

DOI:10.22144/ctu.jvn.2017.160

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN MỘT SỐ ĐÒNG NẤM TỪ GỖ MỤC CÓ KHẢ NĂNG LOẠI MÀU THUỐC NHUỘM Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Nguyễn Khởi Nghĩa

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

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 03/05/2017

Ngày nhận bài sửa: 21/07/2017

Ngày duyệt đăng: 30/11/2017

Title:

Isolation and selection of indigenous white-rot fungi in the Mekong delta of Vietnam for decolourisation of dye textile compounds

Từ khóa:

Gỗ mục, loại màu, nấm, thuốc nhuộm đen, thuốc nhuộm xanh

Keywords:

Brilliant Black BN, Bromophenol blue, decayed wood, decolourisation, fungi

ABSTRACT

The main objective of this study was to isolate and identify indigenous white rot fungi for bioremediation of dye textile compounds. Fungal fruit body samples were collected from decaying woods in the Mekong Delta for isolation. The dye textile compound decolourisation capacity of isolated fungi was tested on MT3 (Jonathan and Fasidi, 2001) containing 500 mg.L⁻¹ Brilliant Black BN or Bromophenol blue. The results showed that 54 fungal isolates were isolated from decaying wood. Twelve out of fifty four fungal isolates showed their capacity in decolourisation of Bromophenol blue. The HG1 strain was able to degrade 493 mg.L⁻¹ Bromophenol blue, corresponding to 92% within 8 days of incubation, while fifteen out of fifty four fungal isolates showed their capacity in decolourisation of Brilliant Black BN. The maximum decolourisation of this compound was 99% (493 mg.L⁻¹) within 7 days of incubation by TV13 strain. HG1 and TV13 were identified as the best candidates for decolourisation of Brilliant Black BN and Bromophenol blue compounds, respectively. Based on the results of 18S-rRNA sequences, these two candidates were genetically and relatively identified as genus of *Marasmiellus*. Thus, these two fungal isolates were relatively identified as *Marasmiellus* sp. HG1 and *Marasmiellus* sp. TV13.

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm phân lập và định danh một số dòng nấm phân hủy gỗ mục có khả năng loại màu thuốc nhuộm xanh và đen. Thể quả của nấm được thu thập trên gỗ mục ở Đồng bằng sông Cửu Long để phân lập. Định tính và định lượng khả năng loại màu thuốc nhuộm được tiến hành với môi trường MT3 (Jonathan and Fasidi, 2001) bổ sung 500 mg.L⁻¹ thuốc nhuộm. Kết quả nghiên cứu cho thấy tổng cộng 54 dòng nấm từ gỗ mục được phân lập, trong đó 12 và 15 trong số 54 dòng nấm phân lập lần lượt thể hiện khả năng loại màu thuốc nhuộm xanh và đen. Hai dòng nấm ký hiệu HG1 và TV13 thể hiện khả năng loại màu thuốc nhuộm xanh và đen cao nhất. Dòng nấm HG1 có khả năng loại màu thuốc nhuộm xanh cao nhất sau 8 ngày nuôi cấy, giảm 457 mg.L⁻¹, chiếm 92% nồng độ ban đầu (500 mg.L⁻¹) trong khi dòng nấm TV13 có khả năng loại màu thuốc nhuộm đen tốt nhất sau 7 ngày nuôi cấy, giảm 493 mg.L⁻¹, chiếm 99% nồng độ ban đầu. Kết quả giải mã trình tự đoạn gen 18S-rRNA cho thấy cả 02 dòng nấm HG1 và TV13 thuộc chi *Marasmiellus*. Vì vậy, cả 02 dòng này được định danh là *Marasmiellus* sp. HG1 và *Marasmiellus* sp. TV13.

Trích dẫn: Nguyễn Khởi Nghĩa, 2017. Phân lập và tuyển chọn một số dòng nấm từ gỗ mục có khả năng loại màu thuốc nhuộm ở Đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 53b: 79-87.

1 GIỚI THIỆU

Cùng với sự phát triển của ngành công nghiệp phẩm màu và hóa học thì thuốc nhuộm màu tổng hợp được sản xuất rất đa dạng về chủng loại và được sử dụng một cách rộng rãi, đặc biệt trong ngành công nghiệp dệt may (Trần Văn Nhân và Ngô Thị Nga, 2002; Cao Hữu Trọng và Hoàng Thị Linh, 2003). Hàng năm, khoảng 280.000 tấn thuốc nhuộm được thải ra môi trường trên toàn thế giới chủ yếu từ ngành công nghiệp dệt may, các chất nhuộm màu độc hại và khó phân hủy sinh học. Nước thải từ ngành công nghiệp dệt may gồm hỗn hợp của nhiều chất gây ô nhiễm môi trường như muối, acid, kim loại nặng, thuốc trừ sâu chlor hữu cơ, bột màu và thuốc nhuộm. Hiệu suất thấp trong việc nhuộm màu dẫn đến một lượng lớn thuốc nhuộm còn dư hoà vào trong nước thải, trong quá trình dệt và cuối cùng được thải ra môi trường (Farah *et al.*, 2013). Việt Nam có thành phần nước thải dệt may rất đa dạng gồm các hoá chất phụ trợ, một số kim loại nặng (crom, nhân thơm benzen), chất hoạt động bề mặt và một lượng lớn các hợp chất rất bền khác cùng thải vào môi trường (Đặng Xuân Việt, 2007). Nhiều phương pháp đã được nghiên cứu để ứng dụng loại màu nhuộm này như keo tụ, hấp phụ và màng sinh học... Tuy nhiên, sản phẩm cuối cùng sau tiến trình xử lý vẫn còn chứa một lượng lớn bùn lắng và màu (Zolinger, 1991). Trong những năm gần đây, việc nghiên cứu công nghệ xử lý nước thải dệt may bằng vi sinh vật được quan tâm vì mang lại hiệu quả cao và thân thiện môi trường sinh thái như *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* và *Aureobasidium pullulans* (Martins *et al.*, 2003; Yi-Chin *et al.*, 2003), *Thelephora* sp. (Selvam *et al.*, 2003), *Phanerochaete sordida* (Koichi and Kazunori, 2005), *Pleurotus ostreatus* (Xueheng *et al.*, 2006), *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463 (Jadhav, 2007), *Aspergillus niger*, *Aspergillus japonica*, *Rhizopus nigricans*, *Rhizopus arrhizus* và *Saccharomyces cerevisiae* (Kumud, 2007), *Trametes versicolor*, *Pleurotus flabellatus* (Binupriya, 2008), *Phanerochaete* sp. HSD (Wang *et al.*, 2009), *Aspergillus* sp. FBH11 (Châu Ngọc Diệp, 2010), *Trametes maxima* CPB30 (Đương Minh Lam và Trương Thị Chiên, 2013)... Trong đó, nấm phát triển từ gỗ mục là một trong những vật liệu được các nhà khoa học đặc biệt chú ý đến trong việc loại màu nước thải nhuộm vì các dòng nấm này có chứa hệ enzyme ngoại bào chuyên biệt có khả năng phân hủy hoặc hấp thụ vào sinh khối nấm nhờ một chuỗi các tiến trình chuyển hóa sinh học (Robinson *et al.*, 2001, Khan *et al.*, 2013).

Các quá trình chuyển hóa này có sự trợ giúp

của hệ enzyme chuyên biệt như laccase, ligninase, cellulase... có khả năng phân hủy thuốc nhuộm, lignin, thuốc trừ sâu hoặc chuyển chúng thành các sản phẩm ít độc hơn (Robinson *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2008). Tuy nhiên, các nghiên cứu về phân lập và tuyển chọn những dòng nấm từ gỗ mục phục vụ cho việc xử lý sinh học chất nhuộm trong nước thải từ các nhà máy dệt và thuộc da vẫn còn rất hạn chế. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu phân lập và tuyển chọn một số dòng nấm có nguồn gốc bản địa trong gỗ mục để loại màu nhuộm tổng hợp trong chất thải của ngành dệt may đồng thời định danh các dòng nấm này bằng phương pháp sinh học phân tử.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguồn nấm

Thu thập quần thể nấm trên thân cây gỗ mục ở ĐBSCL bằng cách dùng dao cắt lấy toàn bộ thể quả của nấm đang phát triển trên thân cây đang hoai mục gồm cây dừa, còng, tre, bàng... ở Cần Thơ, Hậu Giang, Trà Vinh và Vĩnh Long. Sau đó, cho vào túi nylon, buộc kín miệng, ghi chú địa điểm, thời gian thu mẫu và bảo quản trong tủ lạnh.

2.2 Môi trường sử dụng để phân lập và đánh giá chức năng của nấm

Môi trường Malt Extract Agar (MEA) dùng phân lập nấm (Kumaran and Dharani, 2011) gồm Malt extract 20 g, agar 20 g hòa tan đều trong 1L nước khử khoáng và hiệu chỉnh pH 6,5.

Môi trường dùng để nuôi cấy và khảo sát khả năng loại màu của nấm (MT3) (Jonathan and Fasidi, 2001) gồm Glucose 10 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0,5 g, CaCl_2 0,14 g, Yeast extract 1 g, Thiamine 0,0025 g hòa tan với 1L nước khử khoáng.

Môi trường PDA (Potato Dextrose Agar) (Gams *et al.*, 1998): Potato infusion 200 g, dextrose 20 g, agar 20 g và 1L nước khử khoáng. Tất cả môi trường được khử trùng 121°C trong 20 phút.

2.3 Phân lập và tách rông các dòng nấm

Mẫu vật có chứa thể quả nấm sau khi thu thập được rửa sạch và tiệt trùng bề mặt lần lượt bằng cồn 96% trong 3 phút, hypochloride 1% trong 3 phút, hydrogen peroxide 3% (H_2O_2) trong 3 phút và rửa lại bằng nước cất tiệt trùng 4 lần; sau đó chế đôi thể quả, cắt một mảnh mô nhỏ trên thân nấm đặt lên trên môi trường MEA và đem ủ ở nhiệt độ phòng trong 4 ngày ở điều kiện tối; sau khi sợi nấm phát triển trên môi trường nuôi cấy, tiến hành cấy chuyển liên tục 4 lần trong cùng một môi trường để tinh rông các dòng nấm.

2.4 Đánh giá khả năng loại màu thuốc nhuộm của 54 dòng nấm phân lập

2.4.1 Định tính khả năng loại màu thuốc nhuộm của các dòng nấm phân lập trên môi trường MEA bổ sung thuốc nhuộm

Thực hiện chủng từng dòng nấm đã được tinh rỗng lên môi trường MEA bằng cách đặt một khối môi trường MEA (đường kính 6 mm) chứa sợi nấm phát triển tốt vào giữa đĩa petri chứa môi trường MEA có bổ sung 500 mg.L⁻¹ thuốc nhuộm đen hoặc xanh (Brilliant Black BN hoặc Bromophenol blue). Nghiệm thức đối chứng được thực hiện tương tự nhưng không chủng nấm. Thí nghiệm được bố trí với 3 lần lặp lại cho mỗi dòng nấm thử nghiệm. Mẫu được ủ ở 30°C. Sau 10 ngày ủ tiến hành kiểm tra và đánh giá khả năng loại màu thuốc nhuộm của từng dòng nấm bằng cách xác định cường độ vùng mất màu nằm xung quanh khuẩn ty nấm.

2.4.2 Định lượng khả năng loại màu thuốc nhuộm của các dòng nấm thể hiện định tính phân giải màu thuốc nhuộm

Tiến hành định lượng khả năng loại màu thuốc nhuộm của các dòng nấm có tiềm năng sau khi đã được định tính (12 dòng nấm loại màu thuốc nhuộm đen và 15 dòng loại màu thuốc nhuộm xanh). Quy trình được thực hiện như sau: Hút 30 mL môi trường MT3 (Jonathan and Fasidi, 2001) có bổ sung 500 mg.L⁻¹ thuốc nhuộm đen hoặc xanh vào bình tam giác 100 mL tiệt trùng. Sau đó, dùng ống cắt chuyên biệt có đường kính 0,6 cm để cắt 3 khối agar có sợi nấm phát triển tốt chuyển vào bình tam giác, cuối cùng đập nắp gọn lại. Thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện lắc tròn với tốc độ 150 vòng/phút ở nhiệt độ phòng, trong tối, trong 8 ngày đối với chất nhuộm màu đen và 7 ngày đối với chất nhuộm màu xanh. Ghi nhận nồng độ thuốc nhuộm trong môi trường nuôi cấy tại các thời điểm 0, 4, 8 ngày đối với thuốc nhuộm đen và 0, 1, 3, 5, 7 ngày đối với thuốc nhuộm xanh. Cách xác định hàm lượng thuốc nhuộm còn lại trong môi trường nuôi cấy: hút 2,5 mL mẫu môi trường nuôi cấy nấm tại thời điểm thu mẫu, ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút. Hút 2 mL phần nước bên trên cho vào ống nghiệm và vortex trong 1 phút. Sau đó, đo trên máy quang phổ với bước sóng 580 nm cho thuốc nhuộm xanh và 590 nm cho thuốc nhuộm đen. Cuối cùng, dùng phương trình tuyến tính được thiết lập từ dãy đường chuẩn để tính nồng độ thuốc nhuộm trong môi trường nuôi cấy tại thời điểm thu mẫu.

2.4.3 Định danh 2 dòng nấm ký hiệu HG1 và TV13 có tiềm năng ứng dụng cao nhất bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Giải mã trình tự một đoạn gen 18S rRNA của dòng nấm tuyển chọn thể hiện khả năng loại màu tốt nhất đối với 2 loại thuốc nhuộm xanh và đen. Kết quả trình tự giải mã một đoạn gen của dòng nấm được đối chiếu với dữ liệu trên ngân hàng gen NCBI nhằm định danh tên khoa học của hai dòng nấm. DNA của nấm được trích bằng CTAB 3% (Ihrmark *et al.*, 2012); kết tủa DNA bằng 750 µL isopropanol lạnh, trữ -20°C trong 30 phút; ly tâm mẫu ở tốc độ 13.000 rpm trong 30 phút, sau đó, cẩn thận loại bỏ isopropanol; tiếp tục làm sạch DNA thu được bằng 200 µL ethanol lạnh; ly tâm ở tốc độ 6.500 rpm trong 5 phút; loại bỏ ethanol và mẫu được để qua đêm ở nhiệt độ phòng thí nghiệm; sau đó cho thêm 100 µL TE buffer vào để trữ mẫu trong tủ đông ở -20°C cho các công việc sau.

Khuếch đại DNA bằng kỹ thuật PCR: Sau khi tinh sạch DNA, tiến hành thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi tổng ITS1F/ITS4R (Gardes and Burns, 1993) có trình tự như sau:

ITS1F(5'-CTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')

ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

Thành phần của 1 phản ứng PCR (thể tích/1 phản ứng) bao gồm 5 µL Dream taq buffer (5x); 0,5 µL mỗi xuôi ITS1F (10 µM); 0,5 µL mỗi ngược ITS4R (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⁻¹). Chương trình nhiệt của phản ứng PCR gồm 3 bước với 1 chu kỳ (94°C trong 5 phút) ở bước 1, 35 chu kỳ (94°C trong 1 phút); 55°C trong 1 phút và 72°C trong 2 phút) ở bước 2 và 1 chu kỳ (72°C trong 7 phút) ở bước 3. Kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose trước khi giải trình tự đoạn gen. Các sản phẩm PCR có vạch DNA đậm và rõ trên gel agarose sẽ được gửi giải mã trình tự gen ở công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa. Từ kết quả giải trình tự, các trình tự này sẽ được so sánh với các trình tự có trong ngân hàng gen NCBI <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> để xác định tên loài của dòng nấm khảo sát.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập và tuyển chọn các dòng nấm phát triển trên gỗ mục có khả năng loại màu thuốc nhuộm

Từ các mẫu thân cây gỗ mục thu thập tại các tỉnh Cần Thơ, Hậu Giang, Trà Vinh và Vĩnh Long

đã phân lập được 54 dòng nấm ký hiệu tương ứng cho từng địa điểm thu thập như Cần Thơ (ký hiệu CT1 → CT12), Hậu Giang (HG1 → HG14), Trà

Vinh (TV1 → TV14) và Vĩnh Long (VL1 → VL14). Số lượng dòng nấm phân lập được cho mỗi địa điểm được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1: Địa điểm và số lượng dòng nấm được phân lập

Địa điểm	Số lượng dòng nấm phân lập	Tỉ lệ phân lập được (%)
Huyện Cầu Kè - tỉnh Trà Vinh	14	26
Huyện Châu Thành - tỉnh Hậu Giang	14	26
Quận Ô Môn - Tp. Cần Thơ	12	22
Huyện Trà Ôn - tỉnh Vĩnh Long	14	26

3.2 Đánh giá khả năng loại màu của 54 dòng nấm phân lập

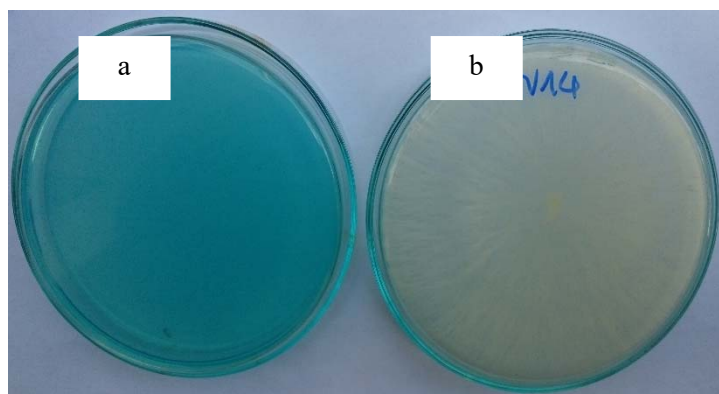
3.2.1 Định tính khả năng loại màu thuốc nhuộm xanh và đen trên môi trường MEA agar của 54 dòng nấm phân lập

Kết quả đánh giá định tính về khả năng loại màu hai loại thuốc nhuộm xanh và đen của 54 dòng nấm trong môi trường MEA sau 10 ngày nuôi cấy được trình bày ở Bảng 2 cho thấy đối với thuốc nhuộm màu đen, kết quả ghi nhận có 12 dòng trong tổng số 54 dòng nấm phân lập thể hiện định tính khả năng loại màu thuốc nhuộm đen và chiếm 22% trong tổng số 54 dòng phân lập được. Trong đó, có 7 dòng loại màu thuốc nhuộm đen hoàn toàn gồm các dòng VL8, VL13, HG1, HG14, TV5, TV13 và TV14 và chiếm 58% trong tổng số các dòng thể

hiện định tính khả năng loại màu thuốc nhuộm đen (Hình 1). Kế đến, kết quả cũng cho thấy có 15 dòng nấm trong tổng số 54 dòng phân lập có khả năng loại màu thuốc nhuộm xanh và chiếm 28% trong tổng số 54 dòng phân lập được. Trong đó, có 11 dòng nấm loại màu hoàn toàn thuốc nhuộm xanh gồm các dòng VL5, VL10, VL12, VL13, HG1, HG8, HG14, TV5, TV10, TV14 và CT11 và chiếm 73% trong tổng số các dòng thể hiện định tính khả năng loại màu thuốc nhuộm xanh (Hình 2). TV13 và CT3 là hai dòng nấm loại màu thuốc nhuộm xanh cao nhất trong khi VL8 và HG2 loại màu thuốc nhuộm xanh ở mức trung bình. Kết quả định tính khả năng loại màu thuốc nhuộm cao nhất cho thấy dòng nấm TV13 và HG1 có khả năng loại màu thuốc nhuộm đen và thuốc nhuộm xanh hiệu quả nhất trên môi trường MEA.



Hình 1: Khả năng loại màu thuốc nhuộm đen trên môi trường MEA của dòng nấm TV13 sau 10 ngày nuôi cấy: (a) đối chứng không chủng nấm và (b) chủng dòng nấm TV13



Hình 2: Khả năng loại màu thuốc nhuộm xanh trên môi trường MEA của dòng nấm TV14 sau 10 ngày nuôi cấy: (a) đối chứng không chủng nấm và (b) chủng dòng nấm TV14

Bảng 2: Khả năng loại màu thuốc nhuộm đen hoặc xanh của 15 dòng tằm chọn từ tổng số 54 dòng nấm phân lập trên môi trường MEA bổ sung thuốc nhuộm sau 10 ngày nuôi cấy

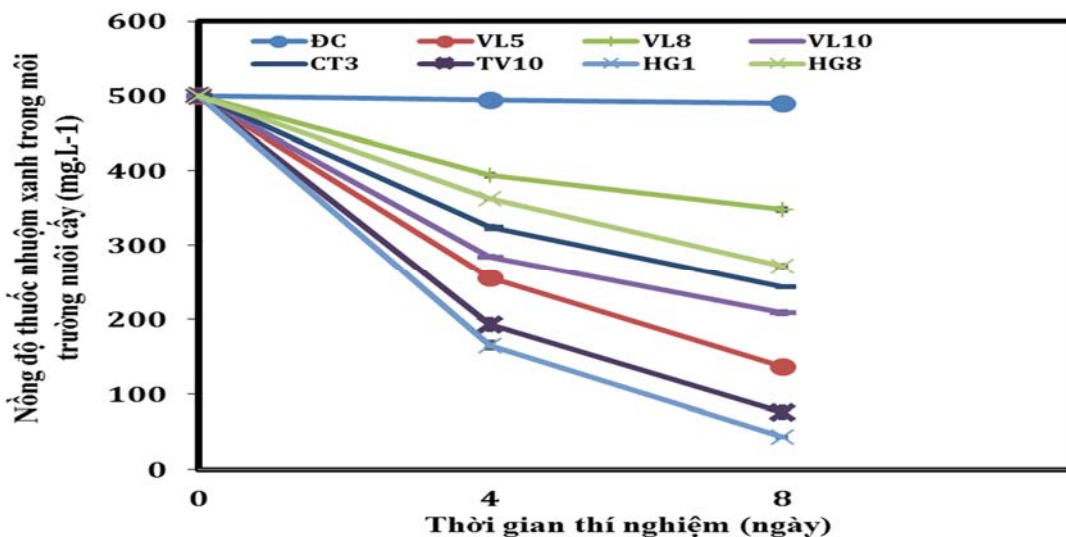
STT	Kí hiệu	Vùng loại màu thuốc nhuộm	
		Màu đen	Màu xanh
1	VL8	++++	++
2	VL13	++++	++++
3	HG1	++++	++++
4	HG14	++++	++++
5	TV5	++++	++++
6	TV13	++++	+++
7	TV14	++++	++++
8	VL10	+++	++++
9	CT3	+++	+++
10	CT11	+++	++++
11	HG2	++	++
12	HG8	++	++++
13	VL5	-	++++
14	VL12	-	++++
15	TV10	-	++++

*Ghi chú: Phân cấp các mức độ loại màu thuốc nhuộm như sau: -: không, ++: trung bình; +++: cao và ++++: hoàn toàn.

3.2.2 Định lượng khả năng loại màu thuốc nhuộm của các dòng nấm chọn lọc trong môi trường MT3 (Jonathan và Fasidi, 2001)

Kết quả đánh giá về khả năng loại màu hai loại thuốc nhuộm xanh và đen của 15 dòng nấm trong môi trường MT3 (Jonathan and Fasidi, 2001) bổ sung 500 mg.L⁻¹ thuốc nhuộm đen hoặc xanh cho thấy 15 dòng nấm thử nghiệm đều có khả năng loại màu thuốc nhuộm hiệu quả thông qua việc ghi nhận nồng độ thuốc nhuộm giảm dần theo thời gian nuôi cấy.

Kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng loại màu thuốc nhuộm xanh sau 8 ngày nuôi cấy của 15 dòng nấm định tính được trình bày trong Hình 3. Nhìn chung, tất cả các dòng nấm thử nghiệm đều có khả năng loại bỏ thuốc nhuộm màu xanh rất tốt, nồng độ thuốc nhuộm xanh phân hủy dao động từ 125-460 mg.L⁻¹ và đều khác biệt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng. Trong đó, dòng nấm HG1 có nồng độ thuốc nhuộm xanh còn lại trong môi trường nuôi cấy thấp nhất ở tất cả các thời điểm thu mẫu và chỉ còn 43 mg.L⁻¹ sau 8 ngày nuôi cấy. Tóm lại, mười lăm dòng nấm thử nghiệm đều cho khả năng loại màu thuốc nhuộm xanh tốt và dòng nấm HG1 thể hiện khả năng phân hủy cao nhất đối với thuốc nhuộm xanh (Hình 4).



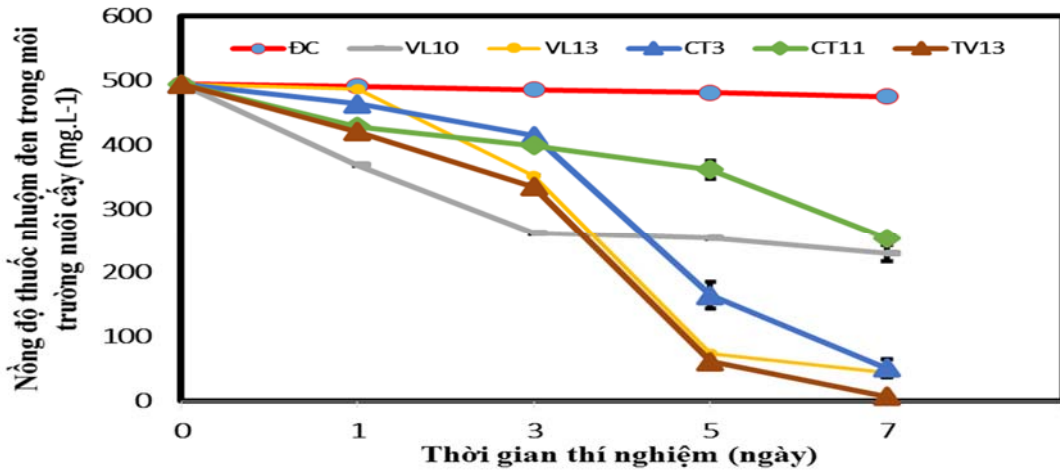
Hình 3: Khả năng loại màu thuốc nhuộm xanh của 7 dòng nấm tiêu biểu nhất trong tổng số 15 dòng thử nghiệm trong môi trường MT3 bổ sung 500 mg.L⁻¹ thuốc nhuộm xanh sau 8 ngày nuôi cấy (n=3, sai số chuẩn)



Hình 4: Khả năng loại màu hoàn toàn thuốc nhuộm xanh của dòng nấm HG1 sau 8 ngày nuôi cấy trong môi trường MT3 bổ sung 500 mg.L⁻¹ thuốc nhuộm xanh so với nghiệm thức đối chứng không chủng nấm

Đối với thí nghiệm loại màu thuốc nhuộm đen kết quả được trình bày ở Hình 5 cho thấy sau 7 ngày nuôi cấy tất cả 12 dòng nấm thử nghiệm đều có khả năng phân hủy thuốc nhuộm đen rất tốt, nồng độ thuốc nhuộm phân hủy dao động từ 240-490 mg.L⁻¹ và đều khác biệt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng. Tuy nhiên, ba dòng nấm CT3, VL13 và TV13 thể hiện khả năng

loại màu thuốc nhuộm đen tốt hơn so với các dòng nấm còn lại với nồng độ thuốc nhuộm đen trong môi trường nuôi cấy giảm mạnh ở giai đoạn 3 đến 7 ngày nuôi cấy. Trong đó, sau 7 ngày nuôi cấy, nồng độ thuốc nhuộm đen còn lại trong môi trường nuôi cấy của dòng TV13 thấp nhất tương ứng với 7 mg.L⁻¹ (Hình 6).



Hình 5: Khả năng loại màu thuốc nhuộm đen của 5 dòng nấm tiêu biểu nhất trong tổng số 12 dòng nấm thử nghiệm trong môi trường MT3 có bổ sung 500 mg.L⁻¹ thuốc nhuộm đen sau 7 ngày nuôi cấy (n=3, sai số chuẩn)

Kết quả nghiên cứu về khả năng loại màu thuốc nhuộm của các dòng nấm phân lập tương tự với kết quả nghiên cứu của Yesilada *et al.*, (2003) đối với loài *Pleurotus ostreatus* với 3 loại thuốc nhuộm đỏ, xanh và đen lần lượt 97, 89 và 84% ở nồng độ 264 mg.L⁻¹. Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của Kalmis *et al.*, (2008) trên hai loài nấm phân lập *Pleurotus ostreatus* MCC020 và MCC007 có khả năng loại màu thuốc nhuộm đen rất tốt ở nồng độ

1000 mg.L⁻¹ với tỷ lệ loại màu tương ứng với 83,6 và 81,8%. Ngoài ra, loài nấm *Aspergillus niger* đã được nhiều nghiên cứu chứng minh có khả năng sản xuất enzyme ngoại bào ligninase giúp phân hủy hợp chất cao phân tử lignin thông qua phản ứng oxy hóa nhằm chuyển 3,4 dimethoxybenzyl alcohol thành veratyldehyde dưới sự hiện diện của H₂O₂ (Jothimani and Prabakaran, 2003).



Hình 6: Khả năng loại màu thuốc nhuộm đen của dòng nấm TV13 sau 7 ngày nuôi cấy trong môi trường MT3 bổ sung 500 mg.L⁻¹ thuốc nhuộm đen so với nghiệm thức đối chứng không chủng nấm

3.3 Kết quả giải mã trình tự một đoạn gen 18S rRNA và định danh tên khoa học của hai dòng nấm có tiềm năng ứng dụng cao nhất bằng kỹ thuật sinh học phân tử

So sánh trình tự đoạn gen 18S rRNA với cơ sở dữ liệu trên ngân hàng gen thế giới bằng chương trình BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), kết quả cho thấy trình tự đoạn gen của cả hai dòng nấm HG1 và TV13 tương đồng với đoạn gen 18S rRNA của loài nấm *Marasmiellus palmivorus* với tính đồng hình 100% và độ bao phủ tương ứng lần lượt 100% và 95%. Như vậy, hai dòng nấm có khả năng loại màu thuốc nhuộm này đều thuộc chi *Marasmiellus* và được định danh là *Marasmiellus* sp. HG1 và *Marasmiellus* sp. TV13, xếp theo bậc phân loại sinh vật từ liên giới Eukaryota; giới

Fungi; phân giới Dikarya; ngành Basidiomycota; phân ngành Agaricomycotina; lớp Agaricomycetes; phân lớp Agaricomycetidae; bộ Agaricales; họ Omphalotaceae đến chi *Marasmiellus* (Bảng 3). Tuy nhiên, dựa vào thông tin tài liệu tham khảo của các nghiên cứu trước đây cho thấy chưa có nghiên cứu nào công bố loài nấm *Marasmiellus palmivorus* có khả năng loại màu thuốc nhuộm, duy nhất chỉ có nghiên cứu của Chenthamarakshan *et al.* (2017) chứng minh loài nấm *Marasmiellus palmivorus* sản xuất ra enzyme laccase và được ứng dụng vào rất nhiều lĩnh vực trong công nghiệp, nông nghiệp và môi trường. Do đó, nghiên cứu này bổ sung vào kiến thức về hai dòng nấm thuộc chi *Marasmiellus* trong tự nhiên có khả năng loại màu của thuốc nhuộm với hiệu quả cao.

Bảng 3: Tóm tắt kết quả định danh hai dòng nấm loại màu thuốc nhuộm HG1 và TV13

TT	Dòng	Nguồn gốc	Độ đồng hình (%)	Các dòng nấm trên cơ sở dữ liệu		Định danh
				Nấm	Số đăng kí	
1	HG1	Hậu Giang	100	<i>Marasmiellus palmivorus</i>	KR056289.1	<i>Marasmiellus</i> sp. HG1
2	TV13	Trà Vinh	100	<i>Marasmiellus palmivorus</i>	KR056289.1	<i>Marasmiellus</i> sp. TV13

4 KẾT LUẬN

Quả thể nấm được thu thập trên cây gỗ mục tại một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long như Cần Thơ, Hậu Giang, Trà Vinh và Vĩnh Long để phân lập và làm thuần các dòng nấm có khả năng loại màu thuốc nhuộm trong ngành dệt may. Đã phân lập được 54 dòng nấm từ gỗ mục. Trong đó, có 12

trong tổng số 54 dòng nấm thể hiện chức năng loại màu thuốc nhuộm đen và 15 trong tổng số 54 dòng nấm phân lập loại màu thuốc nhuộm xanh. Từ các dòng nấm trên đã chọn được 02 dòng nấm có khả năng loại màu thuốc nhuộm xanh và đen cao nhất lần lượt HG1 và TV13. Dòng nấm HG 1 được thu thập tại Hậu Giang có khả năng loại màu thuốc nhuộm xanh cao nhất sau 8 ngày nuôi cấy, nồng độ

thuốc nhuộm giảm còn 43 mg.L⁻¹ và dòng nấm TV13 thu thập tại Trà Vinh có khả năng loại màu thuốc nhuộm đen tốt nhất sau 7 ngày nuôi cấy, nồng độ thuốc nhuộm giảm còn 7 mg.L⁻¹ so với ban đầu 500 mg.L⁻¹. Kết quả giải mã trình tự đoạn gen 18S rRNA với cơ sở dữ liệu trên ngân hàng gen thế giới bằng chương trình BLAST cho thấy cả 02 dòng nấm HG1 và TV13 tương đồng với đoạn gen 18S rRNA của nấm *Marasmiellus palmivorus* với độ đồng hình 100% và độ bao phủ tương ứng 95% và 100%. Vì vậy, cả 02 dòng này thuộc chi *Marasmiellus* và được định danh là *Marasmiellus* sp. HG1 và *Marasmiellus* sp. TV13 và cả hai dòng nấm này có tiềm năng ứng dụng cao trong loại bỏ màu nước thải của các nhà máy dệt nhuộm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Binupriya, A., Sathishkumar, M., Swaminathan, K., Kuz, C. and Yun, S., 2008. Comparative studies on removal of Congo red by native and modified mycelial pellets of *Trametes versicolor* in various reactor modes. *Bioresource Technology*, 99(5): 1080-1088.
- Cao Hữu Trọng và Hoàng Thị Lĩnh, 2003. Hoá học thuốc nhuộm. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 193 trang.
- Châu Ngọc Diệp, 2010. Nghiên cứu lựa chọn điều kiện thích hợp đến khả năng sinh enzyme ngoại bào manganese peroxidase, phân hủy thuốc nhuộm từ chủng nấm *Aspergillus* sp. FBH11. Luận văn tốt nghiệp đại học. Trường Đại học Thái Nguyên.
- Chenthamarakshan, A., Parambayil, N., Miziriya, N., Soumya, P.S., Kiran, L.M.S., Anala, R., Dileep, A. and Nambisa, P., 2017. Optimization of laccase production from *Marasmiellus palmivorus* LA1 by Taguchi method of Design of experiments. *BMC Biotechnology*, 17:12.
- Deng, D., Guo, J. and Zeng, G., 2008. Decolorization of anthraquinone, triphenylmethane and azodyes by a new isolation *Bacillus cereus* DC 11q. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 62: 263-269.
- Dương Minh Lam và Trương Thị Chiên, 2013. Nghiên cứu một số đặc tính sinh học của chủng nấm *Trametes maxima* CPB30 sinh laccase ứng dụng trong loại bỏ màu nước ô nhiễm do thuốc nhuộm. Tạp chí Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội, 35: 477-483.
- Đặng Xuân Việt, 2007. Nghiên cứu phương pháp thích hợp để khử màu thuốc nhuộm hoạt tính trong nước thải dệt nhuộm. Luận án tiến sĩ kỹ thuật. Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội.
- Gams, W., Hoekstra, E.S. and Aptroot, A., 1998. CBS Course on Mycology. Centraalbureau voor Schimmelcultures, AG Baarn, the Netherlands.
- Ihrmark, K., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J. and Clemmensen, K.E., 2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region—evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 82:666-677.
- Jadhav, J.P., 2007. Decolorization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. *Chemosphere*, 68: 394-400.
- Jonathan, S.G. and Fasidi, I.O., 2001. Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of *Psathyrella atrombonata* (Pegler), a Nigeria edible mushroom. *Food Chemistry*, 72: 479-483.
- Jothimani, P. and Prabakaran, J., 2003. Dye factory effluent decolorization by fungal cultures under static condition. *Journal of Ecobiology*, 15: 255-260.
- Kalmis, E., Azbar, N. and Kalyoncu, F., 2008. Evaluation of two wild types of *P. ostreatus* isolated from nature for their ability to decolorize Benazol ZN textile dye in comparison to some commercial types of white rot fungi: *P. ostreatus*, *P. djamor*, *P. citrinopileatus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 54: 366-370.
- Koichi, H. and Kazunori, N., 2005. Decolorization of mixtures of different reactive textile dyes by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete sordida* and inhibitory effect of polyvinyl alcohol. *Chemosphere*, 59: 63-68.
- Kumaran, N.S. and Dharani, G., 2011. Decolorization of textile dyes by white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajor-caju*. *Journal of Applied Technology in Environmental Sanitation*, 1: 361-370.
- Kumud, K., Abraham, T.E., 2007. Biosorption of anionic textile dyes by nonviable biomass of fungi and yeast. *Bioresource Technology*, 98: 1704-1710.
- Khan, R., Bhawana, P. and Fulekar, M.H., 2013. Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review. *Review in Environmental Science and Biotechnology*, 12: 75-97.
- Martins, M.A., Lima, N., Silvestre, A.J. and Queiroz, M.J., 2003. Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes. *Chemosphere*, 52: 967-973.
- Robinson, T., McMullant, G., Marchant, R. and Nigam, P., 2001. Remediation of dye in textile effluent: a critical review on current treatment technology with proposed alternative. *Bioresource Technology*, 77: 247-255.
- Selvam, K., Swaminathan, K. and Kean, S.C., 2003. Decolorization of azo dyes and a dye industry effluent by a white-rot fungus *Thelephora* sp. *Bioresource Technology*, 88: 115-119.
- Trần Văn Nhân và Ngô Thị Nga, 2002. Công nghệ xử lý nước thải. Đại học Bách Khoa Hà Nội, 170 trang.
- Wang, M., Funabiki, K. and Matsui, M., 2003. Synthesis and properties of bis(hetary)azo dyes. *Dyes and Pigments*, 57: 77-86.

- Xueheng, Z., Hardin, I.R. and Huey, M.H., 2006. Biodegradation of a model azo disperse dye by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 57: 1-6.
- Yesilada, O., Asma, D., Cing, S., 2003. Decolourization of textile dyes by fungal pellets. *Process Biochemistry*, 38: 933-938.
- Yi, C.T., Jocelyn, J.L.Y., Jeffrey, P.O. and Yen, P.T., 2003. Decolourisation of azo dyes by white-rot fungi (WRF) isolated in Singapore. *Enzyme and Microbial Technology*, 33: 569-575.
- Zolinger, H., 1991. *Color chemistry: Syntheses, properties and application of organic dyes and pigments*, 2nd ed. Weinheim: VCH, 593 pp.
- Farah, M.D.C., Oliveira, G.A.R., Ferraz, E.R.A. and Cardoso, J.C., 2013. Textile dyes: Dyeing process and environment impact. In book: "Eco-Friendly Textile Dyeing and Fishshing", edited by Melih Günay, ISBN 978-953-51-0892-4, Published: January 16, 2013 under CC BY 3.0 license, 268 pp.