ab}	54,00±3,32 ^{ab}	33,75±7,20 ^{ab}
	Chăn nuôi gà	82,25±6,56 ^a	57,50±4,12 ^a	38,25±4,20 ^a
	Chăn nuôi vịt	58,75±8,65 ^b	45,50±7,67 ^{ab}	28,50±5,21 ^b
Đất trồng trọt	Trồng lúa	67,25±5,33 ^{ab}	42,50±6,34 ^b	32,50±5,15 ^{ab}
	Trồng rau laghim	71,75±5,45 ^{ab}	52,25±5,54 ^{ab}	35,25±6,41 ^{ab}

(Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo Duncan's test ($p < 0,05$), $n=3$).

Kết quả Bảng 3.2 cho thấy trên nền đất chăn nuôi vịt, lợn và đất trồng lúa hay laghim đều có số lượng tế bào như nhau khi nuôi cấy *in vitro* trong cùng một điều kiện môi trường, nhiệt độ, pH. Trên đất chăn nuôi gà, số lượng VSV sinh phytase nhiều hơn so với các loại đất khác. Xét về tính chất đất, chúng tôi thấy rằng đất trồng rau và đất chăn nuôi chủ yếu là loại đất thịt trung bình và đất thịt nhẹ chiếm phần lớn diện tích. Đất thịt trung bình, đất thịt nhẹ chăn nuôi gia súc, gia cầm hoặc trồng rau có độ ẩm vừa phải (50-55%), pH trung tính hoặc hơi kiềm (6.5-7.1) và có hàm lượng axit phytate cao từ các chất thải của gia súc, gia cầm và bón phân nên số lượng VSV sinh phytase sinh trưởng và phát triển trên môi trường sàng lọc cao. Ngoài ra, đất trồng rau laghim có tưới tiêu chủ động, thành phần cơ giới đất tốt, độ thoáng khí tốt, điều kiện canh tác theo quy định của hợp tác xã về rau an toàn nên đất có dinh dưỡng tốt phù hợp với môi trường sống của VSV sinh phytase.

Đất trồng lúa là đất thịt trung bình, có độ ẩm cao (60-75%), độ thoáng khí trong đất thấp do đất ngập nước, pH axit trong khoảng từ 5-7. Tuy nhiên tình trạng ngập nước của đất trồng lúa đã không ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của các VSV sinh phytase. Tùy thuộc vào nguồn gốc của các chủng VSV, các điều kiện tối ưu để sinh trưởng phát triển có thể khác nhau. Trong một số nghiên cứu trước đây cũng đã cho thấy vi khuẩn sản xuất axit lactic có hoạt tính phytase cao nhất ở pH: 5.0 [17]. Escobin-Mopera et al. (2012) đã báo cáo sản xuất phytase cao nhất ở pH 4.0 nhờ *Klebsiella pneumonia* 9-3B [18].

3.3. Khả năng sinh enzyme phytase của một số chủng vi khuẩn và nấm mốc trên môi trường PSM

Qua kết quả phân lập VSV trong một số loại đất chăn nuôi và trồng trọt tại xã Hòa An, chúng tôi đã thu được 18 chủng vi khuẩn và 2

chúng nấm mốc sinh phytase. Tiếp theo chúng tôi tiến hành tuyển chọn các chủng VSV sinh phytase mạnh từ các chủng VSV nói trên để tạo chế phẩm bổ sung cho các loại đất khác nhằm giúp cây trồng hấp thu tốt nhất các chất dinh dưỡng trong đất nói chung và phospho nói riêng, góp phần nâng cao năng suất cây trồng và cải tạo đất tại địa phương.

Để tiến hành tuyển chọn các chủng VSV có khả năng sinh enzyme phytase mạnh, chúng tôi đã nuôi cấy 20 chủng sơ tuyển trên môi trường

PSM có bổ sung CaCl_2 . Kết quả cho thấy 18 chủng vi khuẩn và 2 nấm mốc đều xuất hiện vòng phân giải phytate rõ, chiếm 100% so với tổng số chủng vi khuẩn và nấm mốc sàng lọc (Bảng 3.3). Trên cơ sở sinh phytase, chúng tôi chuyển chọn 1 chủng vi khuẩn (VK) có vòng phân giải mạnh nhất trên mỗi nhóm đất và 2 chủng nấm mốc (VN) để tiến hành nhân nuôi sinh khối và thăm dò ảnh hưởng của dịch nuôi cấy đến giai đoạn đầu của sự sinh trưởng và phát triển cây lúa (*Oryza sativa* L.).

Bảng 3.3. Khả năng sinh enzyme phytase của một số chủng vi khuẩn và nấm mốc

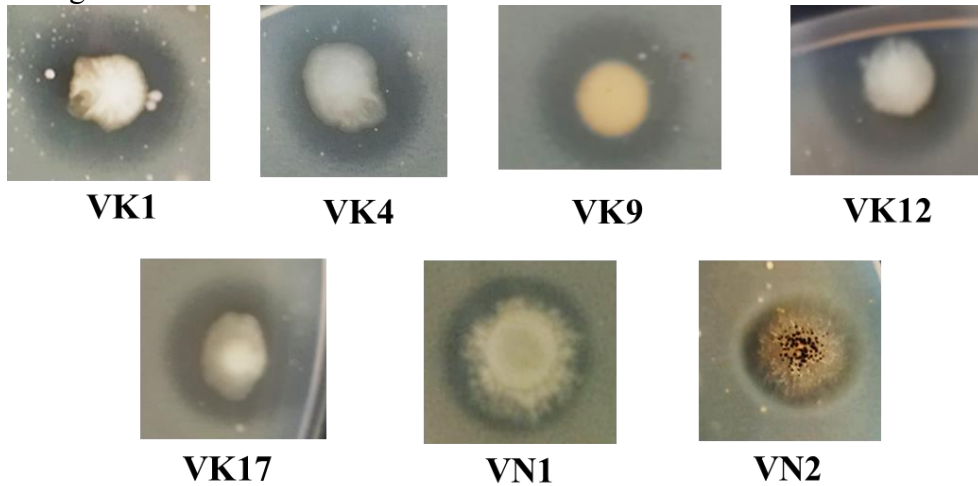
STT	Tên chủng	Loại đất	Khả năng phân giải phytate của VSV (%)
01	VK1	Chăn nuôi lợn	70,78±2,34 ^a
02	VK2	Chăn nuôi lợn	44,57±5,56 ^b
03	VK3	Chăn nuôi lợn	54,81±5,70 ^b
04	VK4	Chăn nuôi gà	76,95±7,20 ^a
05	VK5	Chăn nuôi gà	72,42±7,20 ^a
06	VK6	Chăn nuôi gà	71,96±2,70 ^a
07	VK7	Chăn nuôi gà	59,25±6,62 ^b
08	VK8	Chăn nuôi gà	62,32±5,89 ^b
09	VK9	Chăn nuôi vịt	79,62±3,51 ^a
10	VK10	Chăn nuôi vịt	47,72±2,18 ^b
11	VK11	Chăn nuôi vịt	54,20±0,49 ^b
12	VK12	Trồng lúa	81,33±1,75 ^a
13	VK13	Trồng lúa	53,37±3,15 ^b
14	VK14	Trồng lúa	55,47±6,40 ^b
15	VK15	Trồng lúa	50,87±5,89 ^b
16	VK16	Trồng Laghim	40,29±7,68 ^c
17	VK17	Trồng Laghim	63,26±0,66 ^a
18	VK18	Trồng Laghim	59,16±4,44 ^b
19	VN1	Chăn nuôi gà	48,44±6,23 ^a
20	VN2	Chăn nuôi vịt	35,00±2,27 ^b

(Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo Duncan's test ($p < 0,05$), $n=3$, khi so sánh trong cùng một nhóm đất; hai chủng nấm mốc được xem xét trong cùng một nhóm riêng khi so sánh.)

3.4. Ảnh hưởng của dịch nuôi cấy các chủng vi khuẩn và nấm mốc đến giai đoạn đầu của sự sinh trưởng và phát triển cây lúa (*Oryza Stativa L.*)

Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh VSV sản sinh enzyme phytase trong đất có vai trò quan trọng trong việc hấp thu phospho của cây trồng và tăng cường hỗ trợ việc hấp thu các nguyên tố khoáng khác tốt hơn như nitơ và kali

[11]. Xuất phát từ lý do đó, chúng tôi chuyên chọn 1 chủng vi khuẩn (VK) có độ phân giải mạnh nhất (Hình 3.2) trên mỗi nhóm đất (VK1, VK4, VK9, VK12, VK17) và 2 chủng nấm mốc (VN1, VN2) để tiến hành nhân nuôi sinh khối sau 72 giờ và tiến hành đánh giá sơ bộ vai trò của enzyme phytase đến sự sinh trưởng và phát triển của cây lúa (*Oryza stativa L.*).



Hình 3.2. Phân giải natri phytate của một số chủng vi khuẩn và nấm mốc phân lập được từ mẫu đất tại xã Hòa An

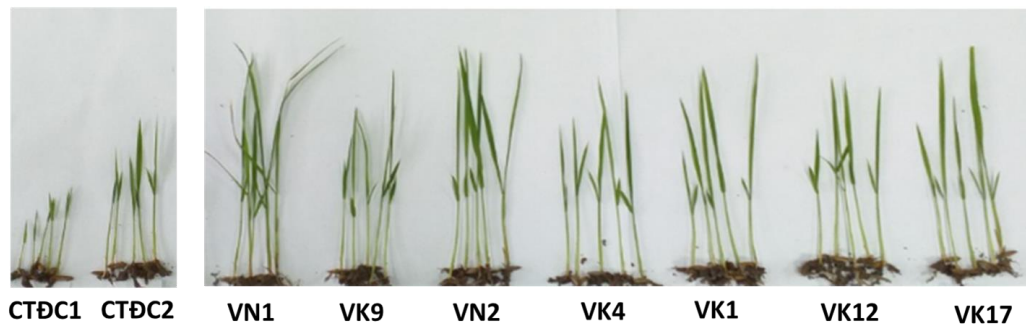
Để đánh giá ảnh hưởng dịch nuôi cấy của các chủng vi khuẩn và nấm mốc có chứa enzyme phytase thô đến giai đoạn đầu của sự trưởng và phát triển ở cây lúa, bố trí thí nghiệm tiến hành

theo các công thức thí nghiệm (CTTN) và đối chứng (CTĐC). Sau đó chúng tôi tiến hành đo chiều cao cây sau 8 ngày gieo trồng. Kết quả thu được trình bày ở Bảng 3.4 và Hình 3.3.

Bảng 3.4. Chiều cao trung bình cây lúa qua các công thức sau 8 ngày gieo trồng

CÔNG THỨC	THÀNH PHẦN TRONG CÔNG THỨC	Chiều cao cây (TB±SD)	
CTĐC1	Đất trồng khử trùng (500g) + dịch nuôi cấy không bổ sung chủng VSV tuyển chọn (200ml) + Natri phytate (0,5g) + Lúa nảy mầm (8g)	4,20 ± 0,46 ^d	
CTĐC2	Đất trồng khử trùng (500g) + Natri phytate (0,5g) + Lúa nảy mầm (8g)	7,40 ± 0,66 ^c	
CTTN	Đất trồng khử trùng (500g) + Natri phytate (0,5g) + Lúa nảy mầm (8g) + Dịch nuôi cấy bổ sung chủng VSV tuyển chọn	VK1	10,97 ± 0,47 ^b
		VK4	10,73 ± 0,95 ^b
		VK9	10,03 ± 0,68 ^b
		VK12	10,77 ± 0,38 ^b
		VK17	10,80 ± 0,29 ^b
		VN1	13,07 ± 0,40 ^a
		VN2	13,03 ± 0,21 ^a

(Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo Duncan's test ($p < 0,05$), $n=3$)



Hình 3.3. Chiều cao các cây ngẫu nhiên

Kết quả ở Bảng 3.4 cho thấy chiều cao cây lúa ở cả 3 CT tại thời điểm 8 ngày gieo trồng có sự chênh lệch đáng kể. Chiều cao trung bình của cây ở CTTN có bổ sung dịch nuôi cấy VSV cao hơn chiều cao cây ở các CTĐC. Điều thú vị mà chúng tôi phát hiện ở đây là khi phối trộn đất với dung dịch nuôi cấy hai chủng nấm mốc VN1 và VN2, cây lúa sinh trưởng phát triển vượt trội. Điều này cho thấy phytase sản sinh ra từ hai chủng nấm mốc VN1 và VN2 có khả năng phân giải phytate hiệu quả hơn phytase sinh ra từ các chủng vi khuẩn, giúp cây lúa sinh trưởng phát triển tốt hơn. Vì vậy, chúng tôi cho rằng việc bổ sung enzyme phytase vào đất trồng lúa có thể giúp hỗ trợ cây tăng hấp thu chất dinh dưỡng, giúp cây sinh trưởng và phát triển nhanh hơn. Nghiên cứu của nhóm tác giả Pradnya D Gujar (2013) [19] về ảnh hưởng của phytase đến sự sinh trưởng và phát triển của lúa mì, và nhóm tác giả Findenegg và Nelemans (1993) [20] về bổ sung phytase vào đất trồng cây ngô cũng cho kết quả tương tự. Họ cho rằng việc bổ sung phytase góp phần đồng hóa các thành phần dinh dưỡng trong đất, gia tăng hàm lượng phospho trong rễ cây.

4. Kết luận

Chúng tôi đã phân lập được 18 chủng vi khuẩn và 2 chủng nấm mốc sản xuất phytase trên cơ sở hình thành vùng sáng xung quanh khuẩn lạc từ mẫu đất trồng lúa, trồng laghim, đất chăn nuôi gà, chăn nuôi vịt và chăn nuôi lợn thu thập tại xã Hòa An. Chúng tôi cũng đã tuyển chọn 2 chủng nấm mốc VN1, VN2 cho

hiệu quả sản xuất phytase tốt nhất sau 72 giờ trong số 20 chủng vi sinh vật sinh phytase phân lập được.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi có thể làm cơ sở cho sự phát triển thêm những chủng vi sinh vật này như một loại chế phẩm vi sinh bản địa. Tuy nhiên cần có các nghiên cứu sâu hơn để xác định ảnh hưởng của các yếu tố khác nhau (pH, nhiệt độ và chất ức chế) đến hoạt động phytase của các chủng tuyển chọn.

Tài liệu tham khảo

- [1] Maathuis, Frans JM (2009), *Physiological functions of mineral macronutrients*. Curr. Opin. Plant Biolo., 12, 250-258.
- [2] Grotz N, Guerinot ML (2002), *Limiting nutrients: An old problem with new solutions?* Curr. Opin. Plant Biol., 5, 158-163.
- [3] Richardson AE, Hadobas PA, Hayes JE (2001), *Extracellular Secretion of Aspergillus Phytase from Arabidopsis Roots Enables Plants to Obtain Phosphorus from Phytate*, The Plant Journal, 25, 641-649.
- [4] Selle PH, Cowieson AJ, Cowieson NP *et al.* (2012), *Protein-phytate interactions in pig and poultry nutrition: A reappraisal*, Nutr. Res. Rev., 25, 1-17.
- [5] Greiner R (2007), *Phytate-Degrading Enzymes: Regulation of Synthesis in Microorganisms and Plants*, In: Turner, B.L. and Mullaney, E.J., Eds., *Inositol Phosphates: Linking Agriculture and the Environment*, CABI, Wallingford, UK, 78-96.
- [6] Yao MZ, Zhang YH, Lu WL, *et al.* (2012), *Phytases: Crystal Structures, Protein Engineering and Potential Biotechnological Applications*, Journal of Applied Microbiology, 112, 1-14.
- [7] Lei XG, Weaver JD, Mullaney EJ, *et al.* (2013), *Phytase, a New Life for an "Old" Enzyme*, Annual Review of Animal Biosciences, 1, 283-309.

- [8] Shim JH, Oh BC (2012), *Characterization and application of calcium-dependent beta-propeller phytase from Bacillus amyloliquefaciens DS11*, J. Agri. Food Chem., 40, 9669-76.
- [9] Quan C, Zhang L, Wang Y, et al. (2001), *Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast Candida krusei*, J Biosci Bioeng, 92, 154-160.
- [10] Vohra A, Satyanarayana T (2003), *Phytases: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications*, Crit. Rev. Biotechnol., 23, 29-60.
- [11] Afinah S, Yazid AM, Anis Shobirin MH, et al. (2010), *Phytase: application in food industry*, International Food Research Journal, 17, 13-21.
- [12] Selvamohan TV, Ramadas, Rejibeula M (2012), *Optimization of phytase production by Pseudomonas Sp. Isolated from poultry faces*, Int. J. Mod Engin. Res., 2, 1326-1330.
- [13] Shamna KS, Rajamanikandan KCP, Mukesh Kumar DJM, et al. (2012), *Extracellular production of phytases by a native Bacillus subtilis strain*, Ann. Biol. Res., 3, 979-987.
- [14] Acuña JJ, Jorquera MA, Martínez OA, et al. (2011), *Indole acetic acid and phytase activity produced by rhizosphere bacillias affected by pH and metals*, J. Soil Sci. Plant Nutr., 11, 1-12.
- [15] Mittal A, Singh G, Goyal V, et al. (2012), *Production of phytase by acido-thermophilic strain of Klebsiella sp. Db-3ff711774.1 using orange peel flour under submerged fermentation*, Innovat. Rom. FoodBiotechnol., 10, 18-27.
- [16] Gunashree BS, Venkateswaran G (2008), *Effect of different cultural conditions for phytase production by Aspergillus niger CFR 335 in submerged and solid-state fermentations*, J. [17] Ind.Microbiol. Biotechnol., 35, 1587-1596.
- [17] Tang AL, Wilcox G, Walker KZ, et al. (2010), *Phytase activity from lactobacillus spp. In calcium-fortified soymilk*, J. Food Sci., 75, 373-376.
- [18] Escobin-Mopera LM, Ohtani S, Sekiguchi, et al. (2012), *Purification and characterization of phytase from Klebsiella pneumoniae 9-3b*, J.Biosci. Bioeng., 113, 562-567.
- [19] Pradnya DG, Kavita PB, Jayant MK (2013), *Effect of phytase from Aspergillus niger on plant growth and mineral assimilation in wheat (Triticumaestivum Linn.) and its potential for use as a soil amendment*, Journal of the Science of food and agriaiculture, 93(9), pp. 2242-2247.
- [20] Findenegg GR, Nelemans JA (1993), *The effect of phytase on the availability of phosphorus from myo-inositol hexaphosphate (phytate) for maize roots*, Plant and Soil, 154, 189-196.