



PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN MỘT SỐ ĐÒNG NẤM BẢN ĐỊA PHÂN HỦY MỘT SỐ VẬT LIỆU HỮU CƠ TỪ NỀN ĐẤT THÂM CANH LÚA TẠI XÃ PHONG HÒA, HUYỆN LAI VUNG, TỈNH ĐỒNG THÁP

Võ Thị Ngọc Cẩm¹, Nguyễn Thị Kiều Oanh¹, Đỗ Hoàng Sang¹, Nguyễn Thị Tô Quyên¹, Đỗ Thị Xuân¹, Dương Minh Viễn¹ và Nguyễn Khởi Nghĩa¹

¹ Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 15/12/2014

Ngày chấp nhận: 26/02/2015

Title:

Isolation and identification of some native organic agricultural waste decomposing fungi from intensive rice cultivation soil at Phong Hoa village, Lai Vung district, Dong Thap Province

Từ khóa:

Phân lập, nấm, phân hủy, vật liệu hữu cơ và đất canh tác lúa

Keywords:

Isolation, fungi, decomposition, organic agricultural wastes and rice cultivation soil

ABSTRACT

Aim of this study was to isolate native fungal strains from an intensive rice cultivation soil sample at Phong Hoa village, Lai Vung district, Dong Thap province to quickly decompose organic wastes. Soil sample was collected from the rice farm with historical rice cultivation of more than 30 years. The Bushnell Haas Medium (BHM) media containing carboxymethyl cellulose (CMC)/lignin as the only carbon source was used to isolate and purify fungi. The commercial fungal strain of Can Tho University, *Trichoderma* sp., was chosen as a positive control. The results showed that 17 fungal with a high potential of decomposition of organic agricultural wastes were isolated and purified. Results of the decomposition experiments for six organic materials under the sterile condition after 30 incubation days revealed that different fungi had different decomposing capacities, with the highest capacity being found in the PH-C5 strain for both rice straw and spent coffee ground at a rate of 47,6% and 48,1%, respectively. Sugarcane bagasse and coconut peat were highly degraded by the PH-L3 strain with a decomposing rate of 46,9% and 37,2%, respectively while sawdust and rice husk degradation was highest by the PH-L4 (32,9%) and the PH-L6 (50,9%). *Trichoderma* sp. showed lowest decomposition capacity for six selected organic materials under both sterile and non-sterile conditions as compared to PH-C5, PH-L3, PH-L4 and PH-L6 strain. Basing on the results of ITS region sequences, these four candidates were genetically identified as *Aspergillus fumigatus* (PH-C5), *Penicillium janthinellum* (PH-L3), *Aspergillus fumigatus* (PH-L4) and *Rhizomucor variabilis* (PH-L6).

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm phân lập và tuyển chọn một số dòng nấm bản địa từ nền đất thâm canh lúa tại xã Phong Hòa, huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp phân hủy nhanh vật liệu hữu cơ từ nông nghiệp. Mẫu đất thu từ nền đất canh tác lúa trên 30 năm. Môi trường Bushnell Haas Medium (BHM) bổ sung carboxymethyl cellulose (CMC)/lignin như là nguồn carbon duy nhất được sử dụng để phân lập và tách ròng nấm. Dòng nấm *Trichoderma* sp. (sản phẩm của Đại học Cần Thơ) được chọn như là đối chứng dương. Kết quả cho thấy tổng cộng 17 dòng nấm có tiềm năng phân hủy vật liệu hữu cơ từ nền đất lúa được phân lập. Kết quả phân hủy sáu vật liệu hữu cơ trong điều kiện tiệt trùng cho thấy dòng nấm PH-C5 phân hủy cao hơn so với các dòng khác với vật liệu rơm (47,6%) và bã cà phê (48,1%). Tương tự, dòng nấm PH-L3 cũng phân hủy cao hơn các dòng khác với vật liệu xác mía và mụn dừa, lần lượt 46,9% và 37,2% trọng lượng khô sau 30 ngày thí nghiệm. Trong khi đó, dòng nấm PH-L4 và PH-L6 có phần trăm phân hủy lần lượt 32,9% (mùn cưa) và 50,9% (vỏ trấu) và cao hơn so với các dòng khác. Khả năng phân hủy vật liệu hữu cơ từ nông nghiệp của bốn dòng nấm này cao hơn so với *Trichoderma* sp. cả hai điều kiện tiệt trùng và không tiệt trùng. Kết quả giải mã trình tự đoạn gene ITS và định danh cho thấy chúng có thứ tự tên loài: *Aspergillus fumigatus* (PH-C5), *Penicillium janthinellum* (PH-L3), *Aspergillus fumigatus* (PH-L4) và *Rhizomucor variabilis* (PH-L6).

1 GIỚI THIỆU

Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) là vùng trọng điểm cho cây lúa và nông nghiệp, hàng năm sản lượng nông nghiệp và sản lượng nông sản xuất khẩu gia tăng đáng kể. Tuy nhiên, ĐBSCL đang phải đối mặt với vấn đề xử lý và giải quyết phế phẩm nông nghiệp trong và sau thu hoạch. Chỉ riêng lượng rơm và vỏ trấu hàng năm có khoảng gần chục triệu tấn thải ra trong quá trình thu hoạch và chế biến gạo, bên cạnh đó, các phế phẩm nông nghiệp khác như: mùn cưa, mụn dừa, xác mía,... cũng chiếm một lượng rất lớn trong tổng lượng phế phẩm nông nghiệp và cũng đang được tập trung quan tâm để xử lý.

Với phế phẩm giàu cellulose, hemicellulose và lignin này, một lượng rất ít được sử dụng để đun nấu, dùng làm giá thể trồng nấm, làm thức ăn cho gia súc, tuy nhiên hiệu quả mang lại chưa cao do chi phí thu gom vận chuyển phế phẩm nông nghiệp tương đối cao so với giá trị sử dụng của chúng nên phần lớn được xử lý theo phương pháp truyền thống là đốt bỏ hoặc thải trực tiếp ra môi trường bên ngoài. Điều này không chỉ làm tăng thêm gánh nặng môi trường mà còn làm lãng phí về các nguồn sinh khối, do đó cần phải thực hiện nghiêm ngặt các tiêu chuẩn đối với việc thải các chất thải vào môi trường. Tuy nhiên, việc phân hủy cellulose và lignin bằng phương pháp vật lý và hóa học rất phức tạp, tốn kém và gây độc hại cho môi trường. Trong khi đó, việc xử lý các chất thải hữu cơ chứa cellulose và lignin bằng công nghệ vi sinh là một biện pháp rất hiệu quả, thân thiện với môi trường sinh thái và sức khỏe người dân.

Để rút ngắn thời gian phân hủy của các vật liệu hữu cơ chứa cellulose và lignin khó phân hủy trong thời gian compost vi sinh vật gồm: nấm, vi khuẩn, xạ khuẩn... thường được bổ sung, đặc biệt là nấm. Kết quả thu được cuối cùng là compost hoại mục,

là một dạng phân hữu cơ vi sinh giúp cải tạo chất lượng và dinh dưỡng đất một cách nhanh chóng, hiệu quả và giúp tăng năng suất cây trồng. Điều này có nghĩa là các chất dinh dưỡng trong phế phẩm nông nghiệp được tái sử dụng đồng thời giúp giảm được lượng rác hữu cơ thải ra môi trường bên ngoài. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu: Phân lập và tuyển chọn một số dòng nấm bản địa có khả năng phân hủy nhanh một số vật liệu hữu cơ từ nền đất thâm canh lúa tại xã Phong Hòa, huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Mẫu đất và nguồn vật liệu hữu cơ

Mẫu đất dùng cho phân lập nấm có tiềm năng phân hủy vật liệu hữu cơ được thu từ nền đất thâm canh lúa tại trên 30 năm xã Phong Hòa, huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp. Dùng khoan lấy mẫu với độ sâu 0-20 cm, lấy 5 điểm trên ruộng lúa, sau đó các mẫu được trộn đều thành một mẫu đại diện. Mẫu đất đem về được phơi ở nhiệt độ phòng thí nghiệm, sau đó nghiền qua rây 0,2 mm. Một lượng mẫu đất (300 g) sau khi xử lý đem phân tích các chỉ tiêu hóa và lý học đất như: Sa cấu đất (cát, thịt và sét), pH, chất hữu cơ, N tổng số, P tổng số và K tổng số.

Sáu vật liệu hữu cơ dùng cho thí nghiệm gồm: rơm, xác mía, mụn dừa, mùn cưa, bã cà phê và vỏ trấu là những phế phẩm nông nghiệp được thu thập cho bố trí thí nghiệm. Rơm và xác mía được cắt thành đoạn ngắn khoảng 2 cm. Tất cả các vật liệu hữu cơ thí nghiệm được rửa sạch với nước vòi 4 lần, sau đó rửa lại 2 lần với nước cất, trải mỏng và để khô trong điều kiện phòng thí nghiệm. Sau đó, hiệu chỉnh đến 80% ẩm độ của vật liệu thí nghiệm (Hình 1). Một số đặc tính hóa học của vật liệu hữu cơ sử dụng trong thí nghiệm được phân tích bao gồm: C tổng số, N tổng số, P tổng số và K tổng số.



Hình 1: Sáu vật liệu hữu cơ gồm: rơm, xác mía, mụn dừa, mùn cưa, bã cà phê và vỏ trấu chứa cellulose và lignin dùng trong thí nghiệm

2.2 Phân lập một số dòng nấm có tiềm năng phân hủy nhanh vật liệu hữu cơ chứa cellulose và lignin

Cân 1 g đất (trọng lượng khô kiệt) vào bình tam giác 100 mL tiệt trùng chứa 25 mL môi trường Bushnell Haas Medium (BHM) bổ sung CMC hoặc lignin như là nguồn carbon duy nhất cho nấm sinh trưởng và phát triển. Công thức môi trường BHM trong 1 lít như sau: 5 g CMC hoặc lignin, 0,2 g $MgSO_4 \cdot x7H_2O$, 1g K_2HPO_4 , 1g KH_2PO_4 , 1g NH_4NO_3 , 0,05g $FeCl_3 \cdot x6H_2O$ và 0,02g $CaCl_2$. Môi trường BHM được tiệt trùng trong 20 phút ở $121^\circ C$ trong nồi hấp tiệt trùng. Sau khi tiệt trùng, Nystatin với nồng độ 30 mg mL^{-1} cho vào môi trường dùng để phân lập nấm nhằm ngăn cản sự phát triển của vi khuẩn. Mẫu nuôi cấy được đặt trên máy lắc với tốc độ 100 vòng/phút ở điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm và trong tối. Sau khi quan sát và thấy nấm phát triển tốt, tiến hành hút 1 mL môi trường nuôi cấy chứa nấm vào trong bình tam giác tiệt trùng chứa 24 mL môi trường BHM mới và tiếp tục lắc trên máy lắc. Toàn bộ qui trình làm giàu mật số nấm có khả năng phân hủy cellulose và lignin trong môi trường lỏng được lặp lại 5 lần. Sau 5 lần nuôi cấy liên tục, 0,1 mL môi trường nuôi cấy chứa nấm với các nồng độ pha loãng khác nhau (hệ số pha loãng là 10) được trải lên trên bề mặt môi trường agar BHM chứa CMC hoặc lignin để tách ròi những khuẩn lạc nấm phát triển trên bề mặt môi trường nuôi cấy. Qui trình tách ròi và tinh sạch dòng thuần của nấm được thực hiện liên tục trong 5 lần cấy chuyển trên môi trường agar BHM. Hình thái và sinh lý khuẩn lạc cũng như hình thái tế bào của những dòng nấm phân lập được xác định sau khi tinh sạch.

2.3 Đánh giá khả năng phân hủy đối với một số vật liệu hữu cơ từ phế phẩm nông nghiệp chứa cellulose và lignin trong điều kiện tiệt trùng của 17 dòng nấm phân lập

Thí nghiệm được thực hiện nhằm đánh giá khả năng phân hủy một số vật liệu hữu cơ chứa cellulose và lignin trong điều kiện tiệt trùng của 17 dòng nấm phân lập và đồng thời so sánh khả năng phân hủy đối với một số vật liệu hữu cơ của 17 dòng nấm phân lập này với dòng nấm *Trichoderma* sp. (sản phẩm thương mại của Đại học Cần Thơ) được làm dòng nấm tham khảo như là đối chứng dương.

Qui trình được thực hiện như sau: Cân 16 g, 9 g, 5 g, 7 g, 17 g, và 18 g (trọng lượng khô) lần lượt các vật liệu hữu cơ gồm: mía, mụn dừa, rơm, vỏ trấu, mùn cưa và bã cà phê cho vào đĩa petri thủy tinh (Lưu ý: các vật liệu được rửa sạch với nước cất và hiệu chỉnh ẩm độ về 80%). Sau đó, đĩa petri chứa vật liệu hữu cơ được tiệt trùng 3 lần bằng nồi hấp tiệt trùng ở nhiệt độ $121^\circ C$ trong 20 phút. Sau đó, đặt 5 khối agar Malt Extract (đường kính 6 mm) chứa sợi nấm phát triển tốt vào đĩa petri ở vị trí 4 góc và trung tâm đĩa, dán parafilm bên ngoài tránh nhiễm mẫu. Nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự như các nghiệm thức khác, tuy nhiên, không có dòng nấm nào được chủng vào vật liệu hữu cơ. Thí nghiệm được bố trí với 3 lần lặp lại cho mỗi dòng nấm thử nghiệm đối với mỗi vật liệu và kéo dài trong 30 ngày.

Sau 30 ngày nuôi cấy, các đĩa Petri chứa mẫu vật liệu hữu cơ thí nghiệm được sấy ở nhiệt độ $105^\circ C$ trong 5 giờ trong tủ sấy, sau đó đem cân để xác định trọng lượng khô của vật liệu hữu cơ giảm

sau thời gian nuôi cấy. Công thức tính phần trăm phân hủy vật liệu hữu cơ (%): (Khối lượng ban đầu – Khối lượng lúc sau)/Khối lượng ban đầu x 100.

2.4 Đánh giá khả năng phân hủy đối với một số vật liệu hữu cơ từ phế phẩm nông nghiệp chứa cellulose và lignin trong điều kiện không tiết trùng của 4 dòng nấm tuyến chọn

Thí nghiệm được thực hiện nhằm đánh giá khả năng phân hủy đối với một số vật liệu hữu cơ từ phế phẩm nông nghiệp chứa cellulose và lignin trong điều kiện không tiết trùng của 4 dòng nấm thể hiện khả năng phân hủy cao nhất vật liệu hữu cơ thử nghiệm, đồng thời, so sánh khả năng phân hủy đối với một số vật liệu hữu cơ của 4 dòng nấm tuyến chọn này với dòng nấm *Trichoderma* sp. (sản phẩm thương mại của Đại học Cần Thơ) được làm dòng nấm tham khảo như là đối chứng dương.

Quy trình bố trí và chỉ tiêu theo dõi thí nghiệm đánh giá khả năng phân hủy vật liệu hữu cơ trong điều kiện không tiết trùng được thực hiện tương tự như thí nghiệm trong điều kiện tiết trùng (mục 2.3), ngoại trừ vật liệu hữu cơ không được tiết trùng. Thí nghiệm được bố trí với 4 lần lặp lại cho mỗi dòng nấm, mỗi vật liệu và được kéo dài trong 30 ngày.

2.5 Giải mã trình tự 1 đoạn gene ITS của 4 dòng nấm tuyến chọn

DNA của nấm được trích bằng CTAB 3% (Ihrmark và ctv., 2012). Sử dụng cặp mồi ITS

1FF/ITS4 (Do Thi Xuan, 2012) nhắm vào vùng ITS cho phản ứng PCR. Thành phần của 1 phản ứng PCR bao gồm (thể tích/1 phản ứng): 5 µL Dream taq buffer (5x); 0,5 µL mồi xuôi ITS 1F (10 µM); 0,5 µL mồi ngược ITS 4 (10 µM); 10 µL DNA tinh sạch được pha loãng 50 lần; 5,625 µL nước (không chứa DNA); 0,5 µL dNTP (10 mM); 2,75 µL MgCl₂ (25 mM) và 0,125 µL Dream taq (5 U/µL). Chương trình nhiệt của phản ứng PCR gồm: Bước 1: 94°C trong 5 phút; Bước 2: 35 chu kỳ, gồm: 94°C trong 30 giây; 55°C trong 30 giây và 72°C trong 30 giây, và Bước 3: 72°C trong 7 phút. Kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose trước khi giải trình tự đoạn gen. Kết quả giải trình tự đoạn gen sẽ được nhận dạng trên ngân hàng gene NCBI <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> để xác định tên loài của bốn dòng nấm tuyến chọn.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Đặc tính lý, hóa học của mẫu đất và một số vật liệu hữu cơ thí nghiệm

Kết quả phân tích các đặc tính lý, hóa học đất được trình bày trong Bảng 1 cho thấy mẫu đất lúa này có thành phần sa cấu chủ yếu là thịt 49,9% và sét 48,0%. Giá trị pH là 5,2, các thành phần N, P, K tương đối thấp. Tỷ lệ % chất hữu cơ tương đối cao (5,36%). Điều này chứng tỏ mẫu đất này là môi trường thích hợp cho vi sinh vật sinh trưởng và phát triển tốt trong đó có cộng đồng nấm phân hủy chất hữu cơ chứa cellulose và lignin.

Bảng 1: Đặc tính lý và hóa học của mẫu đất thí nghiệm (Phòng phân tích Bộ môn Khoa học Đất, Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ)

Ký hiệu mẫu	pH	N _{ts}	P _{ts}	K _{ts}	CHC (%)	Cát (%)	Sa cấu	
							Thịt (%)	Sét (%)
PH	5,2	0,27	0,072	1,21	5,36	2,10	49,9	48,0

Ghi chú: N_{ts}: là đạm tổng số, P_{ts}: là lân tổng số, K_{ts}: là kali tổng số và CHC: là chất hữu cơ

Kết quả phân tích một số đặc tính hóa học của sáu vật liệu hữu cơ dùng trong thí nghiệm được trình bày trong Bảng 2. Kết quả cho thấy: trong các vật liệu hữu cơ thí nghiệm, bã cà phê có thành phần dinh dưỡng cao nhất thông qua các thông số sau đây: 1) Có hàm lượng carbon tổng số cao nhất (62,64%); 2) Hàm lượng đạm tổng số cao nhất, chiếm 2,44% và 3) Hàm lượng lân tổng số cao nhất, chiếm 0,47% và 4) Tỷ lệ C:N là 26. Điều này cho thấy bã cà phê có hàm lượng dinh dưỡng hữu

dụng rất cao cho cây trồng, đặc biệt là đạm và lân. Trong khi đó, các vật liệu hữu cơ còn lại như: xác mía, vỏ trấu, mụn dừa, rom và mùn cưa chứa chủ yếu hàm lượng carbon (chiếm trên 40%), trong khi các thành phần dinh dưỡng khác rất thấp. Các vật liệu hữu cơ này có tỷ lệ C:N rất cao, dao động từ khoảng 66 – 231. Do đó, việc xử lý nhằm làm giảm tỷ lệ C:N của các vật liệu này thông qua việc ủ compost là rất cần thiết.

Bảng 2: Một số đặc tính hóa học của sáu vật liệu hữu cơ thí nghiệm (Phòng phân tích Bộ Môn Khoa học Đất, Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ)

Mẫu	C _{ts} (%)	N _{ts} (%)	P _{ts} (%)	K _{ts} (%)	Tỉ lệ C:N
Bã cà phê	62,64	2,44	0,47	0,94	26
Mía	57,81	0,25	0,13	0,08	231
Vỏ trấu	43,29	0,36	0,13	0,40	120
Mụn dừa	60,31	0,38	0,12	0,77	159
Rơm	51,75	0,78	0,31	1,69	66
Mùn cưa	52,51	0,43	0,12	0,04	122

Ghi chú: C_{ts}: là carbon tổng số, N_{ts}: là đạm tổng số, P_{ts}: là lân tổng số và K_{ts}: là kali tổng số

3.2 Phân lập một số dòng nấm có tiềm năng phân hủy nhanh vật liệu hữu cơ chứa cellulose và lignin

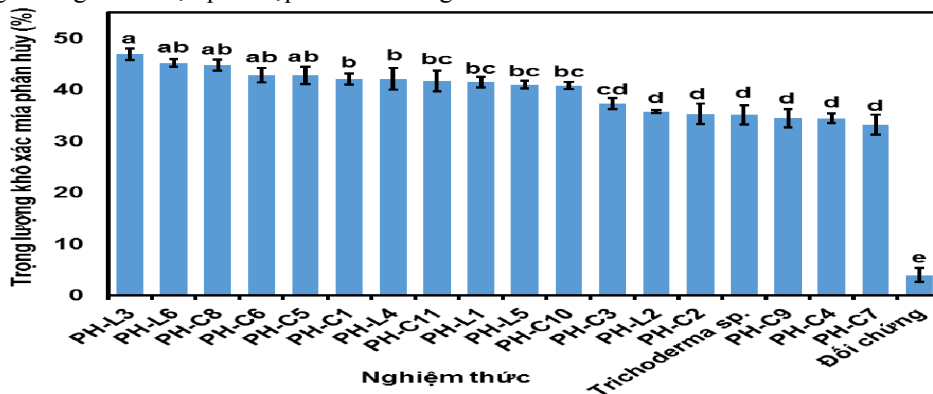
Kết quả phân lập nấm từ mẫu đất thâm canh lúa tại xã Phong Hòa, huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp cho thấy tổng cộng có 17 dòng nấm phân lập có tiềm năng phân hủy vật liệu hữu cơ chứa cellulose và lignin. Trong đó, tổng cộng 11 dòng nấm được phân lập từ môi trường BHM bổ sung CMC như là nguồn carbon duy nhất được ký hiệu: PH-C1, PH-C2, PH-C3, PH-C4, PH-C5, PH-C6, PH-C7, PH-C8, PH-C9, PH-C10, và PH-C11 và tổng cộng 6 dòng nấm được phân lập từ môi trường

BHM bổ sung lignin như là nguồn carbon duy nhất ký hiệu: PH-L1, PH-L2, PH-L3, PH-L4, PH-L5 và PH-L6.

3.3 Khả năng phân hủy đối với một số vật liệu hữu cơ từ phế phẩm nông nghiệp chứa cellulose và lignin trong điều kiện tiệt trùng của 17 dòng nấm phân lập

3.3.1 Xác mía

Kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng phân hủy đối với vật liệu hữu cơ xác mía sau 30 ngày của 17 dòng nấm phân lập và dòng nấm *Trichoderma* sp. (sản phẩm của Đại Học Cần Thơ) được trình bày ở Hình 2. Nhìn chung, tất cả 17 dòng nấm thử nghiệm đều có khả năng phân hủy xác mía rất cao, dao động từ 33,2% đến 46,9% và đều khác biệt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng. Dòng nấm PH-L3 có phần trăm phân hủy xác mía cao hơn (46,9%) so với các dòng khác. Dòng nấm *Trichoderma* sp. phân hủy 35,1% trọng lượng xác mía khô sau 30 ngày thí nghiệm, thấp hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với dòng nấm PH-L3. Tóm lại, cả 18 dòng nấm thử nghiệm đều có khả năng phân hủy cao xác mía và dòng nấm PH-L3 là dòng thể hiện khả năng phân hủy cao đối với vật liệu xác mía và do đó, được chọn để thực hiện thử nghiệm tiếp theo về phân hủy xác mía của dòng nấm này trong điều kiện thí nghiệm không tiệt trùng.

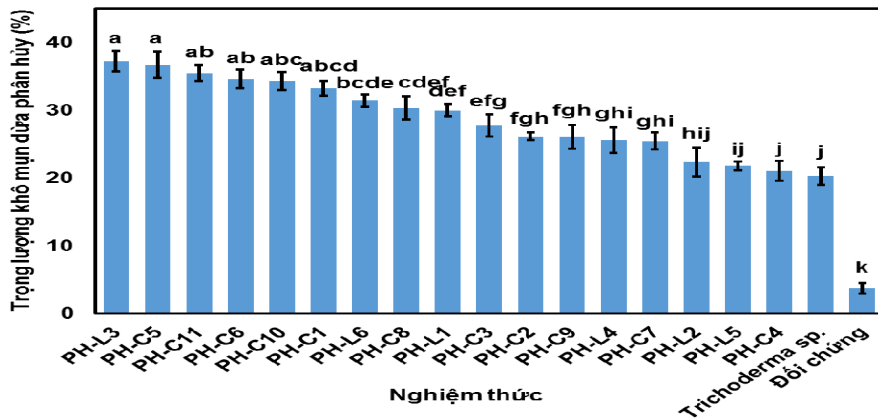


Hình 2: Khả năng phân hủy xác mía trong điều kiện tiệt trùng của 18 dòng nấm thử nghiệm sau 30 ngày nuôi cấy (n=3 và độ lệch chuẩn)

3.3.2 Mụn dừa

Kết quả đánh giá khả năng phân hủy đối với vật liệu hữu cơ mụn dừa sau 30 ngày thí nghiệm của 17 dòng nấm phân lập và dòng nấm *Trichoderma* sp. được trình bày ở Hình 3 cho thấy tất cả 18 dòng nấm thử nghiệm đều có khả năng phân hủy mụn dừa rất tốt, phần trăm phân hủy của các dòng nấm dao động từ 21,0% đến 37,2% và đều khác biệt ý

nhĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Phần trăm phân hủy mụn dừa của PH-L3 là 37,2%, cao hơn so với các dòng khác. Trong khi đó, dòng nấm *Trichoderma* sp. phân hủy 20,3% trọng lượng khô mụn dừa, thấp hơn và có sự khác biệt ý nghĩa thống kê so với dòng PH-L3. Do đó, dòng này được chọn để thực hiện thử nghiệm tiếp theo về phân hủy mụn dừa trong điều kiện không tiệt trùng.

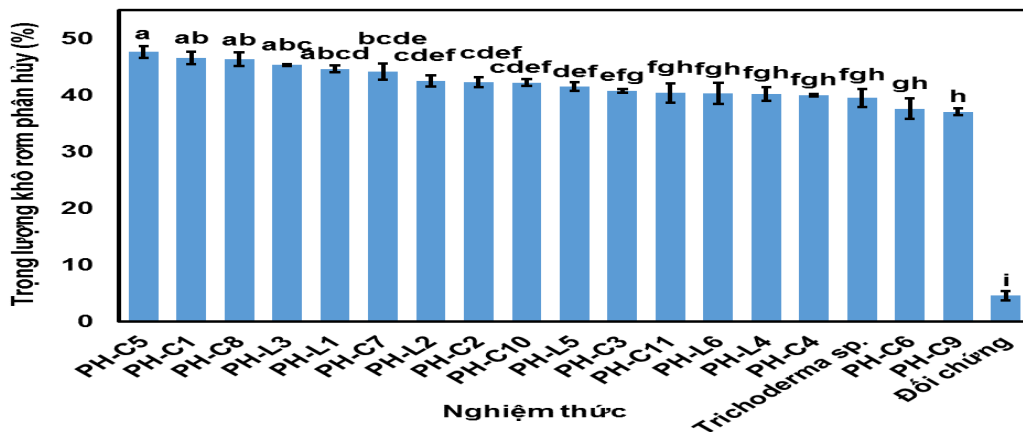


Hình 3: Khả năng phân hủy mùn dừa trong điều kiện tiệt trùng của 18 dòng nấm thử nghiệm sau 30 ngày nuôi cấy (n=3 và độ lệch chuẩn)

3.3.3 Rơm

Kết quả phân hủy rơm của các dòng nấm thử nghiệm được trình bày trong Hình 4. Sau 30 ngày thí nghiệm đánh giá khả năng phân hủy đối với vật liệu rơm trong điều kiện tiệt trùng của 17 dòng nấm phân lập và dòng đối chứng dương *Trichoderma* sp. cho thấy tất cả đều có khả năng phân hủy rơm rất cao, dao động từ 37,1% đến

47,6% và đều khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Tuy nhiên, dòng nấm PH-C5 có phần trăm phân hủy rơm là 47,6%, cao hơn các dòng khác, trong khi đó, *Trichoderma* sp. phân hủy 39,5% trọng lượng khô của rơm, thấp hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với dòng nấm PH-C5. Do đó, PH-C5 được chọn để thực hiện thí nghiệm tiếp theo về phân hủy rơm trong điều kiện không tiệt trùng.

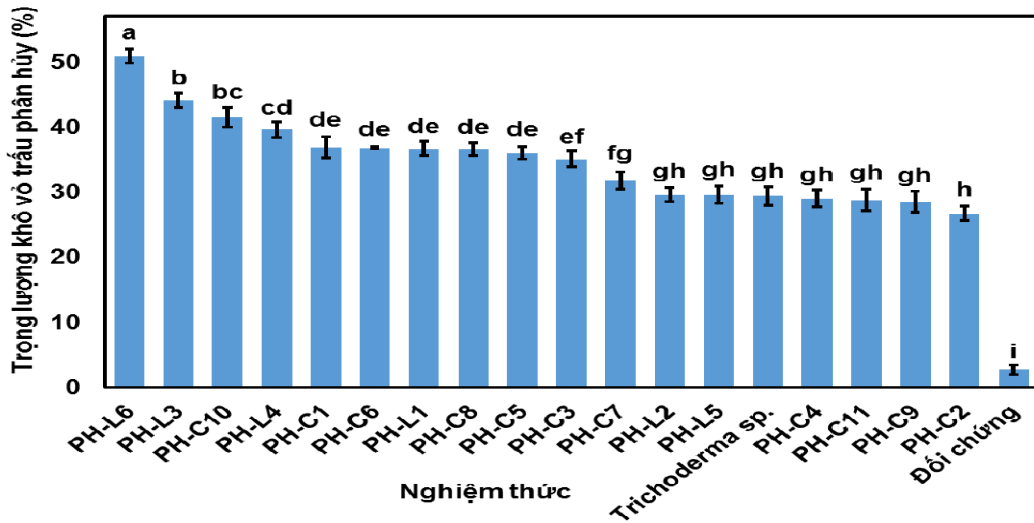


Hình 4: Khả năng phân hủy rơm trong điều kiện tiệt trùng của 18 dòng nấm thử nghiệm sau 30 ngày nuôi cấy (n=3 và độ lệch chuẩn)

3.3.4 Vỏ trấu

Kết quả khả năng phân hủy đối với vật liệu vỏ trấu sau 30 ngày thí nghiệm của 17 dòng nấm phân lập và dòng nấm *Trichoderma* sp. được trình bày ở Hình 5 cho thấy cả 18 dòng nấm thử nghiệm đều có khả năng phân hủy vỏ trấu rất cao, dao động từ 26,7% đến 50,9% và đều khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Dòng

nấm PH-L6 có phần trăm phân hủy vỏ trấu cao nhất, chiếm 50,9% và khác biệt ý nghĩa thống kê so với *Trichoderma* sp. và các dòng còn lại. Riêng dòng nấm *Trichoderma* sp., có phần trăm phân hủy vỏ trấu là 29,4%, thấp hơn rất nhiều so với dòng nấm PH-L6. Do đó, dòng nấm PH-L6 được chọn cho thí nghiệm về phân hủy vật liệu vỏ trấu trong điều kiện không tiệt trùng.

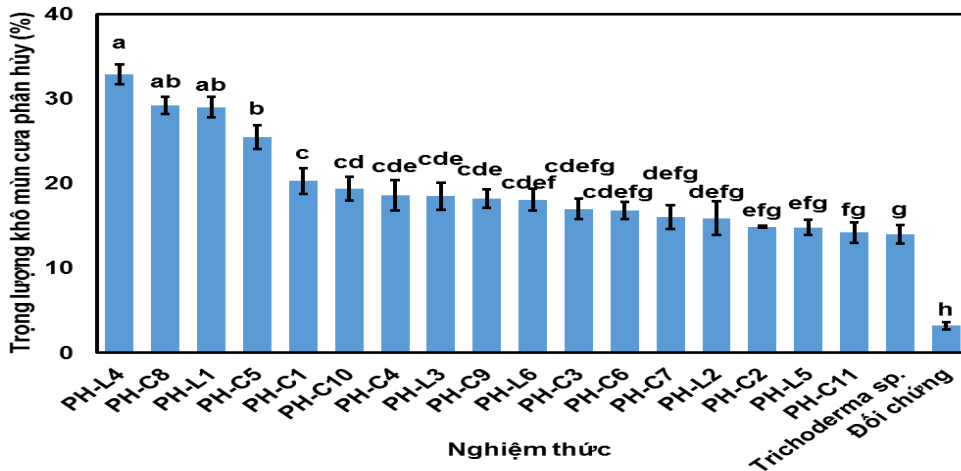


Hình 5: Khả năng phân hủy đối với vỏ trấu trong điều kiện tiệt trùng của 18 dòng nấm thử nghiệm sau 30 ngày nuôi cấy (n=3 và độ lệch chuẩn)

3.3.5 Mùn cưa

Kết quả khả năng phân hủy đối với vật liệu hữu cơ mùn cưa sau 30 ngày thí nghiệm của 17 dòng nấm phân lập và dòng nấm *Trichoderma* sp. được trình bày ở Hình 6. Kết quả cho thấy phần trăm phân hủy mùn cưa của 18 dòng thử nghiệm dao động từ 14,0% đến 32,9%. Trong đó, dòng nấm PH-L4 có phần trăm phân hủy mùn cưa cao hơn

các dòng khác, chiếm 32,9%. Riêng dòng nấm *Trichoderma* sp. chỉ phân hủy được 14% trọng lượng khô mùn cưa sau 30 ngày nuôi cấy, thấp hơn rất nhiều và có sự khác biệt ý nghĩa thống kê so với dòng nấm PH-L4. Do vậy, dòng nấm PH-L4 là dòng được chọn cho thí nghiệm tiếp theo về khả năng phân hủy đối với mùn cưa trong điều kiện không tiệt trùng.



Hình 6: Khả năng phân hủy mùn cưa trong điều kiện tiệt trùng của 18 dòng nấm thử nghiệm sau 30 ngày nuôi cấy (n=3, độ lệch chuẩn)

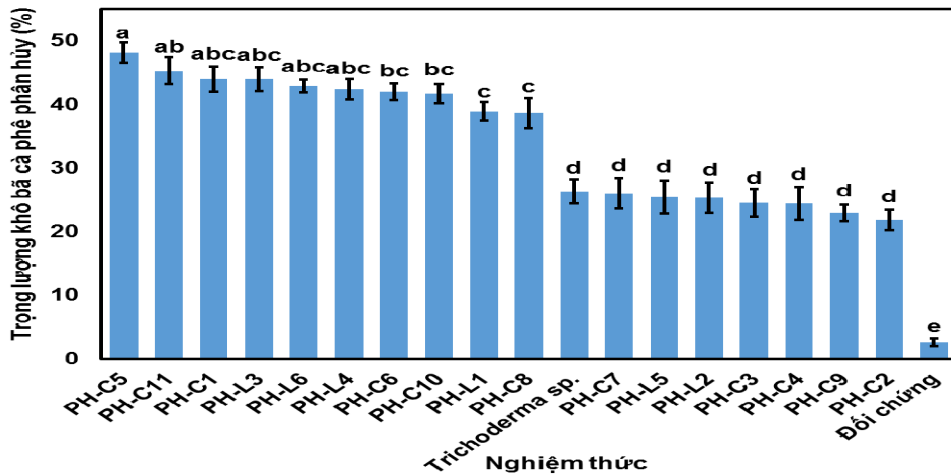
3.3.6 Bã cà phê

Hình 7 trình bày khả năng phân hủy đối với vật liệu hữu cơ bã cà phê sau 30 ngày của 17 dòng nấm phân lập và dòng nấm *Trichoderma* sp. Nhìn chung, phần trăm phân hủy bã cà phê của 18 dòng

nấm thử nghiệm là rất cao, dao động từ 21,8% đến 48,1% và đều khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Điều này cho thấy vai trò rất quan trọng của nấm trong việc phân hủy vật liệu hữu cơ trong đó có bã cà phê. Phần

trăm phân hủy bã cà phê của dòng nấm PH-C5 là 48,1%, cao hơn và khác biệt thống kê so với dòng nấm *Trichoderma* sp. (26,3%) và một số dòng nấm

còn lại. Do đó, dòng PH-C5 được chọn để thực hiện thí nghiệm tiếp theo về phân hủy đối với bã cà phê trong điều kiện không tiệt trùng.



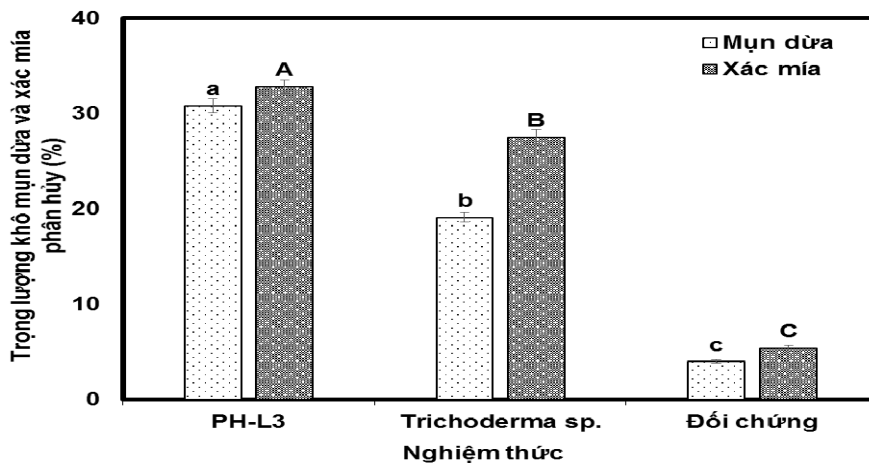
Hình 7: Khả năng phân hủy đối với bã cà phê trong điều kiện tiệt trùng của 18 dòng nấm thử nghiệm sau 30 ngày nuôi cấy (n=3 và độ lệch chuẩn)

3.4 Khả năng phân hủy đối với một số vật liệu hữu cơ từ phế phẩm nông nghiệp chứa cellulose và lignin trong điều kiện không tiệt trùng của 4 dòng nấm tuyển chọn

3.4.1 Mụn dừa và xác mía

Kết quả đánh giá khả năng phân hủy mụn dừa và xác mía trong điều kiện không tiệt trùng sau 30 ngày của hai dòng nấm PH-L3 và *Trichoderma* sp. được trình bày ở Hình 8. Nhìn chung, cả hai dòng nấm thử nghiệm có phần trăm phân hủy mụn dừa và xác mía cao hơn rất nhiều và khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Dòng nấm PH-L3 phân hủy cao cả 2 vật liệu hữu

cơ mụn dừa và xác mía, cao hơn và khác biệt thống kê so dòng nấm *Trichoderma* sp.. Cụ thể như sau: dòng nấm PH-L3 có phần trăm phân hủy mụn dừa và xác mía lần lượt là 30,8% và 32,8% sau 30 ngày nuôi cấy, trong khi đó phần trăm phân hủy trọng lượng khô mụn dừa và xác mía của dòng *Trichoderma* sp. lần lượt là 19,1% và 27,5%. Điều này cho thấy và khẳng định một lần nữa hiệu quả cao của dòng nấm ký hiệu PH-L3 đối với việc phân hủy vật liệu hữu cơ mụn dừa và xác mía trong cả điều kiện môi trường có sự cạnh tranh với các vi sinh vật khác và hiệu quả vượt trội hơn so với dòng nấm *Trichoderma* sp..

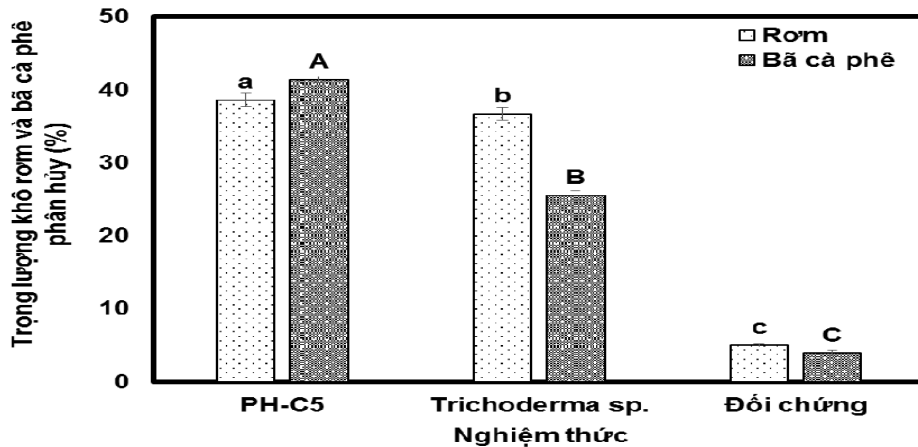


Hình 8: Khả năng phân hủy mụn dừa và xác mía trong điều kiện không tiệt trùng của dòng nấm PH-L3 và *Trichoderma* sp. sau 30 ngày nuôi cấy (n=4 và độ lệch chuẩn)

3.4.2 Rơm và bã cà phê

Kết quả đánh giá khả năng phân hủy đối với vật liệu hữu cơ rơm và bã cà phê trong điều kiện không tiết trùng của hai dòng nấm PH-C5 và dòng nấm *Trichoderma* sp. sau 30 ngày thí nghiệm được trình bày ở Hình 9. Kết quả cho thấy cả hai dòng nấm thử nghiệm có phần trăm phân hủy rơm và bã cà phê cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). So sánh hai dòng nấm thử nghiệm với nhau về khả năng phân hủy cho thấy dòng nấm PH-C5 có phần trăm phân hủy cao hơn ở cả 2 vật liệu rơm và bã cà phê so với

Trichoderma sp.. Cụ thể như sau: dòng nấm PH-C5 có phần trăm phân hủy rơm và bã cà phê lần lượt là 38,6% và 41,4%, trong khi đó phần trăm phân hủy rơm và bã cà phê của dòng nấm *Trichoderma* sp. lần lượt là 36,7% và 25,5%, thấp hơn và khác biệt thống kê so với dòng nấm PH-C5, đặc biệt là đối với vật liệu bã cà phê. Điều này cho thấy dòng nấm PH-C5 vẫn có khả năng phát huy tốt hiệu quả phân hủy rơm và bã cà phê trong điều kiện môi trường có sự cạnh tranh với các vi sinh vật khác, và hiệu quả cao hơn rất nhiều so với dòng đối chứng dương *Trichoderma* sp..

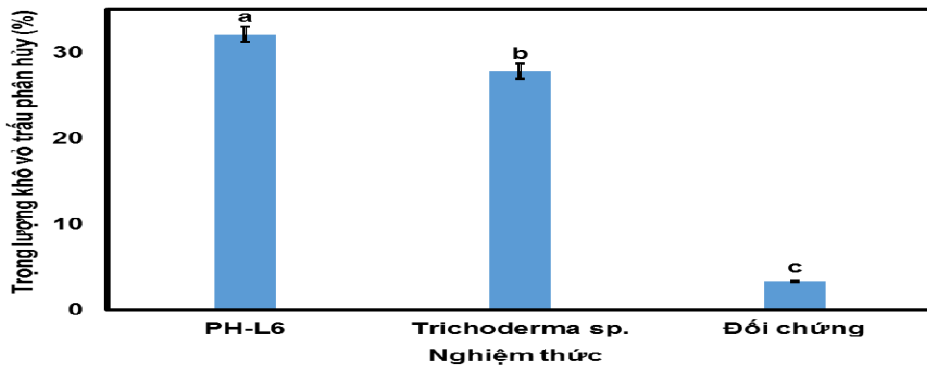


Hình 9: Khả năng phân hủy rơm và bã cà phê trong điều kiện không tiết trùng của dòng nấm PH-C5 và dòng *Trichoderma* sp. sau 30 ngày nuôi cấy (n=4 và độ lệch chuẩn)

3.4.3 Vỏ trấu

Hình 10 trình bày khả năng phân hủy đối với vật liệu hữu cơ vỏ trấu trong điều kiện không tiết trùng sau 30 ngày của hai dòng nấm thử nghiệm cho thấy cả hai dòng nấm PH-L6 và *Trichoderma* sp. có phần trăm phân hủy vỏ trấu cao hơn rất nhiều và khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm

thức đối chứng ($p < 0,05$). Dòng nấm PH-L6 phân hủy 32,1% trọng lượng vỏ trấu sau 30 ngày thí nghiệm trong điều kiện không tiết trùng, cao hơn và khác biệt thống kê so với dòng nấm *Trichoderma* sp. (27,8%). Kết quả này cho thấy dòng nấm PH-L6 có khả năng phân hủy hữu hiệu vỏ trấu và cao hơn so với dòng *Trichoderma* sp. trong cả hai điều kiện có và không có tiết trùng.

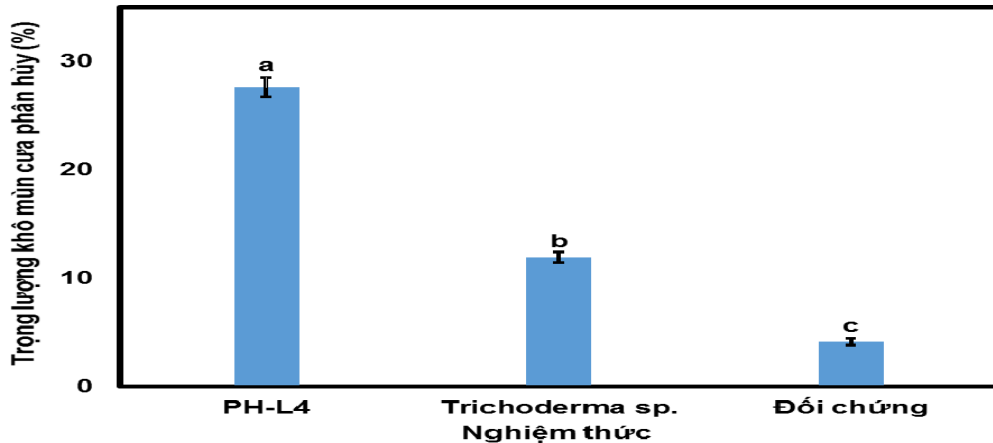


Hình 10: Khả năng phân hủy đối với vỏ trấu trong điều kiện không tiết trùng của dòng nấm PH-L6 và *Trichoderma* sp. sau 30 ngày nuôi cấy (n=4 và độ lệch chuẩn)

3.4.4 Mùn cưa

Kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng phân hủy đối với mùn cưa trong điều kiện không tiệt trùng sau 30 ngày thí nghiệm của hai dòng nấm thử nghiệm được trình bày ở Hình 11. Kết quả cho thấy như sau: cả hai dòng nấm thử nghiệm: PH-L4 và *Trichoderma* sp. đều thể hiện khả năng phân hủy mùn cưa cao hơn rất nhiều và khác biệt ý nghĩa

thống kê so với nghiệm thức đối chứng ($p < 0,05$). Dòng nấm *Trichoderma* sp. phân hủy chỉ được 11,9% trọng lượng khô mùn cưa sau 30 ngày thí nghiệm, thấp hơn rất nhiều và khác biệt ý nghĩa thống kê so với dòng nấm PH-L4 (27,6%). Tóm lại, dòng nấm ký hiệu PH-L4, có tiềm năng rất cao trong việc phân hủy mùn cưa trong điều kiện tự nhiên.



Hình 11: Khả năng phân hủy đối với mùn cưa trong điều kiện không tiệt trùng của dòng nấm PH-L4 và *Trichoderma* sp. sau 30 ngày nuôi cấy (n=4 và độ lệch chuẩn)

3.5 Kết quả giải mã trình tự 1 đoạn gene ITS và xác định ở mức độ loài của bốn dòng nấm phân lập thể hiện tiềm năng ứng dụng cao

Bốn dòng nấm ký hiệu: PH-C5, PH-L3, PH-L4 và PH-L6 thể hiện khả năng phân hủy cao đối với vật liệu hữu cơ chứa cellulose và lignin và có tiềm năng ứng dụng cao nhất trong tổng số 17 dòng nấm phân lập. Kết quả giải mã trình tự đoạn gene ITS

của 4 dòng nấm, cho thấy 4 dòng nấm này được định danh theo thứ tự tên loài như sau: *Aspergillus fumigatus* (PH-C5), *Penicillium janthinellum* (PH-L3), *Aspergillus fumigatus* (PH-L4) và *Rhizomucor variabilis* (PH-L6) (Bảng 3). Những dòng này là những dòng được biết đến như là những dòng phân hủy hiệu quả vật liệu hữu cơ chứa cellulose, hemicellulose và lignin và đã được công bố trong các nghiên cứu trước đây (Do Thi Xuan, 2012).

Bảng 3: Định danh một số dòng nấm thể hiện sự phân hủy cao một số vật liệu hữu cơ chứa cellulose và lignin theo độ tương đồng của đoạn gen 18S rRNA

Dòng	Nguồn gốc	Độ tương đồng (%)	Thông tin trên cơ sở dữ liệu		Định danh
			Nấm	Số đăng kí	
PH-C5		100%	<i>Aspergillus fumigatus</i> strain X9-202	KJ939430.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> (PH-C5)
PH-L3	Phong Hòa, Lai Vung, Đồng Tháp	100%	<i>Penicillium janthinellum</i> strain Pb13	KJ942591.1	<i>Penicillium janthinellum</i> (PH-L3)
PH-L4		99%	<i>Aspergillus fumigatus</i> strain X9-202	KJ939430.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> (PH-L4)
PH-L6		98%	<i>Rhizomucor variabilis</i> strain JHR101-27	JK076993.1	<i>Rhizomucor variabilis</i> (PH-L6)

4 KẾT LUẬN

Mẫu đất thâm canh lúa tại xã Phong Hòa, huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp có chứa cộng

đồng nấm phân hủy cao và hiệu quả một số vật liệu hữu cơ từ phế phẩm nông nghiệp chứa cellulose và lignin trong điều kiện tự nhiên.

Trong tổng số 17 dòng nấm phân lập có 4 dòng nấm có khả năng phân hủy đối với một số vật liệu hữu cơ chứa cellulose và lignin cao hơn so với dòng nấm *Trichoderma* sp. là dòng nấm được chọn như là dòng nấm đối chứng dương ở cả hai điều kiện thí nghiệm: tiết trùng và không tiết trùng các vật liệu hữu cơ thí nghiệm.

Khả năng phân hủy của 4 dòng nấm tuyển chọn đối với sáu vật liệu hữu cơ chứa cellulose và lignin trong điều kiện tiết trùng cao hơn so với điều kiện không tiết trùng.

Bốn dòng nấm PH-C5, PH-L3, PH-L4 và PH-L6 được định danh tên loài lần lượt theo thứ tự như sau: *Aspergillus fumigatus* (PH-C5), *Penicillium janthinellum* (PH-L3), *Aspergillus fumigatus* (PH-L4) và *Rhizomucor variabilis* (PH-L6) là những dòng nấm có tiềm năng ứng dụng cao nhất trong số những dòng phân lập trong việc xử lý vật liệu hữu cơ từ phế phẩm nông nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bärlocher, F; Corkum, M, 2003. Nutrient enrichment overwhelms diversity effects in leaf decomposition by stream fungi. *Oikos*, 101 (2): 247-252.
2. Do Thi Xuan, 1012. Microbial Communities in Paddy Fields in the Mekong Delta of Vietnam. *Acta Universitatis agriculturae Sueciae*, 101: 1652-6880.
3. Fareeha, R; Nasreen, A.R; Uzma, H; Ikram, H, 2011. Solid state fermentation for the production of β -glucosidase by co-culture of *Aspergillus niger* and *A. Oryzae*. *Pak. J. Bot.*, 43(1): 75-83.
4. Hoàng Thị Thu Hương, 2012. Nghiên cứu tận dụng một số phế phẩm nông nghiệp để xử lý nước cấp phục vụ cho sinh hoạt. Đồ án tốt nghiệp kỹ thuật môi trường. Trường Đại học Kỹ thuật Công nghệ TP. Hồ Chí Minh.
5. Ito, J; Fujita, Y; Ueda, M; Fukuda, H; Kondo, A, 2004. Improvement of cellulose-degrading ability of a yeast strain displaying *Trichoderma reesei* endoglucanase II by

recombination of cellulose-binding domains. *Biotechnol. Progr.*, 20 (3): 688-691.

6. Lars, E; Berghem, R; Göran, P, L, 2005. The mechanism of enzymatic cellulose degradation isolation and some properties of a β -glucosidase from *Trichoderma viride*. DOI: 10.1111/j.1432-1033.
7. Markku, S; Tiina, M.P, 2012. The cargo and the transport system: secreted proteins and protein secretion in *Trichoderma reesei*. *J. of Microbiol.*, 158 (1): 46-57.
8. Nguyễn Hồng Thắm, 2009. Khả năng phân hủy trấu và ảnh hưởng của môi trường đến sự phát triển của nấm *Trichoderma* sp., *Rhizopus* sp. ở Đồng bằng sông Cửu Long. Luận văn Thạc sĩ khoa học Nông nghiệp & SHƯD. Trường Đại học Cần Thơ.
9. Nguyễn Lân Dũng, 1984. Vi sinh vật đất và sự chuyển hóa các hợp chất cacbon, nitơ. NXB Khoa học và kỹ thuật Hà Nội.
10. Nguyễn Thị Trúc Hương, 2011. Khảo sát ảnh hưởng đến môi trường do sản xuất chỉ xơ dừa tại xã An Thạnh-Khánh Thạnh Tân, huyện Mô Cày-Bến Tre. Luận văn tốt nghiệp Đại học Kỹ thuật Công nghệ TP. Hồ Chí Minh.
11. Nguyễn Xuân Thành và Phạm Văn Toàn, 2003. Công nghệ vi sinh vật trong sản xuất nông nghiệp và xử lý môi trường. Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội.
12. Phạm Văn Kim, 2000. Vi sinh vật và chuyển hóa vật chất trong đất. Bộ môn Bảo vệ thực vật. Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng. ĐH Cần Thơ.
13. Subhosh, C.M.; Rajasekhar, R.B, 2012. Exoglucanase production by *Aspergillus niger* grown on wheat bran. *Ann. of Microbiol.*, 63 (3): 871-877.
14. Yang, J. S; Yuan, H. L; Wang, H. X; Chen, W. X, 2005. Purification and characterization of lignin peroxidase from *Penicillium decumbens* P6. *World J. of Microbiol. & Biotechnol.*, 21: 435-440.