

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY HỆ SỢI CỦA LỤC BÌNH EICHHORNIA CRASSIPES BẰNG CHỦNG NẤM TRICHODERMA SP

Lê Minh Hiếu⁽¹⁾, Trần Ngọc Hùng⁽¹⁾, Mai Thị Ngọc Lan Thanh⁽¹⁾⁽²⁾

(1) Trường Đại học Thủ Dầu Một, (2) Trường Đại học Bách Khoa (VN-HCM)

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng phân hủy hệ sợi cellulose trong cây Lục Bình bằng chủng nấm *Trichoderma* sp. Trong bảy chủng nấm phân lập từ đất vườn Bình Dương và đất rừng Langbiang tỉnh Lâm Đồng, có hai chủng cho khả năng phân hủy hệ sợi Lục Bình mạnh trên 35% là chủng T3-3, T13-2. Các chủng này được quan sát về hình thái chủng nấm mọc trên môi trường PGA và hình thái cuống sinh bào tử để xác định hai chủng phân lập là chủng *Trichoderma* sp.

Từ khóa: phân hủy, hệ sợi, phân lập, phương pháp, hàm lượng, lục bình

1. GIỚI THIỆU

Lục bình (*Eichhornia crassipes*) còn được gọi là lộc bình, hay bèo Nhật Bản là một loài thực vật thủy sinh, thân thảo, sống nổi theo dòng nước, thuộc về chi *Eichhornia* của họ bèo tây (*Pontederiaceae*), có khả năng hấp thu một lượng lớn chất dinh dưỡng và có nguồn gốc từ khu vực Amazon ở Nam Mỹ (Bolenz và ctv, 1990). Khi không được kiểm soát, lục bình sẽ bao phủ các hồ, ao hoàn toàn, tác động đáng kể lưu lượng nước, lượng ánh sáng mặt trời đến thực vật thủy sinh bản địa và lấy đi oxy trong nước, gây chết cá hay một số loài động vật dưới nước. Loài cây này cũng tạo ra một môi trường sống cho các loại vật gây hại. Lục bình có 2 hình thức sinh sản: sinh sản vô tính và sinh sản hữu tính. Hạt lục bình có thể bị phát tán bởi các loài chim và sức sống của hạt có thể lên tới 15- 20 năm (Manson J.G. and Manson B.E., 1958; Ueki, K. and Oki, J. 1970; Matthew et al., 1977). Nhưng sự sinh sản hữu tính với tốc độ cực nhanh (bằng các nhánh con) mới là

nguyên nhân chủ yếu của sự phát tán và phát triển quá mức của lục bình. Trong điều kiện lý tưởng, 1 cây lục bình có thể sản sinh 3.000 nhánh con và chiếm diện tích khoảng 600m² trong 1 năm (Das R.R. 1969; Knipling E.B. et al. 1970; Reddy K.R. et al., 1989). *Trichoderma* là một loài nấm hiện diện trong tất cả các loại đất, nơi mà chúng phổ biến nhất. Đa số các dòng *Trichoderma* phát triển ở trong đất có độ pH 2.5-9.5, phát triển tốt ở độ pH 4.5-6.5. Nhiệt độ để *Trichoderma* phát triển tối ưu thường là 25-30°C. Một vài dòng phát triển tốt ở 35°C. Một số ít phát triển được ở 40°C (Gary J. Samuels, 2004). Theo Prasun K. M. và Kaithadai R (1997), hình thái khuẩn lạc và bào tử của *Trichoderma* khác nhau khi ở nhiệt độ khác nhau. Ở 35°C chúng tạo ra những khuẩn lạc rắn dị thường với sự hình thành bào tử nhỏ và ở mép bất thường, ở 37°C không tạo ra bào tử sau 7 ngày nuôi cấy.

Năm 2012, Trần Thị Lê, Trần Thị Thu Hà, Nguyễn Thị Thanh, Nguyễn Xuân Kỳ đã tiến hành nghiên cứu tuyển chọn chủng

nấm *Trichoderma spp* phân giải cellulose mạnh để sản xuất phân hữu cơ vi sinh và nghiên cứu ảnh hưởng của chúng đối với giống đậu xanh 208 vụ xuân 2011 tại hợp tác xã Hương Long (Huế). Kết quả đã tuyển chọn được chủng PC6 có khả năng phân giải cellulose từ 43 chủng nấm *Trichoderma spp* đã được phân lập của Viện Tài nguyên Môi trường và Công nghệ sinh học (Đại học Huế). Sau đó chủng nấm *Trichoderma* PC6 được phối trộn với chất mang là cám: trấu theo tỷ lệ 1:5 với 10 ml nước cất thanh trùng cho 0,5 kg. Phân hữu cơ vi sinh được ủ với chế phẩm của Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học với lượng thay thế phân chuồng 60% cho năng suất và hiệu quả kinh tế cao hơn so các loại phân hữu cơ vi sinh và các mức thay thế còn lại, năng suất lý thuyết và năng suất thực thu đạt tương ứng là 17,27 tạ/ha và 12,44 tạ/ha. Nghiên cứu chỉ mới đánh giá khả năng phân hủy cellulose trên các loại cơ chất cám và trấu chưa đánh giá trên chủng mẫu lục bình, đặc biệt là lục bình tươi hàm lượng độ ẩm cao (Lê, Hà, Thanh, Kỳ, 2012).

Năm 2013, Amit Ganguly và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu đánh giá các thông số tối ưu trong phân giải sinh khối Lục Bình ứng dụng lên men sản xuất ethanol. Kết quả hoạt tính enzyme cellulase 46.12U/g, ethanol được sản xuất 3.4969 g/L khi sử dụng chủng *Pichia stiptis*, 3.4496 và 3.1349 g/L khi dùng chủng *Candida shehatae* và *Sac-charomyces cerevisiae* (Ganguly, Das, Bhattacharya, Dey, & Chatterjee, 2013).

Năm 2014, Zia-ullah Khokhar và cộng sự đã nghiên cứu vị trí sản xuất enzyme cellulase của chủng *Trichoderma reesei* đột biến lên men trong môi trường acid ứng dụng tạo ethanol. Kết quả tạo ra chủng

Trichoderma reesei đột biến cho khả năng phân hủy 91% lượng cellulose so với lượng cellulose ban đầu (Khokhar, Qurat-ul-Ain Syed, & Athar, 2014).

Năm 2014, Sudarshan Singh Rathore và cộng sự đã sàng lọc các chủng vi sinh vật ở khu vực hồ có Lục Bình sản xuất enzyme phân hủy cellulose. Kết quả tìm được các chủng *Trichoderma Sp.*, *Asper-gillus Sp.*, *Pseudomonas Sp.*, *Cellulomonas Sp.*, *Bacillus sp.*, và *Micrococcus Sp.* Trong 36 mẫu vi sinh vật thu được sản xuất được enzyme cellulase, xylanase. 10 chủng nấm, 8 chủng vi khuẩn, 12 chủng nấm men, 6 chủng xạ khuẩn đều cho khả năng phân giải cellulose và xylan ứng dụng trong sản xuất nhiên liệu sinh học. Sự phát triển của vi sinh vật ở nhiệt độ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ và pH 6.0 ± 0.4 trong điều kiện hiếu khí, trong vòng 2-5 ngày ủ. (Rathore, Mannivannan, & Naren-dhirakannan, 2014). Chủng *Trichoderma sp* cho khả năng phân hủy hệ sợi cellulose trong Lục Bình cho tiềm năng ứng dụng sản xuất nhiên liệu sinh học và xử lý môi trường. Như vậy việc phân lập chủng vi sinh vật cho hoạt tính enzyme cellulase cao là một yêu cầu hết sức cần thiết.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Lục bình được thu tại phường Tân An, thành phố Thủ Dầu Một, tỉnh Bình Dương và được định danh tại Trường Đại học Thủ Dầu Một. Các chủng nấm *Trichoderma sp* phân lập.

2.2. Phương pháp

Phân lập chủng nấm Trichoderma sp phân giải cellulose: Bảy chủng nấm *Trichoderma sp* được phân lập ở đất vườn Bình Dương và Langbiang (Đà Lạt) (bảng 1). Lấy mẫu đất sâu xuống cách mặt đất 15 - 20 cm (khoảng 5 kg/điểm) cho vào bao nylon sạch (100m² lấy 7 điểm (35kg)), đem

trộn đều, lấy ra khoảng 5kg cho vào bao nilong đem về phòng thí nghiệm để tiến hành phân lập. Sau đó lấy ngẫu nhiên ra 3g đất phân lập bằng phương pháp pha loãng trên PGA, các chủng nấm sau đó được cấy sang môi trường chọn lọc PGA bổ sung CMC làm nguồn Carbon duy nhất theo phương pháp của Elad (1981). Tiến hành cấy truyền và làm thuần bằng phương pháp cấy đơn bào tử (Lester et al., 2008). Nhận dạng hình thái của nấm *Trichoderma* theo phương pháp của Elad (1981). Thông qua vòng phân giải cơ chất CMC khi cho thuốc thử Lugol để định tính hoạt tính phân giải cellulose của chủng nấm phân lập.

Ủ lỵc bình với chủng *Trichoderma* đã thu được: Lỵc bình tươi sấy trong tủ sấy ở nhiệt độ 50°C, đem cân đến khối lỵc lượng không đổi xác định độ ẩm ương đổi trong mẫu Lỵc Bình. Sinh khối tươi tiến hành cắt khúc nhỏ khoảng 1cm sau đó cho lỵc bình vào các bình tam giác đã chuẩn bị từ trước, cân lại khối lỵc lượng, trước khi cho chủng nấm vào ủ đem các bình tam giác này đi khử trùng bằng phương pháp chiếu tia UV trong khoảng 1 giờ. Sau đó các bình tam giác này được ủ với 20ml dịch nuôi lỏng chủng nấm qua đêm ở nhiệt độ 35±2°C. Trong thời gian 10 ngày.

Xác định lỵc lượng cellulose còn lại trong lỵc bình sau khi ủ: Thủy phân các chất hữu cơ không phải cellulose bằng acid rồi bằng kiềm và cồn, phần còn lại là cellulose thô được định phân bằng phương pháp khối lỵc lượng. Cân 25g nguyên lỵc liệu đã được nghiền mịn, cho vào một bình cầu cao cổ đã chứa 50ml nước cất, thêm vào 10ml HCl đậm đặc. Đặt bình cầu lên bếp điện trong tủ hốt, gắn ống sinh hàn khí và đun sôi thật kỹ cho đến khi tinh bột bị thủy phân hoàn toàn, thử điểm kết thúc thủy phân bằng cách chấm một giọt dung dịch thủy phân lên lam kính

vào giọt thuốc thử Lugol đến khi mất màu xanh. Lấy bình cầu ra khỏi bếp, lọc qua giấy lọc không tro, lấy bã. Rửa bã nhiều lần bằng nước cất. Dùng bình tia nước chuyển hết bã vào lại bình cầu đã dùng trên. Thêm vào bình cầu 10ml NaOH 10%. Đặt bình cầu lên bếp, đun sôi 20-30 phút nữa. Lọc lấy bã trên hai giấy lọc không tro có trọng lỵc lượng bằng nhau. Rửa bã 5 lần bằng nước cất, mỗi lần 20ml. Sau đó rửa ba lần bằng dung dịch CH₃COOH 2% rồi bằng rượu etylic nguyên chất (còn tuyệt đối). Sau khi rửa bã, bã có màu trắng trong là được. Đặt cả hai giấy lọc và bã vào chén nung (đã được nung trong lò nung ở 400-500°C để nguội và cân trên cân phân tích) rồi đưa vào tủ sấy 105°C trong 2 giờ, lấy ra để nguội trong bình hút ẩm và cân. Đưa cả hai giấy lọc và bã vào chén nung, tiến hành nung bã trong lò nung ở nhiệt độ 400-500°C trong 3 giờ đến khối lỵc lượng không đổi. Lấy ra để nguội trong bình hút ẩm và cân chén nung chứa tro sau khi nung.

Công thức xác định hàm lỵc lượng cellulose thô(X) được tính bằng % theo công thức :

$$X = \frac{(m_1 - m_2) \cdot 100}{m}$$

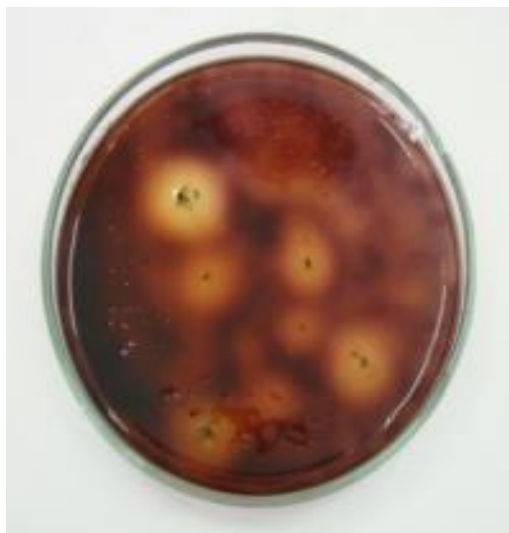
Trong đó: m_1 : khối lỵc lượng chén nung và xơ bã sau sấy (g), m_2 : khối lỵc lượng chén nung và tro sau khi nung (g), m : lỵc lượng cân mẫu (g).

3. KẾT QUẢ:

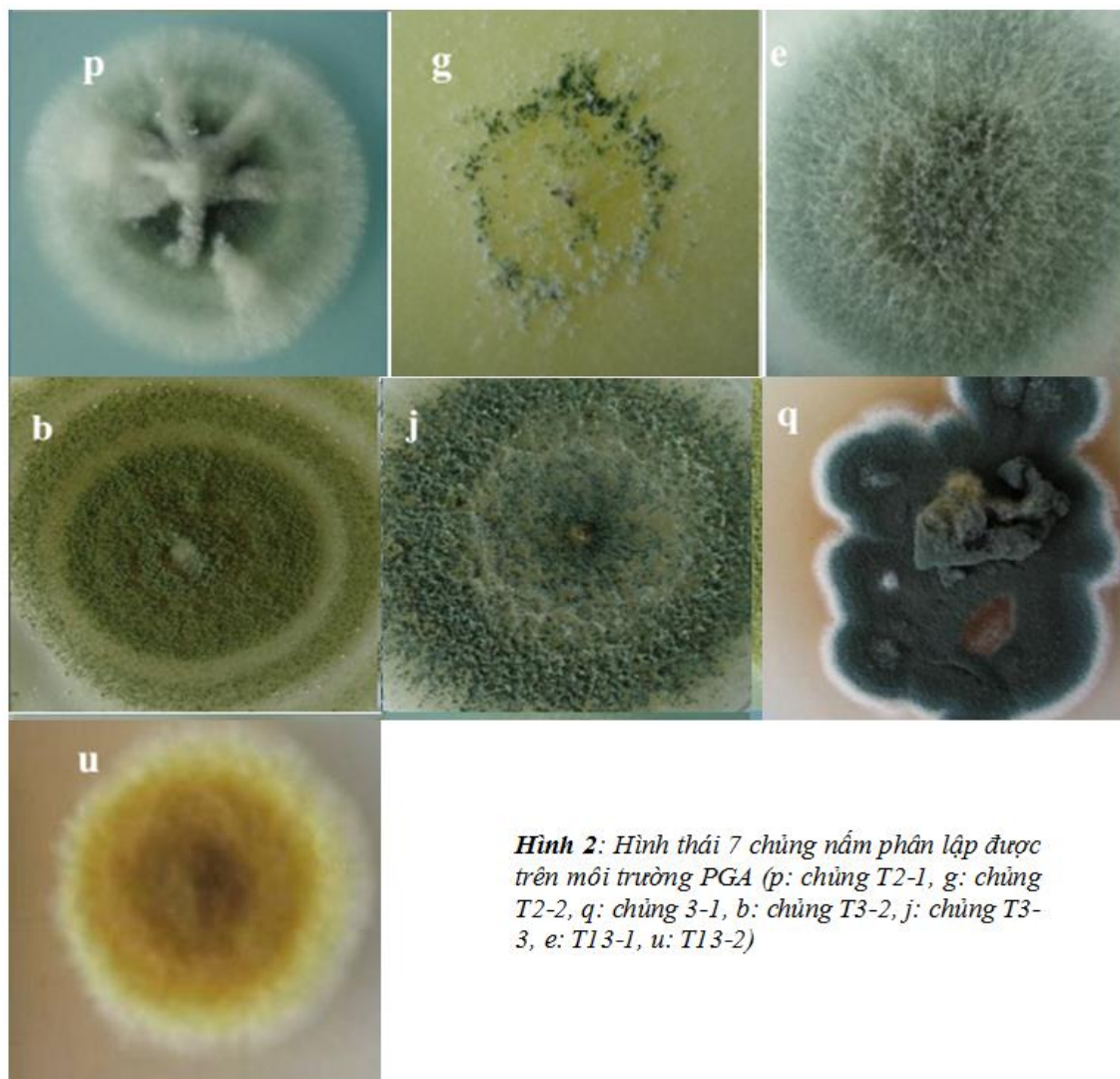
3.1 Phân lỵc chủng nấm *Trichoderma* sp phân giải cellulose

Hình 1 chủng nấm cho vòng phân giải cơ chất CMC trên môi trường PGA chọn lọc và hình 2 là hình thái bảy chủng nấm có vòng phân giải cơ chất CMC lớn nhất, từ bảy chủng nấm này được làm thuần trên các môi trường PGA cho thí nghiệm đánh giá hoạt tính phân hỷ hệ sợi lỵc bình.

Hình 1: Chủng nấm cho vòng phân giải cơ chất CMC trên môi trường PGA chọn lọc

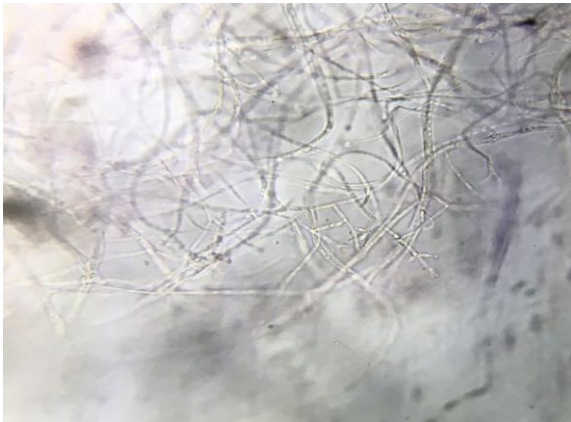


Hình thái chủng nấm khi nuôi cấy trong đĩa petri trên môi trường PGA



Hình 2: Hình thái 7 chủng nấm phân lập được trên môi trường PGA (p: chủng T2-1, g: chủng T2-2, q: chủng 3-1, b: chủng T3-2, j: chủng T3-3, e: T13-1, u: T13-2)

Hình thái cuống sinh bào tử của chủng nấm *Trichoderma* sp phân lập:



Hình 3: Hình thái cuống sinh bào tử của chủng nấm *Trichoderma* sp T3-3.

Đặc điểm hình thái chủng *Trichoderma* sp được thu thập trên đất vườn Bình Dương và đất rừng Langbiang tỉnh Lâm Đồng. Bào tử (conidia) thường hình thành dày đặc, tạo lớp bông màu xanh. Bào tử màu xanh. Cuống đỉnh bào tử (conidiphores) có thể mọc đơn nhưng phổ biến mọc thành cặp. Các nhánh phát sinh vuông góc hoặc gần vuông góc với trục chính. Sự



Hình 4: Hình thái cuống sinh bào tử của chủng nấm *Trichoderma* sp T13-2.

phân nhánh thành cặp đối xứng là khá phổ biến. Thể bình (Phialides). Bào tử hình thành có mật độ khá dày đặc, tạo những vòng tròn đồng tâm hướng ra ngoài mép đĩa. Bào tử màu xanh thường xuất hiện trong vòng (57-66) giờ trên PGA ở 30°C trong bóng tối.

3.2. Khảo sát khả năng phân huỷ hệ sợi lục bình

Bảng 1: Khảo sát khả năng phân giải hệ sợi lục bình bằng chủng *Trichoderma* sp

Tên chủng nấm <i>Trichoderma</i> <i>sp</i>	Khối lượng (g)							
	M (mẫu ban đầu)	M (khô)	M (sấy)	M (tro)	M (cellulose còn lại)	M (cellulose còn lại được quy về cùng khối lượng mẫu ban đầu)	M _{TB} (cellulose còn lại được quy về cùng khối lượng mẫu ban đầu)	Tỉ lệ phân giải trung bình
T2-1	49.8600	2.9916	0.7100	0.2400	0.4700	0.4747	0.4899	26.3671
T2-1	49.8600	2.9916	0.7800	0.2800	0.5000	0.5050		
T2-2	50.9500	3.0570	0.8500	0.3100	0.5400	0.5337	0.5480	17.6216
T2-2	50.1500	3.0090	0.8000	0.2400	0.5600	0.5623		
T3-1	49.8000	2.9880	0.8400	0.2689	0.5900	0.5966	0.6075	8.6920
T3-1	49.6200	2.9772	0.8600	0.2679	0.6100	0.6191		
T3-1	49.8100	2.9886	0.8900	0.2690	0.6000	0.6066		
T3-2	50.0000	3.0000	0.8800	0.2700	0.6100	0.6144	0.6104	8.2545
T3-2	50.0000	3.0000	0.8720	0.2700	0.6020	0.6063		
T3-3	48.6700	2.9202	0.5100	0.2628	0.2472	0.2558	0.3984	40.1222
T3-3	49.0000	2.9400	0.7900	0.2646	0.5254	0.5400		
T13-1	47.8500	2.8710	0.8900	0.2758	0.6142	0.6464	0.6428	3.3736
T13-1	46.6000	2.7960	0.8600	0.2686	0.5914	0.6391		
T13-2	49.8800	2.9928	0.7400	0.3000	0.4400	0.4442	0.4315	35.1398
T13-2	50.3200	3.0192	0.8300	0.3900	0.4400	0.4403		
T13-2	50.3700	3.0222	0.6700	0.2600	0.4100	0.4099		

Mẫu đối chứng	50.7200	3.0432	0.9900	0.3200	0.6700	0.6653
Mẫu đối chứng	50.0000	3.0000	0.9900	0.3200	0.6605	

Bằng phương pháp xác định hàm lượng cellulose còn lại sau khi lục bình được ủ với chủng nấm *Trichoderma sp* so với mẫu đối chứng không được ủ với chủng nấm, trên cùng một phương pháp xác định hàm lượng cellulose, lượng cellulose còn lại được quy chuẩn về cùng một lượng ban đầu ta được kết quả bảng 1. Dựa vào bảng 1, tỉ lệ phân giải lục bình của chủng T3-3 là cao nhất 40%, có nghĩa là trong 50g lục bình tươi có trọng lượng khô là 3g, lượng cellulose ban đầu là 0.6653g và lượng cellulose bị phân hủy là 0.2269g. Các chủng *Trichoderma sp* T13-2 được phân lập ở đất vườn Bình Dương, T2-1, T2-2, T3-3 được phân lập từ mẫu đất trong rừng ở Langbiang (Lâm Đồng), các chủng này cho khả năng phân hủy hệ sợi cao khoảng trên 15%-35%, trong cùng một điều kiện thí nghiệm. Kết quả phân giải này được so sánh với những nghiên cứu trước đó của tác giả Bùi Anh Võ và cộng sự là 50% trong

khoảng 21 ngày ủ, trong khi hoạt tính phân hủy của chủng nấm T3-3 là 40% và T13-2 là 35% trong 10 ngày ủ. Các chủng nấm trong nghiên cứu này được ủ trực tiếp với lục bình tươi so với lục bình xay nhuyễn của những nghiên cứu trước thì việc sử dụng những chủng nấm phân lập trong nghiên cứu này đỡ tốn chi phí cho việc xay nhuyễn cơ chất rút ngắn thời gian một nửa cho hiệu suất gần tương đương.

4. KẾT LUẬN

Các chủng nấm *Trichoderma sp* phân lập được cho hoạt tính phân hủy hệ sợi cellulose của cây Lục Bình mạnh trên 35% trong khoảng thời gian 10 ngày ủ cho tiềm năng ứng dụng Lục Bình làm phân bón, vì hàm lượng cellulose trong hệ sợi Lục Bình cao khoảng 22%. Việc ủ chủng nấm với lục bình tươi không qua khâu xử lý cơ chất ban đầu sẽ giảm chi phí đầu tư.

EVALUATION OF THE DEGRADATED CELLULOSE WATER HYACINTH *EICHHORNIA CRASSIPES* BY *TRICHODERMA SP*

Le Minh Hieu, Tran Ngoc Hung, Mai Thi Ngoc Lan Thanh

ABSTRACT

The aim of this research is evaluation of the degraded cellulose water hyacinth eichhornia crassipes by trichoderma sp. From seven collected fungi in the soil at Binh Duong and Langbiang, Lam Dong province, there are two species that separate the cellulose of eichhornia crassipes strongly upon 35% which are T3-3, T13-2 species. These species were observed the morphology of fungi cultured PGA and the morphology of conidium on behalf of proving Trichoderma sp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bùi Anh Võ, P. N. B. N., Hoàng Hồng Ngọc, Nguyễn Thị Lan Hương, *Phân lập một số chủng vi sinh vật ứng dụng xử lý lục bình làm phân vi sinh*, www1.sokhcn.tayninh.gov.vn/Phan%20lap%20vsv%20xu%20ly%20luc%20binh%20
- [2] Ganguly, A., Das, S., Bhattacharya, A., Dey, A., & Chatterjee, P. K. (2013), *Enzymatic hydrolysis of water hyacinth biomass for the production of ethanol: optimization of driving parameters*, Ind J Exp Biol, 51, 556-566.

- [3] Khokhar, Z.-U., Qurat-Ul-Ain Syed, J. W., & Athar, M. A. (2014), *On-site cellulase production by trichoderma reesei 3ems35 mutant and same vessel saccharification and fermentation of acid treated wheat straw for ethanol production*, EXCLI Journal, 13, 82.
- [4] Lê, T. T., Hà, T. T. T., Thanh, N. T., & Kỳ, N. X. (2012), Tuyển chọn chủng nấm Trichoderma spp. phân giải cellulose mạnh để sản xuất phân hữu cơ vi sinh và nghiên cứu ảnh hưởng của chúng đối với giống đậu xanh 208 vụ xuân 2011 tại hợp tác xã Hương Long (Huế), Tạp chí Khoa học Đại học Huế, 71(2).
- [5] Rathore, S. S., Mannivannan, A., & Narendhirakannan, R. (2014), *Screening of cellulase producing microorganisms from lake area containing water hyacinth for enzymatic hydrolysis of cellulose*, Journal Of Advanced Scientific Research, 5(3).