

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CHỦNG NẤM MỐC HÒA TAN PHOSPHATE VÔ CƠ TỪ ĐẤT TRỒNG RAU Ở LÀNG NGHỀ NGỌC LÃNG, XÃ BÌNH NGỌC, THÀNH PHỐ TUY HÒA, TỈNH PHÚ YÊN

Thiều Minh Trương^{1,*}

Phạm Thị Ngọc Lan²

¹Phòng GDĐT thành phố Tuy Hòa

²Trường Đại học Khoa học Huế

Tóm tắt

*Phosphorus là một trong những chất dinh dưỡng cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của cây trồng. Một số chủng nấm mốc sống trong đất có khả năng hòa tan phosphate vô cơ khó tan thành dễ tan giúp cho cây trồng hấp thụ. Qua nghiên cứu, từ 19 mẫu đất trồng rau ở làng rau Ngọc Lãng, tỉnh Phú Yên đã phân lập được 162 chủng nấm mốc có khả năng hòa tan phosphate vô cơ khó tan và đã tuyển chọn được hai chủng M62 và M91 có khả năng hòa tan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ mạnh nhất. Giải trình tự nucleotide gen 28S rRNA, xác định được chủng M62 là *Aspergillus niger* và M91 là *Aspergillus oryzae*.*

Từ khóa: *Aspergillus, nấm mốc, phosphate vô cơ, phân lập, tuyển chọn*

Abstract

Isolating and selecting the strains of fungi that have the abilities to dissolve inorganic phosphates in Ngoc Lang village, Binh Ngoc commune, Tuy Hoa City, Phu Yen province

*Phosphorus is one of the major essential nutrients for biological growth and development of plants. Some strains of fungi that live in the soil have the abilities to dissolve inorganic phosphates, which are difficult to dissolve into soluble phosphates, which help plants to absorb. The current research results showed that, from 19 different locations of vegetables in Ngoc Lang vegetable-growing village, 162 strains of dissoluble inorganic phosphates were isolated. In particular, two strains, named M62 and M91, have the highest solubility of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Based on the nucleotide sequences of 28S rRNA, two strains M62 and M91 were identified as *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*, respectively.*

Keywords: *Aspergillus, molds, inorganic phosphate, isolation, selection*

1. Dẫn nhập

Nấm mốc có khả năng hòa tan phosphate vô cơ mạnh thường gặp trong đất với các loài như *Aspergillus niger*, *A. awamori*, *Penicillium bilaji*, *P. striota*... Vì vậy, chúng được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu và thử nghiệm sản xuất đã cho nhiều kết quả rất khả quan. Như chế phẩm *Penicillium bilaji* bón cùng với phân lân dạng apatite đã làm tăng 18% lượng lân dễ tiêu trong đất [1]. Trọng lượng khô lúa mì và sự hấp thụ phosphate vào cây lúa mì tăng khi bón chủng nấm mốc hòa tan phosphate mà không cần bổ sung phân lân dạng apatite [4]. Những kết quả nghiên cứu và thử nghiệm đã khẳng định có thể dùng phân

* Email: thieuminhtruong@gmail.com

lân sinh học để dần thay thế một phần phân lân hóa học nhằm cải thiện nguồn đất mà không làm giảm năng suất cây trồng, đồng thời không ảnh hưởng xấu đến môi trường sinh thái.

Hiện nay ở tỉnh Phú Yên diện tích đất trồng rau chiếm khoảng 6014 ha, riêng diện tích đất trồng rau ở làng trồng rau và hoa Ngọc Lãng, xã Bình Ngọc là hơn 20 ha, lượng phân lân hóa học (Super lân) được sử dụng để bón cho rau bình quân khoảng 350kg /ha đất trồng rau. Người dân ở làng nghề trồng rau và hoa Ngọc Lãng tỉnh Phú Yên vẫn có thói quen sử dụng phân bón vô cơ từ lâu đời để bón cho rau màu, còn việc sử dụng phân bón vi sinh (PBVS) vẫn rất hạn chế. Để hướng đến một nền nông nghiệp hữu cơ sạch, bền vững và góp phần khôi phục hệ sinh thái vi sinh vật (VSV) trong đất trồng rau cho các làng nghề trồng rau thì hướng nghiên cứu VSV có ích trong đất, trong đó có nhóm vi sinh vật hòa tan phosphate khó tan là thực sự cần thiết. Đây là cơ sở cho việc nghiên cứu sử dụng chế phẩm lân sinh học nhằm nâng cao năng suất cây trồng và hướng đến nền nông nghiệp hữu cơ an toàn và bền vững.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Các chủng nấm mốc có khả năng hòa tan phosphate vô cơ khó tan được phân lập từ các mẫu đất trồng rau ở làng Ngọc Lãng, xã Bình Ngọc, thành phố Tuy Hòa, tỉnh Phú Yên.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập và đếm số lượng tế bào

- Lấy mẫu đất và xử lý theo tiêu chuẩn [2].
- Sử dụng phương pháp Koch để phân lập nấm mốc có khả năng hòa tan phosphate vô cơ khó tan trên môi trường Czapek thạch đĩa, thay K_2HPO_4 bằng $Ca_3(PO_4)_2$ [3].
- Xác định số lượng tế bào nấm mốc bằng phương pháp đếm gián tiếp thông qua số lượng khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch đĩa [3].

2.2.2. Sàng lọc chủng nấm mốc có khả năng sinh trưởng phát triển mạnh trên môi trường chứa $Ca_3(PO_4)_2$

Các chủng nấm mốc được cấy chấm trên môi trường Czapek thạch đĩa chỉ bổ sung nguồn $Ca_3(PO_4)_2$ không tan. Muốn sinh trưởng phát triển các chủng nấm mốc phải tiết ra các acid để hòa tan $Ca_3(PO_4)_2$. Dựa vào kích thước, bề dày khuẩn lạc để lựa chọn các chủng nấm mốc có khả năng sinh trưởng, phát triển mạnh.

2.2.3. Xác định sinh khối nấm mốc và hàm lượng phosphate vô cơ hòa tan

- Tiến hành nuôi cấy lắc (120 vòng/phút) nấm mốc trong môi trường Czapek dịch thể. Sau 4 ngày thu dịch lọc để xác định hàm lượng phosphate vô cơ hòa tan trong dịch nuôi cấy bằng phương pháp so màu Ceruleo - Molipdic ở bước sóng 620 nm và dựa vào đồ thị chuẩn để tính hàm lượng phosphate vô cơ hòa tan [2].
- Sinh khối tươi được sấy khô tuyệt đối và cân trọng lượng.

2.2.4. Phân loại chủng nấm mốc

- Nấm mốc được nuôi cấy trên môi trường Czapek thạch đĩa ở nhiệt độ 30°C sau 48 giờ lấy ra quan sát màu sắc, hình dạng, độ dày, mép khuẩn lạc, sự tạo sắc tố [3].
- Quan sát hình thái tế bào, cuống sinh bào tử bằng phương pháp làm tiêu bản lá kính [3].
- Giải trình tự gene 28S RNA và tra cứu trên Blast Search để định danh nấm mốc [5].

2.2.5. Xử lý số liệu

- Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

- Xử lý bằng thống kê mô tả (Microsoft Excel 2010) và phân tích ANOVA (Duncan's test $p < 0,05$) của chương trình SPSS 20.0.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Phân lập và sàng lọc các chủng nấm mốc có khả năng hòa tan $Ca_3(PO_4)_2$

3.1.1. Tìm hiểu số lượng nấm mốc

Mẫu được lấy từ tầng đất canh tác (20 cm) trồng các loại rau cải ngọt, dền, mồng tơi... tại làng trồng rau và hoa Ngọc Lãng, thành phố Tuy Hòa. Đất trồng rau và hoa là nền đất khô, đa phần là đất cát pha sét nhẹ, pH đất từ acid yếu đến acid, thậm chí có mẫu đất rất acid (mẫu đất trồng rau má (RMAN) pH chỉ 3,58). Từ 19 mẫu đất trồng rau màu đã phân lập và thuần khiết được 162 chủng nấm mốc có khả năng sinh trưởng phát triển trên môi trường chỉ chứa phosphate vô cơ khó tan. Số lượng nấm mốc sinh trưởng phát triển trên môi trường Czapek chứa $Ca_3(PO_4)_2$ được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Số lượng nấm mốc trong các mẫu đất phân lập

STT	Kí hiệu mẫu	pH _{KCl} mẫu	CFU/g đất khô($\times 10^4$)
1	RM	4,83	7,03
2	ET	4,33	7,24
3	XLM	4,08	12,2
4	RG	4,06	4,08
5	CO	5,41	16,2
6	HA	5,19	16,2
7	RMAN	3,58	3,66
8	NGON	4,38	8,32
9	MDEN	4,50	5,32
10	MTN	6,47	43,20
11	RR	4,97	6,40
12	TT	4,89	5,62
13	MT	5,59	9,22
14	XL	4,94	12,8
15	OT	3,72	4,95
16	CNG	4,16	5,74
17	TO	4,32	5,71
18	NGO	4,46	5,23
19	RDC	4,76	6,97

Ghi chú CFU: Colony Forming Unit

Qua kết quả ở bảng 1 ta thấy, số lượng nấm mốc phân bố không đồng đều trong các mẫu đất phân lập, cao nhất là ở mẫu MTN ($43,20 \times 10^4$ CFU/g), thấp nhất là ở mẫu RMAN ($3,66 \times 10^4$ CFU/g). Sự khác nhau này do nhiều nguyên nhân như loại cây được trồng, độ dinh dưỡng của đất, độ ẩm và các đặc điểm lý hóa khác của đất...

3.1.2. Sàng lọc các chủng nấm mốc có khả năng hòa tan $Ca_3(PO_4)_2$

Các chủng nấm mốc được nuôi cấy trực tiếp trên môi trường thạch đĩa Czapek có bổ sung $Ca_3(PO_4)_2$. Thông qua kích thước và bề dày khuẩn lạc có thể đánh giá được mức độ

sinh trưởng, phát triển của các chủng nấm mốc qua đó gián tiếp đánh giá sơ bộ khả năng hòa tan photphate của nấm mốc để sinh trưởng phát triển. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Qua bảng 2 nhận thấy, tất cả các chủng nấm mốc phân lập được đều có khả năng sinh trưởng phát triển trên môi trường chứa phosphate vô cơ khó tan nhưng ở các mức độ khác nhau. Số chủng nấm mốc sinh trưởng, phát triển yếu và trung bình tương đối nhiều (29,01% - 35,80%); các chủng rất mạnh và mạnh ít hơn (3,09% - 8,02%); có 39 chủng mọc loang nhưng với mức độ tạo sinh khối là không lớn.

Dựa vào kích thước và bề dày khuẩn lạc chúng tôi chọn ra 5 chủng thể hiện ưu thế sinh trưởng phát triển mạnh nhất để thử nghiệm khả năng hòa tan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ và sự tích lũy sinh khối trong môi trường dịch thể để tuyển chọn chủng có hoạt lực hòa tan phosphate mạnh.

Bảng 2. Năng lực sinh trưởng, phát triển của các chủng nấm mốc

Năng lực sinh trưởng, phát triển	Kí hiệu	Số chủng	Tỉ lệ (%)
Yếu	+	47	29,01
Trung bình	++	58	35,80
Mạnh	+++	13	8,02
Rất mạnh	++++	5	3,09
Loang	-	39	24,08

Ghi chú: -: Không xác định

3.2. Tuyển chọn các chủng nấm mốc có khả năng hòa tan phosphate vô cơ mạnh

Nuôi cấy lác 5 chủng nấm mốc trong môi trường Czapek dịch thể có pH = 6,5 với hàm lượng $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ bổ sung là 20 mg/ml. Thu dịch lọc và xác định hàm lượng phosphate hòa tan, đồng thời thu sinh khối để đánh giá năng lực sinh trưởng phát triển của các chủng nấm mốc.

Bảng 3. Khả năng sinh trưởng, phát triển và hòa tan phosphate của 5 chủng nấm mốc

STT	Chủng	Sinh khối khô(mg/ml)	Hàm lượng PO_4^{3-} hòa tan(mg/ml)
1	M11	9,34 ^b	0,17 ^d
2	M14	8,29 ^c	10,45 ^c
3	M40	7,91 ^d	0,12 ^d
4	M62	9,97 ^{ab}	18,08 ^a
5	M91	10,02 ^a	13,95 ^b

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test); Hàm lượng PO_4^{3-} hòa tan đã được hiệu chỉnh với bình số 0 (môi trường Czapek dịch thể với pH = 6,5 sau 4 ngày).

Qua kết quả nghiên cứu cho thấy rằng, cả 5 chủng nấm mốc đều có khả năng sinh trưởng tốt và hòa tan photphate mạnh trên môi trường Czapek dịch thể, với hàm lượng phosphate hòa tan đạt từ 0,12 mg/ml đến 18,08 mg/ml và sinh khối khô đạt từ 7,91 mg/ml đến 10,02 mg/ml. Trong đó 2 chủng có hiệu lực mạnh nhất đó là chủng M62 (lượng phosphate hòa tan 18,08 mg/ml, sinh khối khô đạt 9,97 mg/ml) và chủng M91 (lượng phosphate hòa tan 13,95 mg/ml, sinh khối khô đạt 10,02 mg/ml).

3.3. Đặc điểm hình thái và phân loại chủng nấm mốc M62 và M91

3.3.1. *Chủng M62*

- *Đặc điểm hình thái:*

Khuẩn lạc mọc dày có màu trắng xám, bề mặt xốp, tâm đen nhô cao, hệ sợi nấm lan tỏa phóng xạ. Đường kính khuẩn lạc sau 4 ngày nuôi cấy đạt 5,5 cm, trên bề mặt không có giọt tiết và không tiết sắc tố vào môi trường (hình 1). Sơ bộ xác định chủng M62 thuộc chi *Aspergillus*.

Quan sát tiêu bản, chủng M62 sau 72 giờ nuôi cấy cho thấy, khuẩn ti có vách ngăn ngang, cuống sinh bào tử không màu, dạng thẳng, không phân nhánh, đỉnh cuống sinh bào tử có thể bình, bào tử trần hình cầu, màu xám đen, đính đều xung quanh đỉnh cuống sinh bào tử (hình 1).



Hình 1. Đặc điểm hình thái của chủng nấm mốc M62

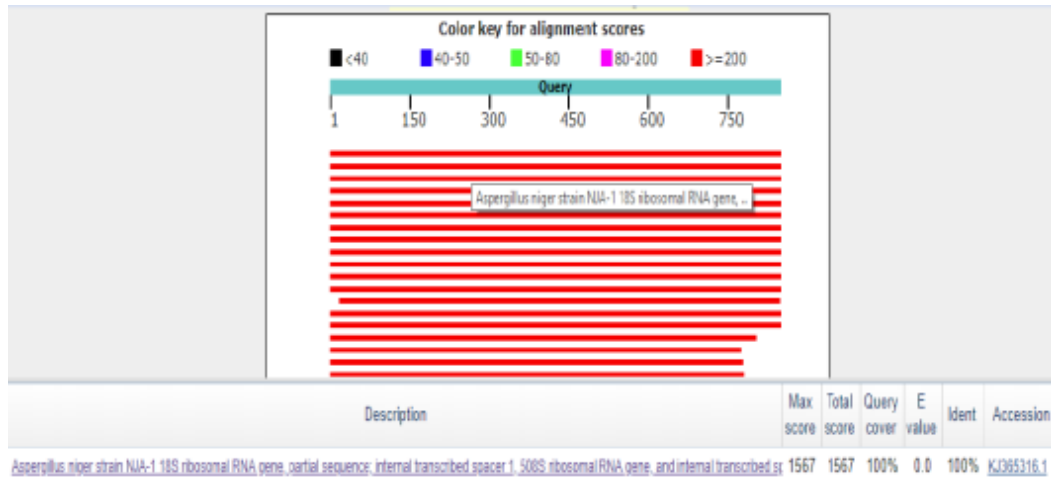
- *Định danh:*

Chủng nấm mốc M62 được giải trình tự nucleotide gen 28S RNA và so sánh với dữ liệu Genbank trên trang web NCBI bằng công cụ BLAST SEARCH. Trình tự này tương đồng với trình tự của loài nấm mốc *Aspergillus niger* đã được đăng ký trong Genbank và với giá trị E - value bằng 0,0 (hình 2).

```

CCCCGCCCAAGACGGGATTCTCACCCCTCTCTGACGGCCCGTTCCAGGGCACTTAGA
CGGGGGCCGCACCCAAAGCATCCTCTGCAAATTACAATGCGGACTCCGAAGGAGC
CAGCTTTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCGGT
TGGTTTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTTCAGCGGGTATCCCTACCTGAT
CCGAGGTCAACCTGGAAAGAATGGTTGGAAAACGTCGGCAGGCGCCGGCCAATCC
TACAGAGCATGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGC
TGCCTTTTCGGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCC
GGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAAGGG
GGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACCTGAATTCTGCAATTCACATTAGT
TATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAA
GTTTTAACTGATTGCATTCAATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTCGTGT
TGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGCCCGGGGGGCAGAGGCGCCCCCGGGCGGGCC
GACAAGCGGCGGGCCCGCCGAAGCAACAGGGTACAATAGACACGGATGGGAGGTT
GGGCCCAAAGGACCCGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAAC
CTTGTTACGACTTTTACTTCTCTAAATGACCGGGTTTGACCAACTTTCCGGCTCTG
GGGGTTCGTTG

```



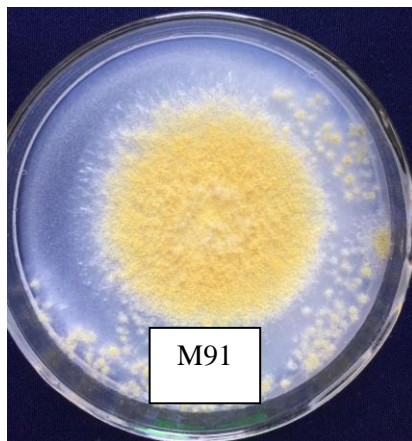
Hình 2. Kết quả giải trình tự gen 28S rRNA của chủng M62 và tra cứu trên Blast search

3.3.2. Chủng M91

- Đặc điểm hình thái:

Khuẩn lạc mọc dày có màu vàng hoa cau, bề mặt nhung mịn, hệ sợi nấm lan tỏa phóng xạ. Đường kính khuẩn lạc sau 4 ngày nuôi cấy đạt 5,7 cm, trên bề mặt không có giọt tiết và tiết sắc tố màu cam nhạt vào môi trường (hình 3). Sơ bộ xác định chủng M91 thuộc chi *Aspergillus*.

Quan sát tiêu bản, chủng M91 sau 72 giờ nuôi cấy cho thấy, khuẩn ti có vách ngăn ngang, cuống sinh bào tử không màu, dạng thẳng, không phân nhánh, đỉnh cuống sinh bào tử có thể bình, bào tử trần hình cầu, màu xám đen, đỉnh đều xung quanh đỉnh cuống sinh bào tử (hình 3).



M91 (x40)

Hình 3. Đặc điểm hình thái của chủng nấm mốc M91

- Định danh:

Trình tự gen vùng 28S rRNA của chủng M91 được thể hiện qua hình 4.

```

GGCTCGGTGAGGCCTTCGGACTGGCCCAGGAGGGTTGGCAACGACCCCCAGGG
CCGGAAAGTTGGTCAAACCCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC
CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCAA
CCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGGCCCGCCATTGCG
CGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCGCCGCGCCGAGACACCACGAACCTCTG
TCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTTCAACAATG
GATCTCTTGGTTCGGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGA
ATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATT
CCGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTG
TTGGGTCGTCCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGGCGGCAC
CGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCG
GCGCTTGGCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGA
TACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACCGGGATTG
CCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCG
GGTCCGCATTGTAATTTGCAGAGGATGCTTCGGGTGCGGCCCTGTCTAAGTGCC
CTGGAACGGGCGTCAGAGAGGGTGAGAATCCCCTCTGGGATGGGGTGTCCGCG
CCCGTGTGAAGC

```



Hình 4. Kết quả giải trình tự gen 28S rRNA của chủng M91 và tra cứu trên Blast search

Chủng nấm mốc M91 được giải trình tự nucleotide gen 28S RNA và so sánh với dữ liệu Genbank trên trang web NCBI bằng công cụ BLAST SEARCH. Trình tự này tương đồng với trình tự của loài nấm mốc *Aspergillus oryzae* đã được đăng ký trong Genbank và với giá trị E - value bằng 0,0.

4. Kết luận

4.1. Từ 19 mẫu đất trồng rau đã phân lập được 162 chủng nấm mốc có khả năng sinh trưởng phát triển trên môi trường Czapek chỉ có $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ là nguồn phosphorus duy nhất. Số lượng nấm mốc trong các mẫu đất là không đồng đều, dao động từ $3,66 \times 10^4$ - $43,2 \times 10^4$ CFU/g.

4.2. Tuyển chọn được hai chủng nấm mốc M62 và chủng M91 có khả năng tạo sinh khối và hòa tan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ mạnh nhất.

Chủng M62: hàm lượng phosphate hòa tan đạt 18,08 mg/ml và sinh khối khô đạt 9,97 mg/ml; được định danh là *Aspergillus niger*.

Chủng M91: hàm lượng phosphate hòa tan đạt 13,95 mg/ml và sinh khối khô đạt 10,02 mg/ml; được định danh là *Aspergillus oryzae* □

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Thị Phương Chi, Phạm Thanh Hà (1999). Phối hợp các chủng cố định nitơ và vi khuẩn hòa tan phosphate để nâng cao hiệu quả phân vi sinh vật. *Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*. Nxb KH&KT, Hà Nội.
- [2] Đoàn Văn Cung và các cộng sự (1998). *Sổ tay phân tích đất, nước, phân bón cây trồng*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
- [3] Phạm Thị Ngọc Lan (2012). *Giáo trình thực tập Vi sinh vật học*. Nxb Đại học Huế.
- [4] Phạm Thị Ngọc Lan, Trương Văn Lung (2003). Ảnh hưởng của việc sử dụng nấm

mốc phân giải lân khó tan đến một số chỉ tiêu sinh lý và sinh hóa của lúa Khang Dân và IR 17494. Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống. *Báo cáo Hội nghị CNSH toàn quốc*. Nxb KH&KT, Hà Nội.

- [5] Sambrook J. and Russell D. W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, pp. 35 – 68.

(Ngày nhận bài: 4/03/2018; ngày phản biện: 27/04/2018; ngày nhận đăng: 01/10/2018)