

ĐẠI HỌC HUẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM
KHOA NÔNG HỌC

NHIỀU TÁC GIẢ



**TUYỂN TẬP
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU KHOA HỌC
CÂY TRỒNG 2014-2015**

(PROCEEDING OF RESEARCH ON CROP SCIENCES 2014-2015)



NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC HUẾ

NHIỀU TÁC GIẢ

**TUYỂN TẬP KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU KHOA HỌC
CÂY TRỒNG 2014-2015**
(PROCEEDING OF RESEARCH ON CROP SCIENCES 2014-2015)



NXB ĐẠI HỌC HUẾ

ISBN: 978-604-912-526-3



9 786049 125263

Sách không bán

**ĐẠI HỌC HUẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM
KHOA NÔNG HỌC**

NHIỀU TÁC GIẢ

**TUYỂN TẬP KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU
KHOA HỌC CÂY TRỒNG 2014 - 2015**

**(PROCEEDING OF RESEARCH
ON CROP SCIENCES 2014 – 2015)**

NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC HUẾ

Huế, 2015

Biên mục trên xuất bản phẩm của Thư viện Quốc gia Việt Nam

Tuyển tập kết quả nghiên cứu khoa học cây trồng 2014 - 2015 = Proceeding of reasearch on crop sciences 2014 - 2015 / Lê Như Cương, Hoàng Trọng Kháng, Hồ Công Hưng... - Huế : Đại học Huế, 2015. - 474tr. : hình ảnh, vẽ ; 30cm

ĐTTS ghi: Đại học Huế. Trường đại học Nông Lâm. Khoa Nông học. - Thư mục cuối mỗi bài

1. Cây trồng 2. Nghiên cứu khoa học
630.72 - dc23

DUM0016p-CIP

Mã số sách: NC/118-2016

LỜI GIỚI THIỆU

Khoa Nông học tiên thân là Khoa Trồng trọt thuộc Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế được thành lập từ năm 1967. Trong 5 năm gần đây, Khoa Nông học đã có nhiều kết quả nghiên cứu khoa học công nghệ được công bố trên các tạp chí khoa học có uy tín cũng như được ứng dụng vào thực tiễn sản xuất thông qua chuyển giao khoa học công nghệ và tư vấn kỹ thuật. Trong tương lai, Khoa Nông học tiếp tục phát triển các hướng nghiên cứu về ứng dụng công nghệ sinh học, công nghệ cao, ứng dụng vi sinh vật trong sản xuất nông nghiệp và thực hiện các công trình nghiên cứu trọng điểm để thực hiện chiến lược phát triển Khoa Nông học hướng đến tầm nhìn 2020.

Nội dung Kỷ yếu hội nghị bao gồm các bài báo khoa học toàn văn và tóm tắt của các nghiên cứu khoa học của các tác giả trong Khoa Nông học và các tác giả ở các Khoa của Trường Đại học Nông Lâm. Các bài báo đã được Ban biên tập chọn lọc và đăng trong kỷ yếu Hội nghị Khoa học của Khoa Nông học năm 2015 là kết quả các công trình nghiên cứu khoa học đã được quý thầy cô dày công nghiên cứu và công bố kết quả đạt được trong thời gian qua.

Ban Biên tập chúng tôi mong nhận được sự góp ý xây dựng của các nhà khoa học, quý vị đại biểu và độc giả để kỷ yếu hội nghị sẽ hoàn hảo hơn.

Trưởng Khoa Nông học - Trưởng Ban biên tập

PGS. TS. Trần Đăng Hoà

MỤC LỤC

	Trang
Khảo sát tình hình bệnh héo xanh vi khuẩn hại lạc [<i>Ralstonia Solanacearum</i> (smith) yabuuchi <i>et al.</i>] tại một số vùng sinh thái trồng lạc ở Thừa Thiên Huế	1
Hiệu quả kích thích sinh trưởng của vi khuẩn <i>bacillus</i> đến cây lạc ở Bình Định	7
Đánh giá khả năng đối kháng và hạn chế bệnh thối trắng hại lạc của vi khuẩn vùng rễ lạc phân lập tại Thừa Thiên Huế	16
Đánh giá tình hình bệnh khô vằn gây hại trên một số giống lúa chủ lực tại Tây Sơn, Bình Định	25
Nghiên cứu ảnh hưởng của các liều lượng kali đến sinh trưởng, phát triển và năng suất cà rốt tại Hương Trà, Thừa Thiên Huế	32
Đánh giá khả năng sinh trưởng, phát triển và năng suất của các giống lúa mới trong vụ Đông Xuân 2014 - 2015 tại Thừa Thiên Huế	42
Đánh giá một số đặc điểm nông sinh học của tập đoàn giống cà chua nhập nội trong vụ Xuân - Hè 2015 tại Quảng Bình	52
Nghiên cứu một số biện pháp kỹ thuật thâm canh non cây gấc (<i>momordica cochinchinensis</i>) trong nhà kính tại Quế Phong, Nghệ An	61
Nghiên cứu các đặc điểm nông sinh học của giống tỏi Lý Sơn, tỉnh Quảng Ngãi	69
Nghiên cứu một số biện pháp canh tác nhằm giảm phát thải khí nhà kính trên ruộng lúa tại Quảng Nam	77
Ảnh hưởng của mức bón đạm đến phát triển quần thể rệp sáp bột hồng hại sắn <i>phenacoccus manihoti</i> matile-ferrero (homoptera: pseudococcidae)	85
Ảnh hưởng của lượng bón phân kali cho cây sắn đến sự phát triển của quần thể rệp sáp bột hồng (<i>phenacocus manihoti</i> matile-ferrero)	93
Nghiên cứu tác động của biến đổi khí hậu đến thu nhập của nông hộ vùng ven biển Thừa Thiên Huế	101
Nghiên cứu ảnh hưởng của liều lượng và dạng phân đạm đến năng suất lúa trên đất phù sa tỉnh Thừa Thiên Huế	111
Đánh giá khả năng sinh trưởng, phát triển và kháng bệnh đạo ôn của tập đoàn dòng, giống lúa mang gen kháng trong vụ Xuân 2014 - 2015 tại Thừa Thiên Huế	119
Khảo sát một số đặc điểm nông sinh học của tập đoàn dòng, giống lúa mang gen kháng bệnh đạo ôn nhập nội tại Quảng Bình	128
Ảnh hưởng của lượng đạm bón và lượng giống sạ đến giống lúa MT10 trên đất phù sa tại Bình Định	138
Đánh giá khả năng chịu hạn của các giống ngô lai trong điều kiện gây hạn nhân tạo tại Thừa Thiên Huế	149

So sánh khả năng sinh trưởng, phát triển và năng suất của một số giống lúa chịu mặn có triển vọng tại tỉnh Thừa Thiên Huế	159
Nghiên cứu khả năng tái sinh protocorm like bodies (PLBs) ở cây phong lan <i>erycina pusilla</i>	168
Khảo nghiệm một số giống ngô nếp mới tạo tuyển tại tỉnh Thừa Thiên Huế	174
Nghiên cứu sinh trưởng, phát triển, khả năng chống chịu, năng suất và phẩm chất một số giống ngô thực phẩm mới tạo tuyển tại Thừa Thiên Huế	181
Nghiên cứu ảnh hưởng của các dạng phân hữu cơ đến cây lạc trên đất xám bạc màu tại tỉnh Thừa Thiên Huế	189
Nghiên cứu ảnh hưởng của Na ₂ SO ₃ đến sinh trưởng phát triển và năng suất lạc vụ Hè Thu tại Quảng Bình	199
Ảnh hưởng của nồng độ xử lý các loại thuốc bảo vệ thực vật đến hiệu lực trừ rầy lưng trắng (<i>sogatella furcifera</i> horvath) hại lúa tại Thừa Thiên Huế	208
Đánh giá hiệu quả của mô hình sản xuất lúa an toàn theo hướng VietGAP ở tỉnh Thừa Thiên Huế	215
Ảnh hưởng của đạm urê đến sinh trưởng, phát triển và năng suất nấm sò trồng trên rơm tại Thừa Thiên Huế	225
Nghiên cứu sự sinh trưởng, phát triển, năng suất và chất lượng của một số chủng giống nấm rơm (<i>Volvariella volvacea</i>) trên các loại giá thể khác nhau tại Thừa Thiên Huế	233
Nghiên cứu khả năng giâm hom giống hồ tiêu Vĩnh Linh bằng hom thân với số đốt/hom khác nhau	243
Nghiên cứu ảnh hưởng của chế phẩm <i>Trichoderma</i> và <i>Streptomyces</i> đến sinh trưởng, phát triển và bệnh héo xanh vi khuẩn, thán thư hại ớt tại Bình Định	250
Nghiên cứu khả năng kết hợp chế phẩm <i>Trichoderma</i> và <i>Pseudomonas</i> đến sinh trưởng và phát triển cây lạc tại Quảng Nam	257
Đánh giá niềm tin của nông dân về mô hình “ruộng lúa bờ hoa” tại Phú Yên	266
Ảnh hưởng của các tổ hợp giá thể và phân bón đến xà lách trồng trên hệ thống bề nổi bắc đèn	273
Khảo sát đặc điểm nông học của các giống lúa chuẩn kháng rầy nhập nội	283
Tính độc và biotype của quần thể rầy lưng trắng tại Thừa Thiên Huế	290
Nghiên cứu khả năng thay thế phân đạm vô cơ bằng một số chế phẩm sinh học đối với giống lúa BT7 tại thị xã Hương Thủy, tỉnh Thừa Thiên Huế	297
Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn phân giải lân khó tan trên đất phù sa cổ ở Thừa Thiên Huế	308
Phân lập, tuyển chọn nấm mốc phân giải Cellulose ở Thừa Thiên Huế nhằm xử lý nhanh phế thải nông nghiệp	317
Đánh giá khả năng sinh trưởng, phát triển và năng suất các dòng/giống cà chua nhập nội có triển vọng trong vụ Xuân Hè 2015 tại Thừa Thiên Huế	328

Đánh giá một số giống cà tím trong vụ Đông Xuân 2014 - 2015 tại vùng rau phụ cận thành phố Huế	339
Nghiên cứu tính đa dạng của cây họ cà (solanaceae) tại tỉnh Quảng Nam	350
Điều tra tình hình bệnh đạo ôn hại lúa và khảo nghiệm các loại thuốc trừ bệnh ở Bình Định	362
Ảnh hưởng của phân hữu cơ sinh học từ các nguồn vật liệu khác nhau đến sinh trưởng, phát triển và năng suất cây đậu đen	372
Nghiên cứu khả năng sinh trưởng và phát triển của một số giống hoa Dã yên thảo tại tỉnh Thừa Thiên Huế	381
Kết quả nghiên cứu một số giống lúa mới chất lượng cao	392
Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng nước tưới đến sinh trưởng, năng suất và chất lượng xà lách (<i>Lactuca sativa</i> L.) trồng trên hệ thống thủy canh đứng	403
Kết quả nghiên cứu phục tráng giống khoai sọ vĩnh linh tại huyện Vĩnh Linh, tỉnh Quảng Trị	413
Kết quả nghiên cứu phục tráng giống khoai sọ Hà Tĩnh tại huyện Hương Sơn, tỉnh Hà Tĩnh	424
Nghiên cứu xử lý phụ phẩm rơm rạ sau trồng nấm bằng chế phẩm sinh học tạo phân hữu cơ vi sinh bón cho rau xà lách	435
Đánh giá khả năng chịu hạn của một số dòng/giống lúa nhập nội trong nhà lưới	448
Nghiên cứu xác định công thức bón phân thích hợp cho giống cam Mật Hiền Ninh tại Quảng Bình	459
Nghiên cứu khả năng phối hợp <i>Trichoderma</i> và <i>Pseudomonas</i> đến sinh trưởng và phát triển của cây lạc tại Quảng Ngãi	465

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN NẤM MỐC PHÂN GIẢI CELLULOSE Ở THỪA THIÊN HUẾ NHẪM XỬ LÝ NHANH PHÉ THẢI NÔNG NGHIỆP

*Lê Thị Hương Xuân, Nguyễn Thị Thu Thủy¹,
Trương Thị Hồng Hải, Trần Thị Xuân Phương*

TÓM TẮT

Nấm mốc trong tự nhiên có khả năng phân giải các hợp chất giàu cellulose nhờ tiết ra hệ enzyme cellulase ngoại bào đa dạng. Nghiên cứu nấm mốc phân giải cellulose trong các mẫu đất canh tác, rác, mùn cưa, rơm rạ, lá cây hoa cải ở Thừa Thiên Huế đã phân lập được 62 chủng nấm mốc có khả năng phân giải cellulose. Số lượng nấm mốc trong các mẫu vật phân lập biến động từ $0,34 - 102,87 \times 10^7$ CFU/g mẫu khô. Trong các chủng nấm mốc nghiên cứu có chỉ có 3,2% số chủng có hoạt độ phân giải mạnh, trong đó 2 chủng nấm mốc có hoạt tính cellulase cao nhất là N6 và N16. Khi nuôi cấy trong môi trường xốp, hoạt tính enzyme cellulase của 2 chủng nấm mốc tuyển chọn mạnh hơn khi nuôi trên môi trường dịch thể. Hoạt tính enzyme cellulase thể hiện mạnh nhất trên môi trường cám gạo:trấu sau 6 ngày nuôi cấy. Bằng phương pháp định lượng đường khử DNS xác định hoạt độ cellulase của chủng N6 trên các loại môi trường nuôi cấy giảm dần theo thứ tự: cám gạo + bột bắp > cám gạo + trấu > vỏ lạc > rơm rạ > cám gạo > trấu. Sau 30 ngày ủ bèo lục bình với chủng nấm N6 trong điều kiện phòng thí nghiệm, tỷ lệ vật chất khô bèo lục bình giảm 40% so với đối chứng. Xử lý rơm rạ sau trồng nấm với chủng N6 ngoài môi trường tự nhiên làm giảm 17,4% tỷ lệ vật chất khô và 60% cellulose so với đối chứng. Mật độ nấm mốc trong khối ủ giảm dần sau 30 ngày từ $10 \times 10^{12} - 8 \times 10^7$ CFU/g.

Từ khoá: Cellulase, Cellulose, nấm mốc, rơm rạ sau trồng nấm.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cellulose là thành phần chủ yếu trong màng tế bào thực vật, nó được coi là một trong những nguồn carbon quan trọng bậc nhất trên hành tinh. Cellulose cũng là chất hữu cơ được tổng hợp nhiều nhất hiện nay. Thông qua quang hợp, các loài thực vật tạo ra khoảng từ 60 đến 90 tỷ tấn cellulose hàng năm (Klemm et al, 2002; Bhat, 2000).

Cellulose có thể bị thủy phân trong môi trường kiềm hoặc axit. Tuy nhiên, việc phân hủy cellulose bằng phương pháp vật lý và hóa học rất phức tạp, tốn kém và gây độc hại cho môi trường. Trong khi đó, việc sử dụng enzyme cellulase ngoại bào từ vi sinh vật sẽ có nhiều ưu điểm về cả mặt kỹ thuật, kinh tế và môi trường. Trong tự nhiên số lượng các loài vi sinh vật tham gia sinh tổng hợp enzyme cellulase rất phong phú, chúng thuộc nấm sợi, xạ khuẩn, vi khuẩn và cả nấm men. Trong đó vi nấm là nhóm có khả năng phân hủy cellulose mạnh vì nó tiết ra một lượng lớn enzyme có đầy đủ các thành phần (Lương Đình Phẩm, 2004).

Công nghệ enzyme cellulase đã được nghiên cứu và ứng dụng nhiều trên thế giới. Đầu những năm 1980, cellulase lần đầu tiên được áp dụng trong lĩnh vực thức ăn chăn nuôi nhằm nâng cao chất lượng dinh dưỡng, khả năng tiêu hóa và ứng dụng trong ngành thực phẩm chế biến

¹ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, TP Huế, Email: nguyen.thithuthuy@huaf.edu.vn

nước trái cây, trong nướng bánh (Voragen, 1980; Voragen et al, 1986). Bên cạnh đó, ngành công nghiệp ngành dệt, giấy cũng có nhiều ứng dụng nổi bật. Các cellulase được sử dụng cho các ứng dụng công nghiệp nói trên là đa số từ các nguồn nấm (Tolan và Foody, 1999).

Ở Việt Nam, nấm mốc *Trichoderma* phân giải cellulose được nhiều tác giả tập trung nghiên cứu. Năm 2001, Huỳnh Anh năm 2004 đã nghiên cứu về nấm sợi *Trichoderma reesei* sinh tổng hợp enzyme cellulase trên môi trường lỏng với nguồn cacbon là cmC (carboxyl methyl cellulose). Tác giả Châu Hoàng Vũ (2000) cũng nghiên cứu thu nhận và tinh sạch enzyme cellulase từ nấm mốc *Trichoderma reesei* bằng phương pháp lên men bán rắn. Năm 2004, Trần Thanh Phong khảo sát khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulase từ *Trichoderma reesei* và *Aspergillus niger* trên môi trường lên men bán rắn.

Nước ta là một nước sản xuất nông nghiệp, có trên 60% lao động làm việc trong các ngành nông nghiệp, lâm nghiệp, thủy sản. Bên cạnh việc gia tăng sản lượng nông sản xuất khẩu hằng năm, thì đầu ra cho hàng chục triệu tấn các loại phế thải giàu cellulose như rơm rạ, vỏ trấu, thân chuối, vỏ dừa, bã mía đang là vấn nạn lớn có nguy cơ đe dọa môi trường sinh thái. Ở tỉnh Thừa Thiên Huế, nghề trồng nấm ăn phát triển đã sử dụng nhiều nguyên liệu rơm rạ, mùn cưa bông gòn. Phần lớn các vật liệu sau sử dụng bị thải bỏ hoặc không được xử lý triệt để, có nguy cơ gây ô nhiễm môi trường nông thôn. Vì vậy, việc sử dụng nấm mốc có khả năng phân giải cellulose mạnh nhằm thúc đẩy quá trình phân giải các phế thải sau trồng nấm làm phân bón hữu cơ sinh học vừa góp phần giảm thiểu ô nhiễm môi trường vừa tạo nguồn phân bón có ích cho cây trồng.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nấm mốc có khả năng phân giải cellulose phân lập từ các bãi rác, xưởng mùn cưa, rơm rạ mục, lá cây mục và một số vùng đất canh tác khác nhau ở Thừa Thiên Huế.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- *Phân lập và xác định số lượng tế bào*: Sử dụng phương pháp Koch để phân lập và đếm số lượng nấm mốc phân giải cellulose trên môi trường PDA và Czapek với nguồn carbon là cmC (Nguyễn Lâm Dũng et al 1978) **Xác định khả năng phân giải cellulose của nấm mốc**

Nấm mốc được cấy điểm trên môi trường chứa cmC, sau 5 ngày nhuộm màu khuẩn lạc bằng thuốc nhuộm Congo Red. Độ lớn của vòng trong suốt và vết cây phản ánh khả năng sinh trưởng phát triển và phân giải cmC.

- *Xác định hoạt độ enzyme cellulase bằng phương pháp khuếch tán trên môi trường thạch đĩa*: Các chủng nấm mốc tuyển chọn được nuôi cấy trên hai loại môi trường dịch thể và xộp nhằm so sánh hoạt độ của enzyme cellulase thu được trên các loại môi trường khác nhau.

Tiến hành nuôi cấy lắc các chủng nấm mốc tuyển chọn trên môi trường Czapeck dịch thể ở 120 vòng/phút trong 5 ngày, ly tâm dịch nuôi cấy ở 5.000 vòng trong 20 phút, thu dịch chiết enzyme.

Tiến hành nuôi cấy tĩnh các chủng nấm mốc tuyển chọn trên môi trường xộp gồm cám gạo: bột bắp (tỷ lệ 3:1, có bổ sung 10ml dung dịch Czapek -dox), trong vòng 5 ngày ở 30°C. Sau đó, chiết enzyme thô bằng cách cân 5g canh trường hòa trong nước cất vô trùng, cho vào máy lắc 130 vòng trong 5 phút, sau đó lọc và ly tâm ở 5.000 vòng trong 20 phút.

100µl dịch chiết enzyme thu được ở thí nghiệm trên được nhỏ vào lỗ thạch đục sẵn trên đĩa Petri chứa cmC 1%, agar 2%. Đặt đĩa Petri vào tủ lạnh ở 4°C trong vòng 24 giờ, sau đó chuyển

sang tủ ẩm ở 50°C trong vòng 24 giờ. Tiến hành nhuộm màu bằng dung dịch Congo Red, rửa lại bằng dung dịch NaCl 1M, và đo kích thước vòng phân giải. Hoạt độ enzyme cellulase được phản ánh qua độ lớn của đường kính vòng phân giải.

- *Xác định thời gian tối ưu cho hoạt động sinh tổng hợp cellulose*: Nuôi cấy chủng nấm mốc tuyển chọn trên môi trường cám gạo: bột bắp (tỷ lệ 3:1), ở 30°C trong khoảng thời gian 4, 5, 6, 7, 8 và 9 ngày. Ứng với từng ngày, tiến hành tách chiết và đánh giá hoạt độ của enzyme cellulase thô bằng phương pháp khuếch tán trên thạch đĩa.

- *Xác định nguồn carbon tối ưu cho hoạt động sinh tổng hợp cellulose*: Nuôi cấy chủng nấm mốc tuyển chọn trên các loại môi trường xốp khác nhau gồm cám gạo, trấu, rom rạ, vỏ lạc, cám gạo: bột bắp (tỷ lệ 3:1), cám gạo: trấu (tỷ lệ 3:1) ở 30°C, trong 6 ngày, sau đó tách chiết và đánh giá hoạt độ của enzyme cellulase bằng phương pháp khuếch tán trên thạch đĩa.

- *Xác định hoạt độ enzyme cellulase bằng phương pháp định lượng đường khử DNS (acid Dinitro-salicylic)*: Phương pháp này dựa trên cơ sở phản ứng tạo màu giữa đường khử với thuốc thử acid dinitrosalicylic (DNS). Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỷ lệ thuận với nồng độ đường khử trong một phạm vi nhất định. So màu tiến hành ở bước sóng 540nm. Dựa theo đồ thị đường chuẩn của glucose tinh khiết với thuốc thử DNS (phương trình biểu diễn đường chuẩn dạng $y = ax + b$) sẽ tính được hàm lượng đường khử của mẫu nghiên cứu (Nguyễn Hoài Hương, 2009).

- *Thử nghiệm khả năng phân giải bào lục bình và rom rạ sau trồng nấm của chủng nấm mốc tuyển chọn*: Lục bình tươi được cắt nhỏ, sau đó tiến hành ủ với các chủng nấm mốc tuyển chọn ở nhiệt độ phòng trong vòng 4 tuần theo các công thức:

Xử lý trong phòng thí nghiệm đối với bào lục bình theo các công thức: CT1(đ/c): 2kg lục bình tươi; CT2: 2kg lục bình tươi + chủng nấm mốc tuyển chọn (tỷ lệ cấy giống là 5%).

Xử lý ngoài tự nhiên rom rạ sau trồng nấm với các công thức: CT 1 (đ/c): 2kg rom rạ; CT2: 2kg rom rạ + chủng Nấm mốc tuyển chọn (tỷ lệ cấy giống là 5%).

Sau 30 ngày đánh giá sự sai khác về trọng lượng và hàm lượng cellulose của công thức ủ có bổ sung chủng nấm mốc tuyển chọn so với đối chứng (không bổ sung chủng nấm mốc) để đánh giá khả năng phân giải cellulose của chủng nấm mốc thí nghiệm.

Sử dụng phương pháp Koch để phân lập và đếm mật độ nấm mốc thí nghiệm khi bắt đầu ủ, 7,14, 21, 28 ngày sau ủ để đánh giá sự biến động mật độ nấm mốc trong khối ủ theo thời gian.

- *Xử lý số liệu*: Số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học bằng phần mềm Excel 2010 và SPSS.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sự phân bố và số lượng nấm mốc phân giải cellulose trong các mẫu vật nghiên cứu

Từ 12 mẫu vật thu thập được chúng tôi đã phân lập được 62 chủng nấm mốc có khả năng phân hủy cellulose. Trong đó, có 8 chủng có nguồn gốc ở Hương Sơ, 13 chủng ở Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 17 chủng ở Hương Long, 9 chủng ở Tứ Hạ, 16 chủng ở Phước Yên.

Số lượng nấm mốc phân giải cellulose trong các mẫu đất ở những vùng khác nhau có sự biến động rất lớn từ $56,58 \times 10^7$ đến $0,24 \times 10^7$ CFU/g đất tươi và $102,87 \times 10^7$ đến $0,34 \times 10^7$ CFU/g đất khô. Mẫu đất thu thập ở Hương Long có mật độ tế bào nấm mốc cao nhất đạt $102,87 \times 10^7$ CFU/g đất khô. Trong khi đó ở các mẫu đất ở Tứ Hạ có số lượng nấm mốc phân giải cellulose rất thấp, chỉ đạt $0,34 \times 10^7$ CFU/g đất khô và Phước Yên $0,41 \times 10^5$ CFU/g đất khô.

Bảng 1. Số lượng nấm mốc phân giải cellulose trong các mẫu nghiên cứu

TT	Địa điểm lấy mẫu	Ký hiệu mẫu	CFU/ gam mẫu tươi (x10 ⁷)	CFU/ gam mẫu khô (x10 ⁷)
1	Hương Sơ, Huế	HS1	16,8	30,55
2	Hương Sơ, Huế	HS2	4,6	5,54
3	Hương Sơ, Huế	HS3	0,66	1,047
4	Hương Sơ, Huế	HS4	1,8	2,61
5	Hương Sơ, Huế	HS5	7,2	11,42
6	Hương Sơ, Huế	HS6	2,2	4,23
7	Hương Long Huế	HL1	56,58	102,87
8	Hương Long, Huế	HL2	13,375	16,31
9	Khoa NH ĐHNL	NH1	42,5	57,43
10	Khoa NH ĐHNL	NH2	3,74	4,67
11	Tứ Hạ, Huế	TH	0,24	0,34
12	Phước Yên, Huế	PY	0,24	0,41

Ghi chú CFU: Colony Forming Unit (đơn vị hình thành khuẩn lạc)

3.2. Khả năng phân giải cellulose của các chủng nấm mốc

Khả năng phân giải cellulose của các chủng nấm mốc nghiên cứu thể hiện rất đa dạng. Trong 62 các chủng phân lập chỉ có 3,2% số chủng có khả năng phân giải cellulose mạnh, 9,7% số chủng có khả năng phân giải cellulose trung bình, đại đa số các chủng (87%) có khả năng phân giải cellulose yếu. Hai chủng nấm mốc có hoạt tính phân giải cellulose mạnh nhất được tuyển chọn cho các thí nghiệm nuôi cấy và tách chiết enzyme là chủng N6 có đường kính vòng phân giải (DFG) là 21mm và chủng N16 có DFG là 19mm. So sánh với các nghiên cứu khác ở trong nước của Nguyễn Ngọc Trúc Ngân và cộng sự (2014), Trịnh Đình Khả (2007) thì hai chủng mà chúng tôi thu được là có hoạt tính cellulase mạnh.

Bảng 2. Khả năng phân giải cellulose của các chủng nấm mốc phân lập được

Mức độ phân giải	Đường kính vòng phân giải (mm)	Số chủng nấm mốc	Tỷ lệ (%)
Yếu	<10	54	87,09
Trung Bình	10 - 15	6	9,68
Mạnh	>15	2	3,23

3.3. Xác định hoạt độ enzyme cellulase bằng phương pháp khuếch tán trên môi trường thạch đĩa

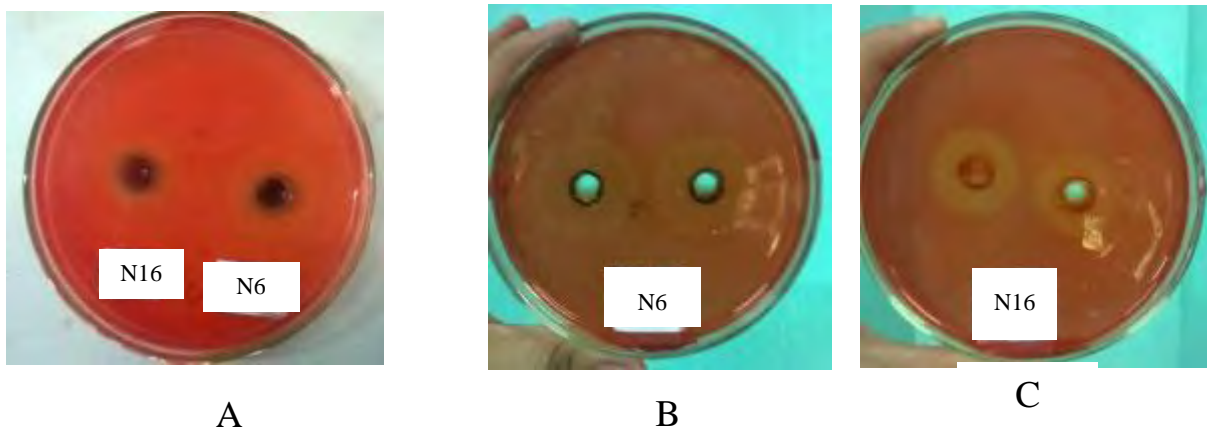
Phương pháp khuếch tán trên thạch đĩa đã xác định được hoạt độ enzyme cellulase của chủng nấm thí nghiệm khi nuôi cấy trên môi trường dịch thể yếu hơn so với nuôi cấy trên môi trường xốp. Cụ thể trên môi trường Czapeck dịch thể 2 chủng N16 và N6 chỉ cho có đường kính vòng phân giải lần lượt đạt là từ 12 - 16mm. Trong khi đó, trên môi trường xốp đường kính vòng phân giải lần lượt đạt đến 21 - 24mm.

Nhìn chung trên cả 2 loại môi trường nuôi cấy, chủng nấm mốc N6 (DFG = 24mm) đều cho hoạt độ enzyme cellulase lớn hơn so với chủng N16 (DFG = 21mm).

Bảng 3. Hoạt độ enzyme cellulase của các chủng nấm mốc tuyển chọn

Chủng nấm mốc	Đường kính vòng phân giải D - d (mm)	
	Môi trường lỏng	Môi trường xốp
N6	16 ± 0,2	24 ± 0,1
N16	12 ± 0,3	21 ± 0,2

Ghi chú: D: vòng phân giải ngoài, d: đường kính khuẩn lạc

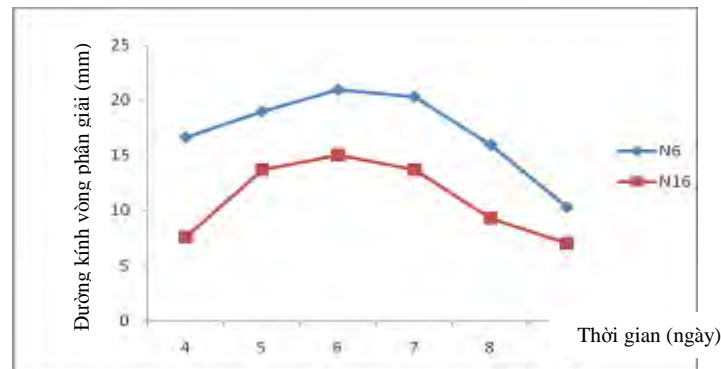


Hình 1. Hoạt lực phân giải của nấm mốc trên môi trường dịch thể (A) và xốp (B và C)

3.4. Thăm dò thời gian thích hợp cho hoạt động sinh tổng hợp enzyme cellulase của chủng nấm mốc tuyển chọn

Qua tìm hiểu thời gian nuôi cấy thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp enzyme cellulase của 2 chủng nấm mốc tuyển chọn cho thấy hoạt tính enzyme cellulase của 2 chủng N6 và N16 có cùng chu kỳ biến động qua các mốc thời gian. Sau 4 ngày nuôi cấy, hoạt tính enzyme còn thấp, DFG của 2 chủng lần lượt chỉ đạt 16,67mm và 7,6mm. Tuy nhiên, hoạt độ enzyme tăng dần sau 5 ngày nuôi và đạt đạt cực đại ở 6 ngày nuôi cấy (DFG chủng N6= 22mm; DFG chủng N16=15mm). Hoạt độ enzyme sau đó giảm dần sau 7 ngày và đạt thấp nhất sau 9 ngày nuôi cấy. Nguyên nhân hoạt tính giảm dần có thể do môi trường cạn dần nguồn cơ chất, hoặc do trong quá trình trao đổi chất, nấm mốc đã tích lũy nhiều sản phẩm trung gian kìm hãm quá trình sinh tổng hợp cellulase.

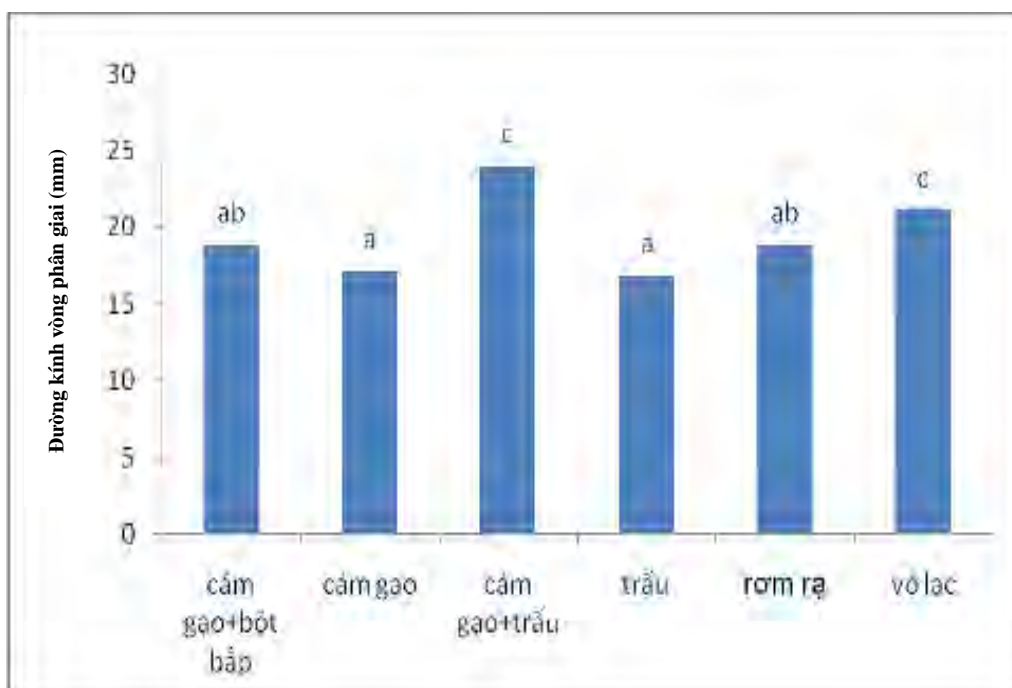
Ở tất cả các mốc thời gian nuôi cấy từ 4-9 ngày, chủng N6 đều cho hoạt tính enzyme cellulase mạnh hơn hoạt tính enzyme của chủng N16 vì vậy chúng tôi chọn chủng N6 làm đối tượng cho các thí nghiệm tiếp theo.



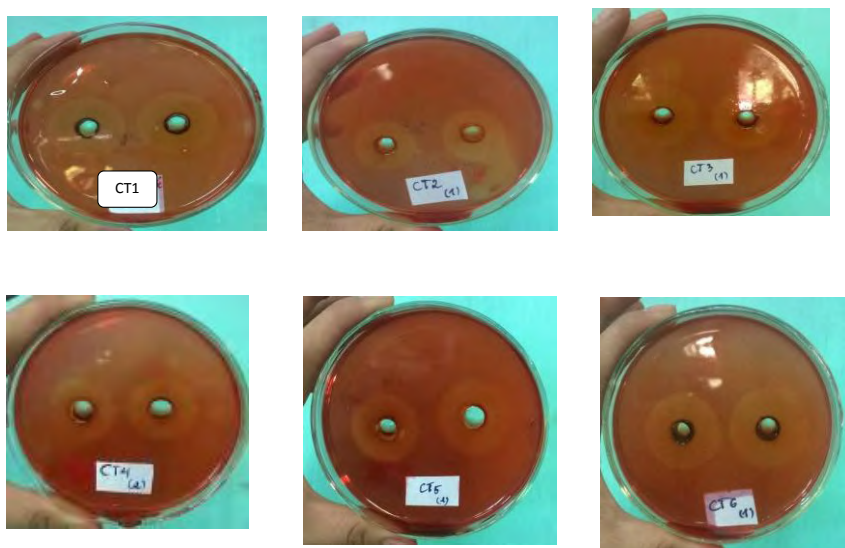
Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt tính cellulase của chủng nấm mốc N6 và N16

3.5. Thăm dò nguồn carbon thích hợp cho hoạt động sinh tổng hợp enzyme cellulase của chủng nấm mốc tuyển chọn

Hoạt tính enzyme cellulase của chủng nấm mốc N6 khác nhau khi được nuôi trên các loại môi trường khác nhau. Trên môi trường cám gạo: trấu (CT3) hay vỏ lạc (CT6), hoạt tính cellulase đạt rất cao thể hiện qua DFG lần lượt đạt 24mm và 21,16mm. Tuy nhiên, khi nuôi trên môi trường chỉ thuần cám gạo (CT2) hoặc trấu (CT4), hoạt tính enzyme thấp, DFG chỉ đạt lần lượt từ 17,16 và 16,83mm. Tương tự nếu nuôi trên các loại môi trường cám gạo: bột bắp (CT1) hay rơm rạ (CT5) đường kính vòng phân giải 18,83mm.



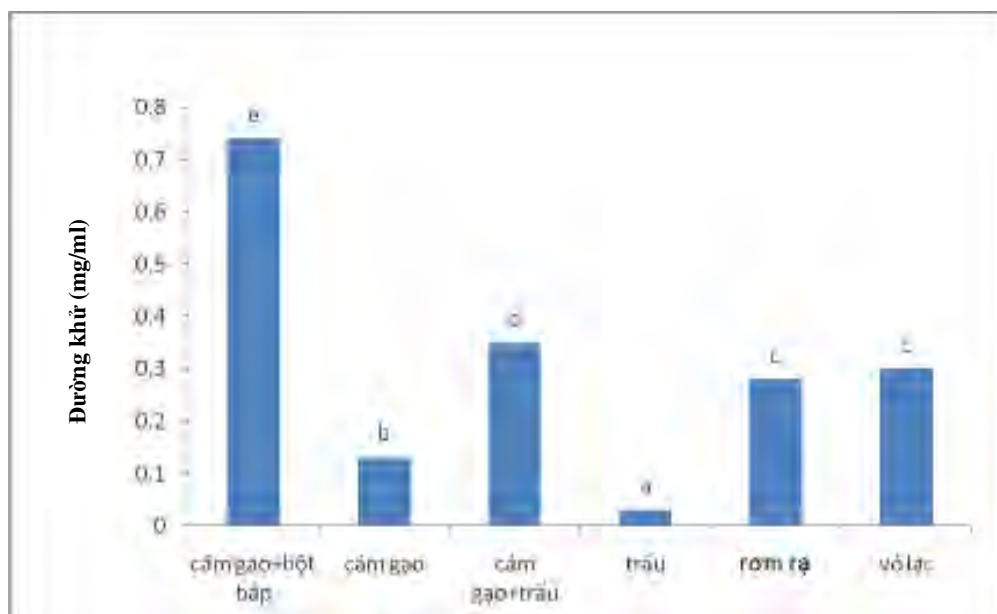
Hình 3. Hoạt tính enzyme cellulase của chủng N6 khi nuôi cấy trên các nguồn carbon khác nhau



Hình 4. Đường kính vòng phân giải của chủng nấm mốc N6 trên các nguồn carbon khác nhau

3.6. Xác định hoạt độ enzyme cellulase bằng phương pháp định lượng đường khử DNS (acid Dinitro-salicylic)

Trong môi trường nuôi cấy nấm mốc phân giải cellulose sẽ tiết ra enzyme cellulase chuyển hóa cellulose thành đường khử. Dựa trên cơ sở phản ứng tạo màu giữa đường khử với thuốc thử acid dinitrosalicylic (DNS) và đồ thị chuẩn glucose có phương trình: $y = 1,475x - 0,119$ và $R^2=0,995$. (y là độ hấp phụ ở bước sóng 540nm; x là nồng độ glucose (mg/ml)), chúng tôi suy ra được nồng độ đường khử trong các công thức thí nghiệm, kết quả thu được thể hiện qua Hình 5.



Hình 5. Hoạt độ enzyme cellulase chủng N6 qua phương pháp định lượng đường khử DNS

Từ Hình 5 cho thấy hàm lượng đường khử giữa các công thức có sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê. Công thức 1 với 75% cám gạo và 25% bột bắp có lượng đường khử cao nhất ở

0,74mg/ml, tiếp theo là công thức 3 với 75% cám gạo và 25% trấu có lượng đường khử là 0,35mg/ml. Thấp nhất là công thức 4 với 100% trấu có lượng đường khử là 0,029mg/ml.

3.7. Thử nghiệm khả năng phân giải bèo lục bình và rơm rạ sau trồng nấm của chủng nấm mốc N6

Để tìm hiểu khả năng phân hủy các phế thải nông nghiệp giàu cellulose của chủng nấm mốc N6, chúng tôi tiến hành 2 thí nghiệm ủ N6 với bèo lục bình tươi trong điều kiện phòng thí nghiệm và ủ với rơm rạ sau trồng nấm trong xô chậu ngoài điều kiện tự nhiên trong 30 ngày. Kết thúc ủ chúng tôi đánh giá sai khác khối lượng và hàm lượng chất xơ trong các công thức ủ có bổ sung chủng N6 so với đối chứng. Kết quả thu được thể hiện qua Bảng 4 và Bảng 5.

Bảng 4. Khả năng phân giải bèo lục bình và rơm rạ sau trồng nấm của chủng nấm mốc N6

Nguyên liệu	Công thức XL	Khối lượng tươi (kg)		Tỷ lệ vật chất khô (%)		Giảm so với ĐC (%)
		Ban đầu ủ	Sau ủ	% Giảm so với ĐC	Sau ủ	
Bèo lục bình	ĐC*	2	1,92	-	10	-
	Chủng N6	2	1,88	2,3	6	40
Rơm rạ sau trồng nấm	ĐC*	2	1,76	-	10	-
	Chủng N6	2	1,74	1,2	8,2	17,4

*Ghi chú: *Không bổ sung chủng N6*

- Đối với bèo lục bình tươi: sau 30 ngày ủ với chủng N6 khối lượng tươi bèo lục bình chỉ giảm xuống 2,3% so với đối chứng. Tỷ lệ này khá thấp do sự tích nước trong các mẫu bèo lục bình sau ủ nên chưa phản ánh hết khả năng phân giải cellulose của chủng N6.

Tỷ lệ vật chất khô lục bình sau ủ ở công thức bổ sung chủng N6 là 6% trong khi tỷ lệ này ở công thức đối chứng chiếm 10%. Như vậy, ủ chủng N6 với bèo lục bình làm giảm đến 40% tỷ lệ vật chất khô so với đối chứng. Điều này chứng tỏ việc xử lý bèo lục bình bằng chủng N6 cho hiệu quả phân giải cellulose khá cao.

- Đối với rơm rạ sau trồng nấm: Tương tự như trường hợp xử lý bèo lục bình, sau 30 ngày xử lý ngoài đồng ruộng khối lượng tươi rơm rạ sau trồng nấm nhìn chung không sai khác đáng kể so với đối chứng do sự tích nước trong các vật liệu ủ. Tuy nhiên, so sánh tỷ lệ vật chất khô cho thấy sự khác biệt. Công thức có bổ sung chủng N6 tỷ lệ vật chất khô chiếm 8,2% trong khi đó đối chứng là 10%. Như vậy, xử lý rơm rạ sau trồng nấm bằng chủng N6 làm giảm 17,4% tỷ lệ vật chất khô.

Bảng 5. Hàm lượng cellulose của rơm rạ sau trồng nấm trước và sau ủ

Công thức ủ	Hàm lượng cellulose (%)		
	Trước ủ	Sau ủ	Giảm SV ĐC (%)
ĐC*	3,71	3,21	-
Chủng N6	3,71	1,94	60

*Ghi chú: *Không bổ sung chủng N6.*

Phân tích hàm lượng cellulose của rơm rạ sau trồng nấm trước và sau khi xử lý chủng N6 cho thấy so với đối chứng hàm lượng cellulose giảm 60% sau xử lý 30 ngày ngoài đồng ruộng. Điều này phản ánh khả năng phân giải vật liệu rơm rạ rất tốt của chủng nấm mốc N6.

Bảng 6. Diễn biến mật độ nấm mốc trong khối ủ theo thời gian

Thời gian ủ	Mật độ nấm mốc (CFU/g)
Bắt đầu ủ	$10,3 \times 10^{12}$
7 NSU	$9,9 \times 10^{12}$
14 NSU	$3,3 \times 10^{10}$
21 NSU	$2,3 \times 10^8$
28 NSU	$8,3 \times 10^7$

Với tỷ lệ cấy giống vào khối ủ là 5% khối lượng, mật độ nấm mốc trong khối ủ nhìn chung giảm đều theo thời gian. Bắt đầu ủ, mật độ nấm mốc đạt khoảng 10×10^{12} CFU/g. Tỷ lệ này giảm không đáng kể sau 1 tuần ủ. Tuy nhiên, mật độ nấm mốc giảm dần từ $3,3 \times 10^8$ sau 2 tuần ủ xuống còn $8,3 \times 10^7$ CFU/g sau 4 tuần ủ. Tỷ lệ này vẫn đảm bảo mật độ vi sinh trong khối ủ khoảng 10^8 tế bào.

4. KẾT LUẬN

Phân lập được 62 chủng nấm mốc có khả năng phân giải cellulose từ 12 mẫu vật thu thập được trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế. Số lượng nấm mốc trong các mẫu nghiên cứu biến động từ $0,34 - 102,87 \times 10^7$ CFU/g mẫu khô. Trong các chủng nấm mốc nghiên cứu có chỉ có 3,2% chủng có hoạt độ phân giải mạnh. Trong đó, 2 chủng nấm mốc cho hoạt tính enzyme cellulase cao nhất là chủng N6 (DFG=22mm) và N16 (DFG=19mm). Cả hai chủng nấm mốc khi được nuôi cấy trong môi trường xốp (cám gạo: bột bắp) cho hoạt tính enzyme cellulase mạnh hơn khi nuôi trên môi trường dịch thể (Czapeck). Nghiên cứu điều kiện nuôi cấy thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp cellulase cho thấy, chủng N6 có hoạt tính enzyme cellulase mạnh nhất khi nuôi trên môi trường cám gạo: trấu trong 6 ngày. Bằng phương pháp định lượng đường khử DNS xác định hoạt độ enzyme cellulase của chủng N6 trên các loại môi trường nuôi cấy giảm dần theo thứ tự: cám gạo + bột bắp > cám gạo + trấu > vỏ lạc > rơm rạ > cám gạo > trấu. Ủ bèo lục bình với chủng nấm N6 trong điều kiện phòng thí nghiệm sau 30 ngày làm giảm tỷ lệ vật khô 40% so với đối chứng. Ủ rơm rạ sau trồng nấm với chủng N6 ngoài môi trường tự nhiên làm giảm 17,4% tỷ lệ vật chất khô và 60% cellulose so với đối chứng. Mật độ nấm mốc trong khối ủ giảm dần qua 4 tuần ủ từ $10,3 \times 10^{12} - 8,3 \times 10^7$ CFU/ g.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Huỳnh Anh (2004), *Nghiên cứu về nấm sợi Trichoderma reesei sinh tổng hợp enzyme cellulose trên MT lỏng với nguồn cacbon là cmC*, NXB Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.
2. Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Hiền, Phạm Văn Ty (1978), *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tập 2,
3. Nguyễn Hoài Hương, Bùi Văn Thế Vinh (2009), *Thực hành hóa sinh*, Trường ĐH Kỹ Thuật Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh, Khoa Môi trường và Công nghệ Sinh học.

4. Trịnh Đình Khả (2006), *Tuyển chọn, nuôi cấy chủng vi sinh vật sinh tổng hợp cellulose và đánh giá tính chất lý hóa của cellulose*, Luận văn thạc sĩ khoa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.
5. Trần Thị Trúc Ngân, Phạm thị Ngọc Lan (2014), *Tìm hiểu khả năng phân giải cellulose của vi sinh vật phân lập từ chất thải rắn của nhà máy Fococev Thừa Thiên Huế*, Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Trường Đại học Khoa học Huế tập 1, số 1.
6. Lương Đức Phẩm (2004), *Công nghệ vi sinh vật*, NXB Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội, trang 386-390.
7. Trần Thanh Phong, Hoàng Quốc Khánh, Võ Thị Hạnh, Lê Bích Phượng, Nguyễn Duy Long, Lê Tấn Hưng, Trương Thị Hồng Vân (2007). *Thu nhận enzyme cellulase của T. reesei trên môi trường bán rắn*, Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ, tập 10, số 07.
8. Châu Hoàng Vũ, (2000), *Nghiên cứu thu nhận và tinh sạch enzyme cellulase từ nấm mốc Trichoderma reesei bằng phương pháp lên men bán rắn*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
9. Bhat MK (2000). *Cellulases and related enzymes in biotechnology*. In Biotechnology Advances vol.18, pp. 355-383.
10. Klemm D, Schmauder H P, Heinze T (2002), *Biopolymers*, vol VI, edited by E.Vandamme, S De Beats and A Steinbchel (Wiley-VCH, Weinheim) pp. 290 - 292.
11. Tolan JS, Foody B (1999), *Cellulase from submerged fermentation*. In: Advances in Biochemical Engineering: Biotechnology Vol 65. Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics. (Tsao, G.T, Ed.), SpringerVerlag, Berlin, pp. 41-67.
12. Voragen AGJ, Heutink R, Pilinik W (1980), *Solubilization of apple cell walls with polysaccharide degrading enzymes*, J Appl Biochem, 1980, 2:452-68.
13. Voragen AGJ, Wolters H, Verdonshot-Kroef T, Rombouts FM, Pilnik W (1986), *Effect of juice-releasing enzymes on juice quality*, In: International Fruit Juice Symposium, The Hague (NL), Zurich: Juris Druck Verlag, 453-62.

ISOLATION AND SCREENING HIGHLY CELLULOLYTIC FUNGI IN THUA THUA THIEN HUE PROVINCE FOR QUICKLY DECOMPOSITION OF AGRICULTURAL WASTE

*Lê Thị Hương Xuân, Nguyễn Thị Thu Thủy¹
Trương Thị Hồng Hải, Trần Thị Xuân Phương*

Summary

Work is aimed at screening and isolating cellulolytic fungi from arable soil, sawdust, dead leaf, straw samples collected from Thua Thien Hue province. Results of study showed that the population of cellulolytic fungi fluctuated from 0,34 to 102,87 x 10⁷ CFU/g dry sample. Total sixty two cellulose-degrading fungal isolates were isolated in 12 soil samples, out of which two isolates (N6 and N16) showed high cellulolytic activity. A further study on growth medium indicated that semi solid medium was better for cellulolytic activity than liquid medium. Especially, cellulolytic activity of N6 isolate was highest in rice bran:hull growth medium after six days cultivated. Applying 3,5-dinitrosalicylic Acid (DNS) method to determine the content of reducing sugar in semi solid culture media followed descending order: rice bran +corn bran > rice bran + rice hull > peanut shells > rice straw > corn bran > rice hull. In laboratory condition, dry matter rate of eichnorria decreased up to 40% compared to the control after 30 days of incubation with N6 isolate. Similarly, incubation N6 isolates with mushroom cultivation waste (straw) reduced 17,4% dry matter rate and 60% cellulose compared to control. Density of cellulolytic fungi reduced gradually from 10¹²- 10⁸ CFU/ g during incubating process.

¹ College of Agriculture and Forestry, Hue University; Email: nguyenthithuthuy@huaf.edu.vn