



DOI:10.22144/ctu.jvn.2019.102

## TUYỂN CHỌN CÁC ĐỒNG NẤM MỐC *Aspergillus* spp. CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY BÃ MÍA SAU TRỒNG NẤM

Nguyễn Lê Anh Đào<sup>1\*</sup>, Đỗ Thị Thanh Hương<sup>1</sup>, Trần Nhân Dũng<sup>2</sup> và Bùi Thị Minh Diệu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Lê Anh Đào (email: nladao@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 05/02/2019

Ngày nhận bài sửa: 10/06/2019

Ngày duyệt đăng: 30/08/2019

### Title:

Collection of the spent mushroom bagasse degradable *Aspergillus* spp.

### Từ khóa:

*Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingensis*, bã mía, beta-glucosidases, endoglucanases, khả năng phân giải cellulose

### Keywords:

*Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingensis*, bagasse, beta-glucosidases, cellulolytic ability, endoglucanases

### ABSTRACT

*Aspergillus* is one of the strong cellulose degrading microorganisms. This study was done to select *Aspergillus* spp. strains for waste harvested mushroom hydrolyzing ability assay by isolating, selecting, identifying and applying of cellulose degrading activity of *Aspergillus* spp. From the result, 65 strains of the genus *Aspergillus* were isolated and initially classified from five sources of rhizosphere soil, rice-field soil, rotten straw (O Mon), bagasse (Hau Giang), sawdust (Can Tho). Two strains namely BM-CMC-6 and DR-GL-9 showed the highest cellulase activity by giving strongest cellulolytic activity on inductive substrates such as bagasse, rice-straw or filter paper. These strains also showed the highest activity of endoglucanases and  $\beta$ -glucosidases. Combination of BM-CMC-6 and DR-GL-9 strains revealed as a potential product in treating bagasse obtained from mushroom harvest with the C/N ratio (27,48) and reduced weight (31,57%) of the bagasse after hydrolyzed 15 days. Hyphae characteristics and the DNA sequences indicated BM-CMC-6 belonged to *A. niger* and DR-GL-9 was *A. tubingensis*.

### TÓM TẮT

*Aspergillus* là một trong những loài vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose mạnh. Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu tuyển chọn các đồng nấm mốc *Aspergillus* spp. có khả năng phân hủy bã cơ chất sau trồng nấm thông qua việc phân lập, tuyển chọn, định danh và ứng dụng hoạt tính phân giải cellulose của các đồng *Aspergillus* spp. Kết quả cho thấy, 65 đồng nấm mốc thuộc chi *Aspergillus* spp. từ 5 nguồn đất rẫy, đất ruộng, rơm mục (Ô Môn), bã mía (Hậu Giang), mùn cưa (Cần Thơ) đã được phân lập và định danh sơ bộ dựa vào đặc điểm hình thái. Trong đó, đồng *Aspergillus niger* (BM-CMC-6) và *Aspergillus tubingensis* (DR-GL-9) có hoạt tính enzyme cellulase cao nhất và có khả năng phân giải mạnh cellulose trên cơ chất bã mía, rơm, giấy lọc. Hai đồng này cũng thể hiện hoạt tính enzyme endoglucanases và  $\beta$ -glucosidases cao nhất khi khảo sát hoạt tính hệ enzyme cellulase. Sự phối hợp đồng BM-CMC-6 và DR-GL-9 thể hiện tiềm năng làm chế phẩm để xử lý bã mía sau trồng nấm dựa trên tỷ lệ C/N (27,48) và khối lượng cơ chất giảm (31,57%) sau 15 ngày. Kết hợp giữa đặc tính hình thái và trình tự cho thấy đồng BM-CMC-6 đồng hình 100% với *A. niger* và DR-GL-9 đồng hình 99% với *A. tubingensis*.

Trích dẫn: Nguyễn Lê Anh Đào, Đỗ Thị Thanh Hương, Trần Nhân Dũng và Bùi Thị Minh Diệu, 2019. Tuyển chọn các đồng nấm mốc *Aspergillus* spp. có khả năng phân hủy bã mía sau trồng nấm. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(4B): 1-9.

## 1 GIỚI THIỆU

Hiện nay, việc lạm dụng các loại phân bón và thuốc trừ sâu hóa học làm cho đất canh tác bị bạc màu rất nhanh chóng; dư lượng phân hóa học gây ô nhiễm môi trường đất, môi trường nước và ảnh hưởng nhiều đến sinh vật cũng như con người. Vì vậy, để cải thiện độ phì nhiêu cho đất, các sản phẩm phân hữu cơ vi sinh vật đa chủng từ các nguồn khác nhau đã được nghiên cứu sử dụng. Trong đó, việc nghiên cứu các dòng vi sinh vật có khả năng phân hủy cellulose trên bã mía sau khi thu hoạch nấm ăn làm nền tảng để sản xuất phân hữu cơ vi sinh, sẽ giải quyết được phần lớn nhu cầu phân bón cho cây trồng với chất lượng tương đương nhưng giá thành lại rẻ hơn nhiều so với phân hóa học. Hơn nữa, giải pháp này mở ra triển vọng hoàn thiện chu trình sản xuất khép kín [phụ phẩm nông nghiệp – nấm – phân sinh học]. Đồng thời, đó còn là tiền đề trong việc ứng dụng các chế phẩm phân hữu cơ – vi sinh thân thiện với môi trường, đẩy mạnh ý thức bảo vệ - xử lý ô nhiễm môi trường hỗ trợ chống biến đổi khí hậu, bước đầu phát triển hệ thống sản xuất nông nghiệp sạch - bền vững.

Để đáp ứng với những vấn đề nêu trên, nghiên cứu “Tuyển chọn các dòng nấm mốc *Aspergillus* spp. có khả năng phân hủy bã mía sau trồng nấm” được thực hiện với các mục tiêu: phân lập một số dòng nấm mốc *Aspergillus* spp. có khả năng phân hủy cellulose từ các nguồn khác nhau; đánh giá và tuyển chọn các dòng nấm mốc *Aspergillus* spp. có khả năng phân giải cellulose mạnh; kết hợp các đặc tính hình thái, sinh hóa và phương pháp sinh học phân tử để định danh các dòng nấm mốc *Aspergillus* và ứng dụng hoạt tính phân giải cellulose của các dòng nấm mốc *Aspergillus* spp. đã tuyển chọn để phân hủy bã mía sau trồng nấm (ở điều kiện phòng thí nghiệm).

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu nghiên cứu

Mẫu bã mía lấy từ Nhà máy Đường Vị Thanh, Hậu Giang. Mẫu mùn cưa thu từ trại cưa xẻ gỗ Càng Cái Cui, thành phố Cần Thơ. Mẫu rom mục, đất rẫy, đất ruộng lấy từ Ô Môn, Thành phố Cần Thơ. Chế phẩm Tricô –ĐHCT của Trung tâm Dịch vụ và Nông nghiệp-Trường Đại học Cần Thơ.

Môi trường nuôi cấy, phân lập tuyển chọn nấm mốc *Aspergillus*: Czapek Dox Agar (CZ, Merck), Carboxymethylcellulose (CMC, Merck) (Ulrich *et al.*, 2008), một số hóa chất để chuẩn bị môi trường đặc trưng D ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ) (Trần Minh Tâm, 2000).

Hóa chất trong thí nghiệm đo hoạt tính enzyme: thuốc thử Lugol, thuốc thử Nelson-Somogyi. Và một số hóa chất khác dùng trong nuôi cấy và phân lập; một số hóa chất trong sinh học phân tử.

### 2.2 Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.2.1 Phân lập các dòng nấm mốc *Aspergillus* spp. từ các nguồn khác nhau trên môi trường Czapek Dox Agar

#### a. Phân lập nấm mốc

Từ các nguồn bã mía, mùn cưa, rom mục, đất ruộng, đất rẫy cau, mỗi nguồn lấy 5 mẫu. Mỗi mẫu được cấy trên 3 đĩa môi trường Czapek bổ sung lần lượt CMC và giấy lọc (GL) xay mịn làm nguồn carbon theo tỷ lệ 1%, ủ ở nhiệt độ  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ . Phân lập từ ngày thứ hai đến ngày thứ ba vào các đĩa thạch các khuẩn lạc có đặc điểm giống với *Aspergillus* (Klich, 2002). Tách riêng từng khuẩn lạc bằng cách cấy chuyển trên môi trường thạch nhiều lần. Sau đó mỗi dòng được kiểm tra trên kính hiển vi và quan sát mô tả đặc điểm khuẩn lạc.

b. Định danh sơ bộ các dòng nấm mốc *Aspergillus* spp. đã được phân lập thông qua đặc điểm hình thái

Thông qua hai bước cơ bản là định loại hình thái dựa trên đặc điểm khuẩn lạc theo phương thức cấy 3 điểm (ủ ở nhiệt độ  $25^\circ\text{C}$ ) và định loại vi thể theo đặc điểm bào tử đính (Klich, 2002).

2.2.2 Khảo sát khả năng sinh tổng hợp cellulase của các dòng nấm mốc *Aspergillus* spp. đã phân lập được

Thí nghiệm gồm 2 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại. Trong đó, nghiệm thức 1 sử dụng môi trường thạch bổ sung CMC (tỷ lệ 1%), nghiệm thức 2 sử dụng môi trường thạch bổ sung giấy lọc (tỷ lệ 1%) (Khairnar *et al.*, 2009). Dùng khoan nút đục lỗ trên đĩa thạch chứa 2 loại môi trường này. Hút vào mỗi lỗ 25  $\mu\text{l}$  dịch enzyme ngoại bào của các dòng nấm thu được sau khi nuôi tăng sinh, ủ ở nhiệt độ  $37^\circ\text{C}$  trong 2 ngày. Sau 48 giờ, đổ ngập dung dịch Lugol lên mặt thạch từ 3-5 phút. Sau đó xác định hoạt độ cellulase bằng cách đo vòng phân giải cellulose trên môi trường. Từ đó, lựa chọn các dòng nấm tạo vòng phân giải cellulose có đường kính lớn.

2.2.3 Tuyển chọn các dòng nấm mốc *Aspergillus* spp. đặc hiệu có khả năng phân giải cellulose mạnh trên các cơ chất cảm ứng khác nhau

Các dòng nấm mốc được chọn sẽ được nuôi trong môi trường CMC trong 3 ngày để làm nguồn giống chủng. Các chủng này tiếp tục được nuôi tăng sinh riêng trong các môi trường khác nhau với tỷ lệ chủng 1%. Bố trí thí nghiệm gồm 3 nghiệm thức (3 lần lặp lại) với 3 loại môi trường Dbm, Dr

và Dpp, tương ứng với môi trường D có bổ sung bã mía, rơm khô và giấy lọc (các cơ chất này đã được sấy khô, cân khối lượng và xay nhỏ, khối lượng mỗi cơ chất vào môi trường D là 0,5 g/100 mL môi trường D).

Sau 7 ngày lắc ủ, đánh giá khả năng phân giải cellulose dựa trên khối lượng khô mất đi của từng cơ chất. Tiến hành cho dung dịch sau phân giải qua giấy lọc đã sấy khô và cân khối lượng. Sau đó đem toàn bộ giấy lọc sấy ở 180°C trong 2 giờ và cân khối lượng so với khối lượng ban đầu, khối lượng tăng lên của giấy lọc chính là khối lượng còn lại của cơ chất sau phân giải. Từ khối lượng ban đầu và khối lượng còn lại của cơ chất sau phân giải, tính được phần trăm khối lượng khô mất đi ở từng cơ chất. Từ đó, so sánh khả năng phân giải giữa các dòng nấm trên ba loại cơ chất và xác định được các dòng nấm mốc có khả năng phân giải cơ chất mạnh nhất (Nguyễn Đức Lượng, 2006).

2.2.4 *Khảo sát hoạt tính hệ enzyme cellulase của các dòng nấm mốc Aspergillus spp.*

Chọn các dòng nấm mốc có khả năng phân giải tốt trên cơ chất bã mía, rơm khô và giấy lọc, nuôi trong 100 ml môi trường D nguồn carbon là bã mía (đã xay nhỏ) ở 30°C trong 2 ngày. Tiến hành ly tâm 5000 vòng trong thời gian 20 phút, thu lấy phần dịch trong sử dụng như dung dịch enzyme ngoại bào. Sau 2 ngày chùng, khảo sát hoạt tính hệ enzyme cellulase gồm: endoglucanases, exoglucanases và β-glucosidases. Hoạt tính của các enzyme này được đo bằng cách cho 1mL enzyme mỗi loại phản ứng tương ứng với 1 mL CMC, 1mL Cellulose powder, 1 mL Cellobiose và đo lượng đường khử sinh ra bằng phương pháp Nelson (Nelson, 1944).

2.2.5 *Định danh các dòng Aspergillus spp. đã phân lập được bằng phương pháp sinh học phân tử*

Ly trích DNA của các dòng nấm mốc *Aspergillus* theo quy trình Gardes và Burns (1993). Khuếch đại DNA bằng kỹ thuật PCR, với cặp môi ITS1 (forward), ITS4 (reverse) (White *et al.*, 1990). Sau đó tiến hành điện di sản phẩm PCR trên gel agarose và giải trình tự vùng ITS1/ITS2 trên máy ABI 3130 (Trần Nhân Dũng, 2011).

2.2.6 *Ứng dụng hoạt tính phân giải cellulose của các dòng nấm Aspergillus spp. đã tuyển chọn để phân hủy bã mía sau trồng nấm*

Bã mía sau trồng nấm được phân tích tỷ lệ C/N trước khi thí nghiệm. Trong đó, đạm được phân tích theo phương pháp Kjendahl (Huldrych Egli, 2008) và carbon được phân tích theo phương pháp Walkley-Black (Walkley, 1935).

Kiểm tra mật số vi sinh vật trong chế phẩm Tricô-ĐHCT để từ đó xác định được mật số vi nấm sẽ chùng vào bã mía. Bã mía sau khi được xử lý cơ học sẽ được chùng với các dòng nấm *Aspergillus* (Bảng 1).

**Bảng 1: Bố trí nghiệm thức chùng nấm**

Nghiệm thức	Dòng nấm chùng vào
Đôi chứng	Không chùng nấm (ĐC)
Đơn dòng	X1 X2
Đa dòng	X1: X2 (1:1)
Chế phẩm Tricô-ĐHCT	CP

Bã mía sau trồng nấm sau khi chùng được ủ trong bình tam giác ở nhiệt độ phòng trong 15 ngày. Trong suốt thời gian ủ, cần kiểm tra để đảm bảo khối ủ bã mía có nhiệt độ 40-55 (°C), độ ẩm 60-65%, pH 4-6 (Coral *et al.*, 2002).

Kiểm tra khả năng phân hủy bã mía sau trồng nấm của nấm mốc thông qua tỷ số C/N và khối lượng (%) bã mía được phân hủy vào ngày ủ thứ 5, 10 và 15. Từ đó tính hàm lượng C/N và phần trăm trọng lượng giảm dựa vào trọng lượng khô của bã mía trước khi ủ và sau n ngày ủ.

2.3 **Phương pháp xử lý số liệu**

Số liệu của thí nghiệm tuyển chọn các dòng nấm mốc *Aspergillus* có khả năng phân hủy bã mía sau trồng nấm được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion 15.2, phân tích phương sai (ANOVA) và kiểm định Duncan để kết luận về sự sai khác giữa trung bình các nghiệm thức.

3 **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

3.1 **Phân lập các dòng nấm mốc Aspergillus spp. từ các nguồn khác nhau trên môi trường Czapek Dox Agar**

3.1.1 *Phân lập nấm mốc*

Dựa vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc đã phân lập được 65 dòng *Aspergillus* từ 5 loại mẫu khác nhau. Trong đó, 30 dòng có nguồn gốc từ đất rẫy cau (ký hiệu DR), 11 dòng từ đất ruộng (ký hiệu DRG), 15 dòng từ bã mía (ký hiệu BM), 5 dòng từ mùn cưa (ký hiệu MC), 4 dòng từ rơm mục (ký hiệu R). Các nguồn đất rẫy cau, bã mía và đất ruộng có sự hiện diện của các dòng nấm mốc *Aspergillus* spp. nhiều và phong phú hơn từ các mẫu mùn cưa và rơm mục. Từ đó cho thấy sự phân bố nấm mốc *Aspergillus* spp. khác nhau khi phân lập từ các nguồn khác nhau. Đặc biệt, các dòng nấm mốc *Aspergillus* spp. từ nguồn đất rẫy cau và bã mía xuất hiện với mật độ cao cho thấy tiềm năng sinh tổng hợp cellulase từ 2 nguồn phân lập này.

3.1.2 Định danh sơ bộ các dòng nấm mốc *Aspergillus spp.* đã phân lập trên môi trường Czapek (CZ) với các nguồn carbon bổ sung là CMC và GL

Từ 25 mẫu khác nhau, tiến hành phân lập được 41 dòng nấm mốc trên môi trường CZ với nguồn carbon là CMC và 24 dòng nấm mốc *Aspergillus* từ môi trường CZ với nguồn carbon là giấy lọc. Những dòng có cùng đặc điểm hình thái được xếp vào cùng một nhóm. Kết quả ghi nhận sau 7 ngày ủ ở nhiệt độ 25°C cho thấy, đặc điểm đại thể và vi thể của mỗi nhóm trên môi trường có bổ sung CMC và giấy lọc tương đối tương đồng với nhau. Dựa theo khóa phân loại các loài nấm mốc *Aspergillus* của Samson (1988), Klich (2002) và Samson *et al.* (2007) có thể xếp thành 8 nhóm nấm mốc trên môi trường CZ bổ sung CMC và 6 nhóm trên môi trường CZ có giấy lọc. Dựa vào đặc điểm hình thái sau 7 ngày nuôi ủ và phân loại sơ bộ đến chi *Aspergillus*, có thể dự đoán các nhóm nấm mốc (gồm 65 dòng) đã phân lập được đều thuộc chi *Aspergillus*.

**Nhóm A1 và B1:** Khuẩn lạc thường tròn đến gần tròn, màu nâu đen đến đen. Bề mặt khuẩn lạc dạng hạt mịn, dày, thỉnh thoảng có rãnh. Mặt dưới màu trắng đến vàng, không có sắc tố hòa tan. Đường kính khuẩn lạc từ 38÷62 mm. Hệ khuẩn ty phân nhánh, có vách ngăn hoàn chỉnh, thường nhìn không rõ, màu trắng đến vàng xám. Cuống bào tử nhẵn, kích thước 400÷3000 µm. Bọng đỉnh giá hình cầu, đường kính 30÷75 µm, thể bình tầng 1 dài gấp đôi tầng 2. Kích thước thể bình 12÷40 µm. Bào tử đỉnh hình cầu, nhám, đường kính (3) 3,5÷4,5 (5) µm.

**Nhóm A2 và B2:** Khuẩn lạc dạng tròn hoặc gần tròn, màu đen. Bề mặt dày hoặc thưa, hạt nhô cao, chia thành nhiều khía. Mặt dưới màu xám. Đường kính khuẩn lạc từ 40÷50 mm. Hệ khuẩn ty màu trắng, phân nhánh, có vách ngăn hoàn chỉnh, kích thước 2÷3 mm. Cuống bào tử nhẵn, kích thước 2000÷3000 µm. Bọng đỉnh giá hình cầu, đường kính 40÷60 µm, thể bình 2 tầng. Kích thước thể bình 15÷30 (50) µm. Bào tử đỉnh hình cầu, nhám, đường kính 3÷3,5 µm.

**Nhóm A3 và B3:** Khuẩn lạc dạng gần tròn đến tròn, màu xanh xám cho đến xanh lục. Bề mặt dày và mịn. Mặt dưới màu vàng nhạt, ít khi tiết sắc tố hòa tan. Đường kính khuẩn lạc từ 45÷60 mm. Hệ khuẩn ty phân nhánh, có vách ngăn hoàn chỉnh, màu trắng. Cuống bào tử nhẵn, trong suốt, kích thước (100) 200÷400 (580) µm. Bọng đỉnh giá hình thìa, đường kính (10) 15÷30 (40) µm, thể bình 1 tầng, phủ lên hơn 2/3 bọng. Kích thước thể bình

5÷9 µm. Bào tử đỉnh hình cầu, nhám, đường kính 2÷3 (3,5) µm.

**Nhóm A4:** Khuẩn lạc dạng gần tròn đến tròn, màu nâu đậm đến đen. Bề mặt mịn. Mặt dưới màu xám đến nâu, vàng. Đường kính khuẩn lạc từ 30÷40 (45) mm. Hệ khuẩn ty phân nhánh, có vách ngăn hoàn chỉnh, màu trắng đục đến vàng sáng. Cuống bào tử nhẵn, trong suốt, kích thước (250) 400÷800 (1000) µm. Bọng đỉnh giá hình cầu, đường kính (19) 30÷50 (70) µm. Thể bình 2 tầng, kích thước 5÷18 (20) µm. Bào tử đỉnh hình cầu, có gai, đường kính 4÷5 (6) µm.

**Nhóm A5 và B4:** Khuẩn lạc hình tròn, màu đen. Mặt dưới không màu, vàng đục tới xám đậm. Đường kính khuẩn lạc từ (30) 35÷45 mm. Hệ khuẩn ty phân nhánh, có vách ngăn hoàn chỉnh, màu trắng thường khó nhìn thấy. Cuống bào tử nhẵn, trong suốt đến hơi nâu, kích thước (400) 1000÷3500 (6000) µm. Bọng đỉnh giá dạng gần cầu, đường kính (48) 65÷90 (100) µm. Thể bình 2 tầng, tầng 1 phủ lên toàn bộ bề mặt bọng, kích thước (15) 25÷40 (60) µm. Bào tử đỉnh rất lớn, hình cầu, nhám, đường kính (6) 7÷10 (11) µm.

**Nhóm A6 và B5:** Khuẩn lạc hình gần tròn đến tròn, màu nâu đậm đến đen. Mặt dưới nâu đến nâu đục hoặc vàng nhạt. Đường kính khuẩn lạc từ 30÷70 mm. Hệ khuẩn ty phân nhánh, có vách ngăn hoàn chỉnh, màu trắng. Cuống bào tử nhẵn, trong suốt, kích thước (150) 300÷600 (1400) µm. Bọng đỉnh giá dạng cầu, đường kính 14÷30 (47) µm. Thể bình 1 tầng phủ lên hơn nửa bề mặt bọng, kích thước 5÷9 (10) µm. Bào tử đỉnh hình cầu, có gai, đường kính (3,5) 4÷5 (6) µm.

**Nhóm A7 và B6:** Khuẩn lạc hình tròn, màu vàng xám nhạt đến nâu olive. Mặt dưới không màu đến nâu nhạt. Đường kính khuẩn lạc từ 39÷65 mm. Hệ khuẩn ty dày đặc, phân nhánh, có vách ngăn hoàn chỉnh, màu trắng đến kem. Cuống bào tử sần sùi, kích thước 500÷2500 (5000) µm. Bọng đỉnh giá dạng gần cầu, đường kính (8) 22÷50 (90) µm. Thể bình 2 tầng, kích thước (2) 8÷12 (15) µm. Bào tử đỉnh hình cầu, nhám, đường kính (3,5) 4÷8.5 (10) µm.

**Nhóm A8:** Khuẩn lạc hình gần tròn đến tròn, màu vàng nâu đến xanh lá. Mặt dưới không màu đến nâu nhạt hoặc vàng. Đường kính khuẩn lạc từ 55÷65 mm. Hệ khuẩn ty phân nhánh, có vách ngăn hoàn chỉnh, màu trắng. Cuống bào tử sần sùi, trong suốt, kích thước (250) 400÷800 (2500) µm. Bọng đỉnh giá dạng gần cầu, đường kính (12) 20÷45 (85) µm. Thể bình 2 tầng, kích thước (6) 8÷10 (16) µm. Bào tử đỉnh hình cầu, nhám, đường kính 3÷6 (8) µm.

**3.2 Khảo sát khả năng sinh tổng hợp cellulase của các dòng nấm mốc *Aspergillus* spp. đã phân lập được**

Từ kết quả đường kính vòng phân giải cellulose của các dòng nấm mốc *Aspergillus* spp. đã phân lập được, tiến hành thống kê để chọn ra những dòng sinh tổng hợp cellulase cao (Bảng 2).

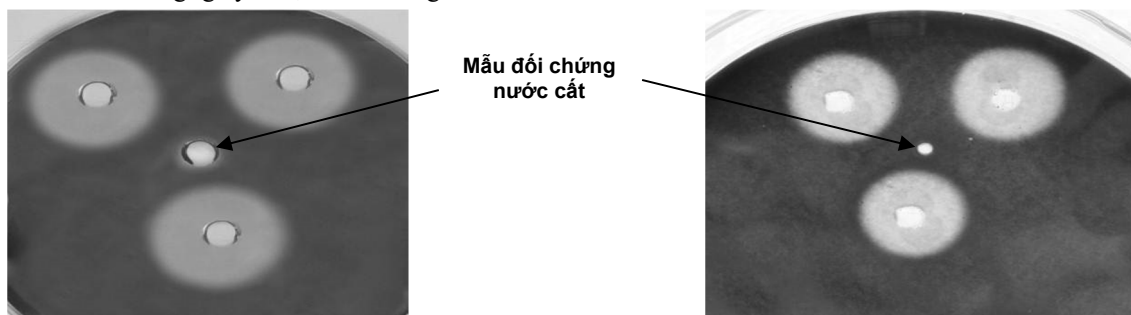
**Bảng 2: Đường kính vòng phân giải cellulose trên môi trường bổ sung CMC, GL của các dòng *Aspergillus* spp. đã phân lập**

Dòng nấm mốc (CMC)	Đường kính trung bình vòng phân giải cellulose (mm)	Dòng nấm mốc (GL)	Đường kính trung bình vòng phân giải cellulose (mm)
DR-CMC-1	20,33 <sup>f</sup>	DR-GL-1	13,67 <sup>f</sup>
DR-CMC-2	21,33 <sup>e</sup>	DR-GL-3	15,67 <sup>e</sup>
DR-CMC-3	25,00 <sup>c</sup>	DR-GL-7	12,00 <sup>g</sup>
DR-CMC-4	28,00 <sup>a</sup>	DR-GL-8	12,33 <sup>g</sup>
DR-CMC-6	18,00 <sup>g</sup>	DR-GL-9	23,33 <sup>a</sup>
DR-CMC-7	17,00 <sup>h</sup>	DR-GL-10	18,00 <sup>d</sup>
DR-CMC-8	18,00 <sup>g</sup>	DR-GL-11	18,67 <sup>d</sup>
DR-CMC-9	18,00 <sup>g</sup>	DRG-GL-2	12,00 <sup>g</sup>
DR-CMC-11	13,00 <sup>i</sup>	DRG-GL-4	22,33 <sup>b</sup>
BM-CMC-4	12,67 <sup>i</sup>	BM-GL-2	20,00 <sup>c</sup>
BM-CMC-6	27,00 <sup>b</sup>	BM-GL-3	22,00 <sup>b</sup>
BM-CMC-7	22,00 <sup>d</sup>	BM-GL-4	18,00 <sup>d</sup>
BM-CMC-10	12,00 <sup>k</sup>	R-GL-1	11,67 <sup>g</sup>
BM-CMC-11	13,00 <sup>i</sup>		
MC-CMC-1	13,00 <sup>i</sup>		
R-CMC-1	17,67 <sup>g</sup>		

\* Số liệu trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, trong cùng một cột các số mang chữ số mũ giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê 5% ( $p < 0,05$ ) và ngược lại

Từ Bảng 2 cho thấy, kích thước vòng phân giải của các dòng *Aspergillus* spp. ở môi trường có cơ chất cellulose là CMC lớn hơn (12-28 mm) trên môi trường bổ sung giấy (11,67-23,33 mm), và số lượng các dòng *Aspergillus* spp. tạo được vòng phân giải lớn môi trường CMC (16 dòng) cũng nhiều hơn trên môi trường giấy lọc (13 dòng). Xét về nguồn phân lập nấm mốc ban đầu, kết quả thống kê cho thấy đất rẫy và bã mía có số dòng *Aspergillus* spp. tạo vòng phân giải ở nhóm có giá trị đường kính phân giải lớn hơn các nguồn phân lập khác. Như vậy, trong 16 dòng *Aspergillus* spp. được khảo sát trên môi trường CMC và 13 dòng khảo sát trên môi trường giấy lọc, có 6 dòng trên môi

trường CMC, 4 dòng trên môi trường giấy lọc có khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulase cao, thể hiện qua đường kính vòng phân giải lớn hơn hoặc bằng 20 mm. Trong đó, sự hình thành vòng phân giải cellulose của dòng BM-CMC-6 và DR-GL-9 ở Hình 1 cho thấy có sự thủy phân cellulose tạo vòng tròn sáng rõ trên bề mặt thạch CMC và giấy lọc. Vòng phân giải cellulose rõ nét trên bề mặt môi trường thể hiện khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulase cao của hai dòng nấm mốc này. Kết quả này được thể hiện rõ ràng hơn khi so sánh với mẫu đối chứng sử dụng nước cất thì không có sự tạo thành vòng phân giải cellulose (Hình 1).



**Hình 1: Vòng phân giải cellulose của 2 dòng nấm mốc BM-CMC-6 (a) và DR-GL-9 (b)**

### 3.3 Tuyển chọn các dòng nấm mốc *Aspergillus* spp. đặc hiệu có khả năng phân giải cellulose mạnh trên các cơ chất cảm ứng khác nhau

Kết quả thí nghiệm cho thấy, các dạng cellulose trong mỗi cơ chất khác nhau ảnh hưởng đến khả năng phân giải cellulose của các dòng *Aspergillus* (Bảng 3). Thành phần cellulose ở mỗi loại cơ chất khác nhau sẽ kích thích nấm mốc sinh tổng hợp các enzyme khác nhau (endoglucanases,  $\beta$  – glucosidases...) trong hệ cellulase để phân giải. Từ Bảng 3 cho thấy có 5 dòng *Aspergillus* có khả năng phân giải các cơ chất cảm ứng cao (DR-CMC-3, DR-CMC-4, DR-GL-9, BM-CMC-6, BM-GL-3), các dòng này được tuyển chọn để khảo sát xác định các dòng đặc hiệu đối với quá trình sinh tổng hợp enzyme cellulase.

**Bảng 3: Tỷ lệ cơ chất (%) bị phân giải bởi các dòng nấm mốc *Aspergillus* spp.**

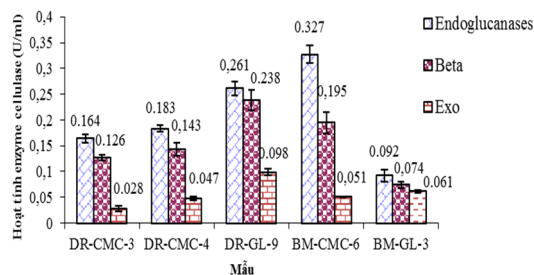
Dòng nấm mốc	Tỷ lệ cơ chất bị phân giải		
	Giấy lọc	Rơm	Bã mía
DR-CMC-1	24,82 <sup>f</sup>	27,27 <sup>f</sup>	30,79 <sup>d</sup>
DR-CMC-2	28,53 <sup>e</sup>	30,32 <sup>e</sup>	31,78 <sup>d</sup>
DR-CMC-3	50,31 <sup>b</sup>	34,66 <sup>d</sup>	53,98 <sup>b</sup>
DR-CMC-4	29,62 <sup>de</sup>	52,58 <sup>b</sup>	56,62 <sup>b</sup>
DR-GL-9	55,98 <sup>a</sup>	28,95 <sup>ef</sup>	57,12 <sup>b</sup>
DR-GL-4	39,28 <sup>c</sup>	43,24 <sup>c</sup>	35,63 <sup>d</sup>
BM-CMC-6	32,18 <sup>d</sup>	55,87 <sup>a</sup>	62,72 <sup>a</sup>
BM-CMC-7	31,18 <sup>de</sup>	31,18 <sup>e</sup>	33,81 <sup>d</sup>
BM-GL-2	21,13 <sup>g</sup>	22,82 <sup>g</sup>	24,68 <sup>e</sup>
BM-GL-3	52,25 <sup>b</sup>	54,01 <sup>ab</sup>	46,16 <sup>e</sup>
ĐC	0,00 <sup>h</sup>	0,00 <sup>h</sup>	0,00 <sup>f</sup>

\* Số liệu trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, trong cùng một cột các số mang chữ số mũ giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê 5% ( $p < 0,05$ ) và ngược lại

### 3.4 Khảo sát hoạt tính hệ enzyme cellulase của các dòng nấm mốc *Aspergillus* spp.

Từ kết quả cho thấy, 2 dòng BM-CMC-6 và DR-GL-9 cho hoạt tính endoglucanases cao nhất (0,327 và 0,248 U/mL) và khác biệt về mặt thống kê ở mức ý nghĩa 5% (Hình 2). Đồng thời, hoạt tính  $\beta$ -glucosidases ở 2 dòng này cũng cho có giá trị cao nhất (0,217 và 0,195 U/mL) so với 3 dòng

còn lại. Tuy nhiên, nếu xét giữa 2 dòng BM-CMC-6 và DR-GL-9 thì hoạt tính  $\beta$ -glucosidases không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%. Bên cạnh đó, các dòng *Aspergillus* spp. có hoạt tính exoglucanases thấp. Từ đó cho thấy nấm mốc *Aspergillus* có khả năng sinh tổng hợp exoglucanases ít hơn. Điều này phù hợp với kết quả của Roussos *et al.* (1982) khi nghiên cứu sự thủy phân cellulose từ các loài nấm, Trần Thanh Phong (2004) khi khảo sát khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulose từ *Trichoderma reesei* và *Aspergillus niger*.



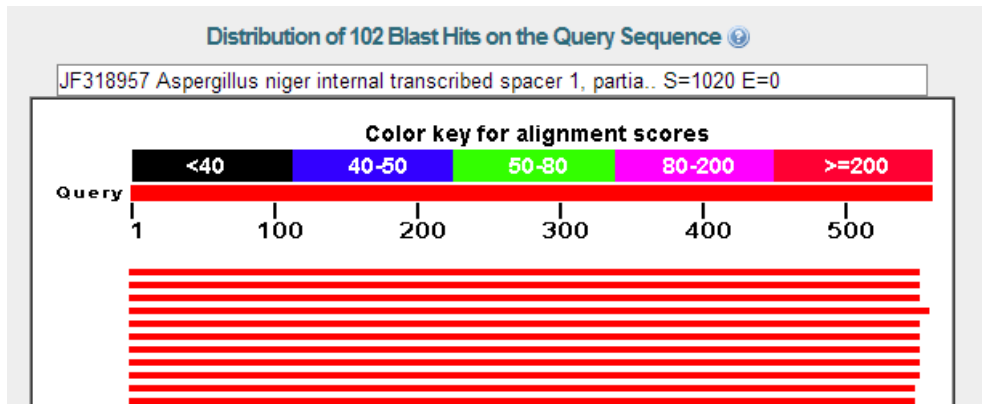
**Hình 2: Hoạt tính cellulase của các dòng nấm mốc *Aspergillus* spp. trên cơ chất bã mía**

### 3.5 Định danh các dòng *Aspergillus* spp. đã phân lập được bằng phương pháp sinh học phân tử

Dòng nấm BM-CMC-6 và dòng DR-GL-9 được chọn giải trình tự phạm vi vùng ITS1/ITS2 và trình tự này được so sánh mức độ tương đồng với trình tự của các dòng nấm trong ngân hàng gen trên NCBI.

#### Dòng nấm BM-CMC-6

Trình tự đoạn gen được giải gồm 560 nucleotide và đoạn gen này được so sánh với các gen trên Genbank với phần mềm BLASTN. Kết quả nhận được cho thấy đoạn trình tự vùng ITS1/ITS2 của rDNA của dòng BM-CMC-6 có độ tương đồng lên đến 100% so với trình tự gen của *Aspergillus niger* với số đăng ký trên ngân hàng gen quốc tế là JF318957.1 (Hình 3, 4). Như vậy, kết quả định danh dòng BM-CMC-6 là loài *Aspergillus niger*.



Hình 3: Mức độ tương đồng của dòng BM-CMC-6 với *Aspergillus niger* JF318957

Sequences producing significant alignments:

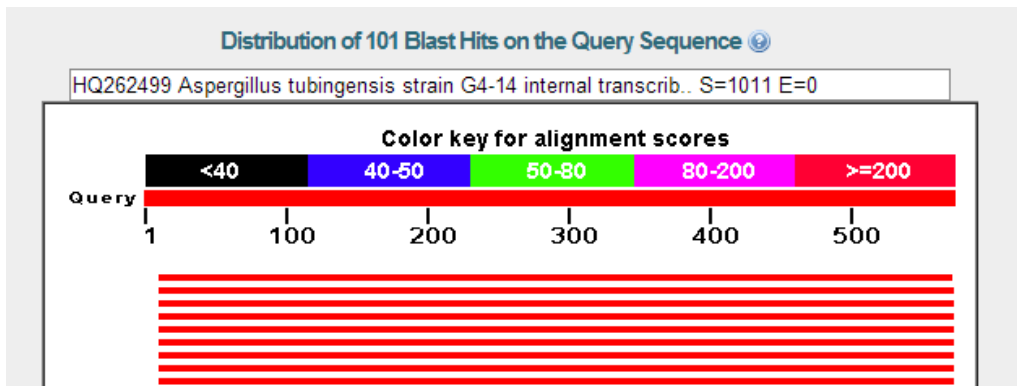
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">JF318957.1</a>	<i>Aspergillus niger</i> internal transcribed spacer 1, partial sequenc	<a href="#">1020</a>	1020	98%	0.0	100%	
<a href="#">JF436885.1</a>	<i>Aspergillus niger</i> strain YMA 119 internal transcribed spacer 1,	<a href="#">1014</a>	1014	98%	0.0	100%	

Hình 4: So sánh trình tự gen ITS1/ITS2 của dòng BM-CMC-6 với số đăng ký JF318957.1

**Dòng nấm DR-GL-9**

Trình tự đoạn gen được giải gồm 573 nucleotide và đoạn gen này được so sánh với các gen trên Genbank với phần mềm BLASTN. Kết quả nhận được cho thấy đoạn trình tự vùng

ITS1/ITS2 của rDNA của dòng DR-GL-9 có độ tương đồng lên đến 99% so với trình tự gen của *Aspergillus tubingensis* với số đăng ký trên ngân hàng gen quốc tế là HQ262499.1 (Hình 5, 6). Như vậy, kết quả định danh dòng DR-GL-9 là loài *Aspergillus tubingensis*.



Hình 5: Mức độ tương đồng của dòng DR-GL-9 với *Aspergillus tubingensis* HQ262499

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">HQ262499.1</a>	<i>Aspergillus tubingensis</i> strain G4-14 internal transcribed space	<a href="#">1011</a>	1011	98%	0.0	99%	
<a href="#">JF436888.1</a>	<i>Aspergillus tubingensis</i> strain YMCA 18 internal transcribed spa	<a href="#">1003</a>	1003	98%	0.0	99%	
.....	.....	.....	.....	.....	..	.....	

Hình 6: So sánh trình tự gen ITS1/ITS2 của dòng DR-GL-9 với số đăng ký HQ262499.1

**3.6 Ứng dụng hoạt tính phân giải cellulose của các dòng nấm *Aspergillus spp.* đã tuyển chọn để phân hủy bã mía sau trồng nấm**

Tỷ lệ C/N thể hiện mức độ phân hủy các chất

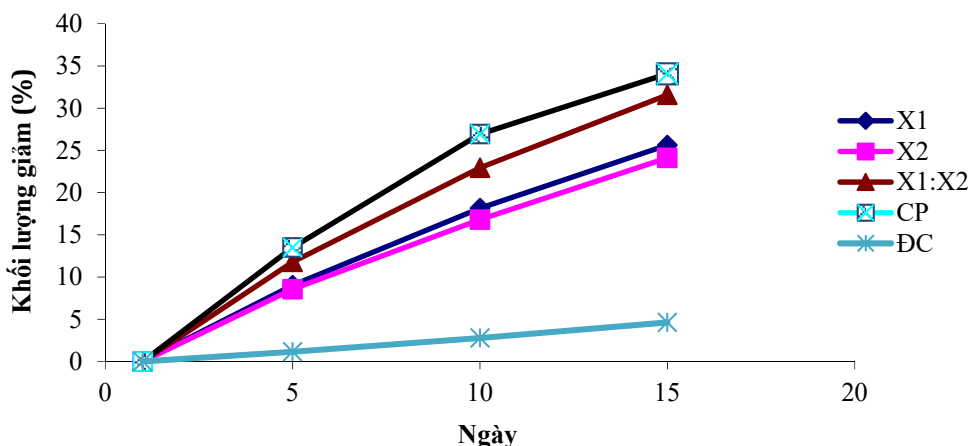
hữu cơ và mức cân bằng dinh dưỡng có trong khối ủ. Khả năng chuyển hóa các hợp chất carbon và nitơ càng mạnh thì tỷ lệ C/N càng giảm (Chang et al., 2008). Kết quả tỷ lệ C/N của các nghiệm thức thể hiện ở Bảng 4.

**Bảng 4: Hàm lượng carbon hữu cơ (%), nitơ tổng số (%) và tỷ lệ C/N của các nghiệm thức qua các ngày ủ**

Nghiệm thức	Ngày 5			Ngày 10			Ngày 15		
	C hữu cơ (%)	N tổng số (%)	Tỷ lệ C/N	C hữu cơ (%)	N tổng số (%)	Tỷ lệ C/N	C hữu cơ (%)	N tổng số (%)	Tỷ lệ C/N
X1	41,94 <sup>a</sup>	0,98 <sup>ab</sup>	42,68 <sup>ab</sup>	38,94 <sup>b</sup>	1,01 <sup>b</sup>	38,72 <sup>b</sup>	35,91 <sup>b</sup>	1,06 <sup>b</sup>	33,93 <sup>b</sup>
X2	42,44 <sup>a</sup>	0,97 <sup>a</sup>	43,53 <sup>a</sup>	39,92 <sup>b</sup>	0,98 <sup>b</sup>	40,51 <sup>ab</sup>	36,15 <sup>b</sup>	1,05 <sup>b</sup>	34,39 <sup>b</sup>
X1:X2	40,74 <sup>b</sup>	0,97 <sup>a</sup>	41,69 <sup>b</sup>	37,49 <sup>c</sup>	1,13 <sup>a</sup>	33,03 <sup>c</sup>	33,96 <sup>c</sup>	1,23 <sup>a</sup>	27,48 <sup>c</sup>
CP	39,69 <sup>c</sup>	1,01 <sup>a</sup>	39,33 <sup>c</sup>	36,97 <sup>c</sup>	1,17 <sup>a</sup>	31,62 <sup>c</sup>	32,84 <sup>d</sup>	1,34 <sup>a</sup>	24,62 <sup>d</sup>
ĐC	42,52 <sup>a</sup>	0,97 <sup>a</sup>	43,67 <sup>a</sup>	41,53 <sup>a</sup>	0,98 <sup>b</sup>	42,33 <sup>a</sup>	38,84 <sup>a</sup>	0,99 <sup>b</sup>	39,18 <sup>a</sup>

\* Số liệu trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, trong cùng một cột các số mang chữ số mũ giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê 5% (p<0,05) và ngược lại

\* X1=BM-CMC-6, X2=DR-GL-9, X1:X2= BM-CMC-6: DR-GL-9, CP=Chế phẩm Tricô-ĐHCT, ĐC=Đôi chứng, Kết quả đo C hữu cơ được phân tích bởi phòng Thí nghiệm chuyên sâu – Trường Đại học Cần Thơ



**Hình 7: Khả năng phân hủy bã cơ chất của các nghiệm thức qua các ngày ủ**

\* X1 = BM-CMC-6, X2 = DR-GL-9, CP = Chế phẩm Tricô-ĐHCT, ĐC = đôi chứng

Tỷ lệ C/N của các nghiệm thức X1, X2, X1:X2, CP giảm dần qua các ngày ủ (Bảng 4), chứng tỏ các dòng nấm mốc hoạt động khá hiệu quả trong việc phân giải bã mía. Ở ngày quan sát thứ 15, nghiệm thức X1:X2 (27,48) cho kết quả C/N thấp hơn mẫu ĐC và 2 nghiệm thức đơn dòng X1, X2, chứng tỏ sự kết hợp 2 dòng X1:X2 mang lại hiệu quả khá cao trong quá trình phân giải các hợp chất carbon của bã mía. Tuy nhiên, tỷ lệ C/N của nghiệm thức X1:X2 vẫn còn cao hơn CP (24,62). Nhưng với kết quả phân giải bã mía tương đối hiệu quả của sự kết hợp 2 dòng nấm mốc X1:X2 đã mở ra triển vọng về khả năng phân giải bã mía mạnh khi 2 dòng này được tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp cellulase.

Bên cạnh tỷ số C/N, khả năng phân hủy bã mía sau trồng nấm của các nghiệm thức còn được thể hiện qua khối lượng giảm (%) của bã mía sau thời gian ủ (Hình 7). Kết quả cho thấy, khối lượng bã mía ở tất cả các nghiệm thức đều giảm dần qua các thời điểm ghi nhận, tức là khả năng phân hủy bã mía sau trồng nấm của các nghiệm thức giữa các ngày lấy mẫu tăng dần. Trong đó, các nghiệm thức X1, X2, CP, X1:X2 đều có khối lượng giảm đi (%) nhiều hơn mẫu ĐC. Nghiệm thức X1:X2 có khối lượng bã mía giảm đi (%) cao hơn hai nghiệm thức đơn dòng (X1 và X2) và ĐC. Khối lượng bã mía giảm đi (%) ở nghiệm thức CP (34,08%) cao hơn X1:X2 (31,57%). Tuy nhiên, từ sự chênh lệch kết quả của 2 nghiệm thức này cho thấy việc kết hợp 2 dòng X1 và X2 bước đầu đã thể hiện sự hợp lý và



tính hiệu quả đối với mục tiêu phân giải bã mía sau trồng nấm.

## 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

### 4.1 Kết luận

Từ 5 nguồn đất rẫy, đất ruộng, bã mía, mùn cưa, rơm đã phân lập được 65 dòng nấm mốc thuộc chi *Aspergillus*. Trong đó, trên môi trường CZ nguồn carbon bổ sung là CMC thu được 41 dòng *Aspergillus*, môi trường CZ bổ sung giấy lọc thu được 24 dòng. Chọn được 10 dòng có đường kính vòng phân giải lớn hơn hoặc bằng 20 mm. Trong đó, 5 dòng DR-CMC-3, DR-CMC-4, DR-GL-9, BM-CMC-6, BM-GL-3 có khả năng phân giải cellulose cao nhất trên cơ chất cám ứng bã mía, rơm khô, giấy lọc. Tuyển chọn được 2 dòng BM-CMC-6 và DR-GL-9 có tính đặc hiệu với enzyme endoglucanses và  $\beta$ -glucosidases cao nhất. Phối hợp 2 dòng BM-CMC-6 và DR-GL-9 khi ứng dụng phân giải bã mía sau trồng nấm cho khả năng phân giải khá cao với kết quả sau 15 ngày tỷ lệ C/N là 27,48 và khối lượng bã cơ chất mất đi 31,57%. Bằng phương pháp giải trình tự kết hợp với đặc điểm hình thái đã xác định đến mức độ loài BM-CMC-6 là *Aspergillus niger* và DR-GL-9 là *Aspergillus tubingensis*.

### 4.2 Đề xuất

Nghiên cứu một số điều kiện như pH, nhiệt độ... nhằm tối ưu hóa khả năng sinh tổng hợp cellulose của 2 dòng *Aspergillus niger* và *Aspergillus tubingensis* đã tuyển chọn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Chang J.I., Tin-En. Hsu., 2008. Effects of compositions on wood waste composting. *Bioresource Technology*, 99, 8068-8074pp.

Coral G., Arikan B., Unaldi M., Guvenmes H., 2002. Some properties of crude carboxymethyl cellulase of *Aspergillus niger* Z10 wild-type Strain. *Turk J Biol*, 26: 209-213.

Gardes, M. and T. Bruns., 1993. ITS primer with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rust. *Mol. Ecol.*, 2:113 - 118.

Huldrych Egli., 2008. *Kjeldahl Guide*. BUCHI Labortechnik AG, CH-9230 Flawil, Switzerland, 15-39.

Khairnar Y., K. Krishna, A. Boraste, N. Gupta, S. Trivedi, P. Patil, G. Gupta, A. Jhadav, A. Mujapara, B. Joshi and D. Mishra. 2009. Study of pectinase production in submerged fermentation using different strains of *Aspergillus niger*. *International Journal of Microbiology Research* 1(2): 13 -17.

Klich M. A., 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau Voor Schimmelcultures CBS, Utrecht, The Netherlands.

Nelson N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem*, 153: 375-380.

Nguyễn Đức Lượng, Phan Thị Huyền và Nguyễn Anh Tuyết., 2006. Công nghệ sinh học (tập 2). Thí nghiệm vi sinh vật học. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, 121 – 122.

Roussos S., Raimbault M. 1982. Hydrolysis of cellulose by fungi. The production of cellulase by *Trichoderma harzianum* by fermentation in liquid media. *Ann Microbiol (Paris)*. 133 (3): 65-74pp.

Samson R.A. and Ellen S. van Reenen-Hoekstra., 1988. Introduction to food-borne fungi. Institute of the Royal Netherlands Academy of arts and sciences, 56-85.

Samson R.A., Noonim P., Meijer M., Houbraken J., Frisvad J.C. and Varga J., 2007. Diagnostic tools to identify black *Aspergilli*. *Studies in mycology* 59:129-145.

Trần Minh Tâm., 2000. Công nghệ vi sinh ứng dụng. Nhà xuất bản Nông nghiệp, 57-61.

Trần Nhân Dũng., 2011. Sổ tay thực hành sinh học phân tử. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ, trang 43-56.

Trần Thanh Phong., 2004. Khảo sát khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulase từ *Trichoderma reesei* và *Aspergillus niger* trên môi trường lên men bán rắn. Luận văn Thạc sỹ Khoa học Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP. Hồ Chí Minh, 38-41.

Ulrich A., G. Klimke, S. Wirth., 2008. Diversity and Activity of Cellulose-Decomposing Bacteria, Isolated from a Sandy and a Loamy Soil after Long-Term Manure Application. *Microb Ecol*. 55:512–522.

Walkley A., 1935. An examination of methods for determining organic C and nitrogen in soils. *J Agr Sci*. 25: 589-609.

White T.J., Bruns T., Lee S. and Taylor J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York, 315- 322.