



DOI:10.22144/ctu.jvn.2018.177

## PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN MỘT SỐ DÒNG NẤM HÒA TAN LÂN TỪ NỀN ĐẤT TRỒNG LÚA KHÔ NGẬP XEN KẼ KẾT HỢP BÓN PHÂN HỮU CƠ

Trần Thi Phương Thu<sup>1</sup> và Nguyễn Khởi Nghĩa<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Học viên cao học thuộc Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Khởi Nghĩa (email: nknghia@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 12/05/2018

Ngày nhận bài sửa: 03/07/2018

Ngày duyệt đăng: 28/12/2018

### Title:

Isolation and selection of phosphate solubilizing fungi from rice soil applied with organic fertilizer and alternate wetting drying methodology of irrigation

### Từ khóa:

*Aspergillus tubingensis*, đất lúa, lân hòa tan, nấm hòa tan lân, *Penicillium funiculosum*, phân lập

### Keywords:

*Aspergillus tubingensis*, isolation, *Penicillium funiculosum*, phosphate solubilizing fungi, rice soil, soluble phosphate

### ABSTRACT

Phosphate is one of the major elements, strongly affecting on the agricultural production and phosphate solubilizing fungi plays a very important role in increasing the bioavailability of soil phosphates for plants. Aim of this study was to isolate and identify a number of phosphate solubilizing fungus from paddy rice soil applied only with organic fertilizer and with alternate wetting drying methodology of irrigation under net house conditions. NBRIP medium was used for isolation and evaluation of phosphate solubilizing ability. Soluble phosphate concentration was determined by a method of colorimetric determination of molybdate. Results showed that 37 phosphate solubilizing fungi were isolated from 7 soil samples. Among them, B1 and B10 solubilized phosphate up to 2104 mg.L<sup>-1</sup> và 2618 mg.L<sup>-1</sup> after 3 and 4 days of incubation, respectively. The optimum conditions for the B1 and B10 releasing soluble phosphate from Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> were at temperature, 25°C-35°C; initial pH, 5.0-7.0, respectively. These two strains had a good ability in phosphate solubilization from other forms of insoluble phosphorous source, AlPO<sub>4</sub> and FePO<sub>4</sub>. Basing on the ITS region, B1 and B10 strains were indentified relatively as *Penicillium funiculosum* B1 and *Aspergillus tubingensis* B10, respectively. Therefore, these two fungal strains hold an important role and great potential for biofertilizers to enhance soil fertility and promote plant growth.

### TÓM TẮT

Lân là một trong những nguyên tố chính quyết định năng suất cây trồng và nấm hòa tan lân đóng vai trò quan trọng trong gia tăng lượng lân hữu dụng cho cây trồng. Mục tiêu của nghiên cứu nhằm phân lập và định danh một số dòng nấm hòa tan lân cao từ nền đất lúa tưới nước ngập khô xen kẽ kết hợp bón phân hữu cơ ở nhà lưới. Môi trường NBRIP dùng để phân lập và đánh giá khả năng hòa tan lân. Lân hòa tan được xác định bằng phương pháp hiện màu molybdate. Kết quả cho thấy tổng cộng có 37 dòng nấm có khả năng hòa tan lân được phân lập từ 7 mẫu đất. Trong đó, hai dòng nấm ký hiệu B1 và B10 hòa tan lân lần lượt đạt 2104 mg.L<sup>-1</sup> và 2618 mg.L<sup>-1</sup> sau 3 và 4 ngày thí nghiệm. Hai dòng nấm này đều hòa tan lân tốt ở mức pH từ 5-7, nhiệt độ 25°C-35°C, độ mặn lên đến 0,5-1% NaCl và hòa tan tốt các dạng lân khó tan như AlPO<sub>4</sub> và FePO<sub>4</sub>. Kết quả định danh thông qua đoạn ITS cho thấy hai dòng nấm này được định danh khoa học lần lượt là *Penicillium funiculosum* B1 và *Aspergillus tubingensis* B10. Tóm lại, hai dòng nấm này có vai trò và tiềm năng quan trọng trong việc sản xuất chế phẩm vi sinh giúp gia tăng độ phì nhiêu đất, kích thích sinh trưởng cây trồng.

Trích dẫn: Trần Thi Phương Thu và Nguyễn Khởi Nghĩa, 2018. Phân lập và tuyển chọn một số dòng nấm hòa tan lân từ nền đất trồng lúa khô ngập xen kẽ kết hợp bón phân hữu cơ. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(9B): 23-33.

## 1 GIỚI THIỆU

Đạm (N), lân (P), và kali (K) là ba nguyên tố đa lượng trong đất được cây trồng sử dụng nhiều nhất. Trong ba nguyên tố này, P là nguyên tố ít di động và ít hữu dụng nhất cho cây trồng. Lượng P dễ tiêu tự nhiên trong môi trường đất thường rất thấp, phần lớn ở dạng đá, khoáng và quặng khó tan (Goldstein, 1994). Việc thiếu hụt P trong đất là một trong những nhân tố quan trọng hạn chế sự sinh trưởng của cây trồng. Vì vậy, việc bón P và tăng cường độ hòa tan của P khó tiêu là một trong những biện pháp quan trọng và cần thiết trong sản xuất nông nghiệp (Nguyễn Xuân Thành và *ctv.*, 2007). Tuy nhiên, phân lân khi bón vào đất lại dễ dàng bị kết tủa thành các dạng không hòa tan như:  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{FePO}_4$  và  $\text{AlPO}_4$  nên cây khó hấp thu (Omar, 1998). Các vi sinh vật trong đất, đặc biệt là nấm và vi khuẩn có vai trò quan trọng trong việc chuyển hóa và hòa tan P bất động trong đất. Kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy các vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* và *Enterobacter* có khả năng hòa tan lân mạnh nhất và hiệu quả nhất (Whitelaw *et al.*, 2000; Igual *et al.*, 2001; Wakelin *et al.*, 2004; Wani *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2011). Công bố của Nguyễn Hữu Hiệp và Hà Danh Đức (2009) cho thấy tổng cộng có 34 dòng vi khuẩn có khả năng hòa tan lân được phân lập từ đất trồng đậu phộng tại Trà Vinh. Nghiên cứu của Trần Thanh Phong (2012) cho thấy 9 trong tổng số 33 dòng vi khuẩn nội sinh trong rễ cây khóm được định danh là *Burkholderia tropica* và *Burkholderia tropicalis* có khả năng phân giải lân, cố định đạm, và tổng hợp IAA. Theo nghiên cứu của Ghosh *et al.* (2011), các dòng vi khuẩn *Citrobacter* sp., *Shigella* sp., và *Bacillus circulans* có khả năng hòa tan lân rất hiệu quả được phân lập từ vùng rễ cây cỏ khu vực gần biển. Halder *et al.* (1990) đã chứng minh được những acid hữu cơ được sản xuất từ vi khuẩn *Rhizobium leguminosarum* hòa tan một lượng lớn lân bất động trong đất. Bên cạnh vi khuẩn, nấm hòa tan lân đa dạng không kém về mặt di truyền, trong đó chi *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium* và *Penicillium* là những chi nấm phổ biến nhất có khả năng hòa tan lân cố định (Asea *et al.*, 1988; Whitelaw, 2000; Pradhan and Sukla, 2005; Chakraborty *et al.*, 2010; Chai *et al.*, 2011; Yasser *et al.*, 2014). Hoàng Dương Thu Hương (2015) đã phân lập và tuyển chọn được hai chủng nấm mốc hòa tan lân vô cơ từ đất rừng ngập mặn ở Thừa Thiên Huế và được định danh như *Aspergillus oryzae* M33 và *Aspergillus japonicus* M72.

Hiện nay, Đồng bằng sông Cửu Long là vùng có diện tích đất sản xuất nông nghiệp đứng đầu cả nước. Việc nông dân sử dụng một lượng lớn phân

hóa học trong đó có phân lân để gia tăng năng suất cây trồng dẫn đến hệ quả là lượng lân bị cố định trong đất rất lớn. Tuy nhiên, hầu như chưa có nghiên cứu về phân lập và ứng dụng các dòng nấm có khả năng hòa tan lân cho cây trồng trong khu vực, mặc dù hiệu quả của nấm trong việc phân giải lân trong đất, giúp tăng sinh trưởng và năng suất cây trồng đồng thời giảm lượng phân hóa học được chứng minh là rất cao vì nấm có sinh khối lớn và có khả năng phát triển về sợi nấm rất nhanh. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu phân lập và định danh một số dòng nấm có khả năng hòa tan lân từ nền đất trồng lúa áp dụng biện pháp tưới nước ngập khô xen kẽ kết hợp với bón phân hữu cơ.

## 2 PHƯƠNG PHÁP VÀ NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

### 2.1 Thu và chuẩn bị mẫu đất

Bảy mẫu đất được thu từ 7 lần lặp lại của thí nghiệm trồng lúa liên tục 2 năm (mỗi năm 3 vụ) áp dụng biện pháp tưới nước ngập khô xen kẽ kết hợp với việc chỉ bón phân hữu cơ (hỗn hợp phân hữu cơ tươi gồm: lông vũ, phân bò, bã cà phê, vỏ trứng và xỉ than tổ ong; liều lượng phân hữu cơ đã bón là 10 tấn/ha) dưới điều kiện nhà lưới Bộ môn Khoa học Đất – Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng – Trường Đại học Cần Thơ. Mẫu đất được thu ở độ sâu từ 0 đến 20 cm từ lớp đất mặt sau đó được trộn đều và đặt ở tủ lạnh 4°C trước khi dùng để phân lập nấm hòa tan lân.

### 2.2 Phân lập các dòng nấm có khả năng hòa tan lân trên môi trường chuyên biệt NBRIP

Tiến hành cân 10 g mỗi mẫu đất và cho vào chai thủy tinh 250 mL, tiếp đó thêm vào 90 mL dung dịch buffer phosphate (23,99g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  và 15,59g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  trong 1 L nước khử khoáng) đã khử trùng. Các chai nắp xanh được lắc trên máy lắc ngang với tốc độ 150 vòng/phút trong 1 giờ. Sau đó tiến hành pha loãng dịch trích nấm với hệ số pha loãng 10 ở nồng độ  $10^{-1}$ , hút 50  $\mu\text{L}$  dịch trích nấm ở nồng độ pha loãng  $10^{-1}$  trải đều trên đĩa petri chứa môi trường NBRIP đặc (Nautiyal, 1999). Thành phần của 1 L môi trường NBRIP gồm: 10 g D-Glucose; 5g  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ; 5g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,25g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,2g KCl; 0,1g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  trong 1000 mL nước khử khoáng và bổ sung thêm chất kháng khuẩn streptomycin (100 mg/L). Các đĩa agar nuôi cấy được quấn parafilm lại để tránh nhiễm mẫu và được đặt trong tủ úm ở 30°C. Quan sát sự phát triển của khuẩn lạc nấm trên đĩa nuôi cấy, đặc biệt quan sát vòng sáng bao trong suốt bao xung quanh khuẩn lạc nấm (gọi là vòng Halo, vòng thể hiện dương tính khả năng có thể hòa tan lân của khuẩn lạc nấm trên môi trường nuôi cấy). Những khuẩn lạc nấm có xuất hiện vòng halo được thu thập và được cấy chuyển sang

môi trường NBRIP mới. Công đoạn cấy chuyển và tách rỗng nấm được thực hiện liên tục trong 5 lần.

### 2.3 Đánh giá khả năng hòa tan lân của các dòng nấm phân lập trong môi trường NBRIP

#### 2.3.1 Chuẩn bị nguồn nấm

Trước khi tiến hành bố trí thí nghiệm, nấm được nuôi cấy riêng biệt trên môi trường NBRIP agar trong 3 ngày ở điều kiện phòng thí nghiệm để các dòng nấm này gia tăng sinh khối tốt chuẩn bị làm nguồn thí nghiệm.

#### 2.3.2 Bố trí thí nghiệm

Dùng Pasteur pipet có đường kính 0,6 cm đã tiệt trùng cất 3 khối agar có sợi nấm đang phát triển tốt đã chuẩn bị ở mục 2.3.1 và cho 3 khối agar này vào bình tam giác 100 mL chứa sẵn 30 mL môi trường NBRIP lỏng đã khử trùng. Mỗi dòng nấm được bố trí với 3 lần lặp lại tương ứng với 3 bình tam giác. Nghiệm thức đối chứng được bố trí tương tự nhưng không chủng nấm vào. Các bình tam giác được đặt trên máy lắc tròn với tốc độ 120 vòng/phút, trong tối, ở điều kiện nhiệt độ phòng, trong thời gian 11 ngày. Hàm lượng lân hòa tan trong môi trường nuôi cấy lỏng được thu thập theo các ngày 1, 3, 5, 7, 9 và 11 ngày sau khi nuôi cấy. Hàm lượng lân hòa tan bởi nấm trong môi trường nuôi cấy được xác định bằng phương pháp hiện màu Molybdate. Mẫu được đo trên máy so màu quang phổ (Spectrometer Thermo Scientific, Multiskan Spectrum) ở bước sóng 880 nm.

### 2.4 Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường nuôi cấy lên khả năng hòa tan lân của dòng nấm B1 và B10 hòa tan lân tốt nhất

Dòng nấm B1 và B10 cho kết quả hòa tan lân tốt nhất trong tổng số 37 dòng nấm phân lập. Khả năng hòa tan lân của dòng nấm B1 và B10 lần lượt là 2104 mg.L<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> và 2618 mg.L<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> sau 3 và 4 ngày bố trí thí nghiệm trong môi trường NBRIP lỏng.

#### 2.4.1 Chuẩn bị nguồn nấm

Qui trình chuẩn bị nguồn nấm cho hai dòng B1 và B10 để bố trí thí nghiệm được thực hiện tương tự ở mục 2.3.1.

#### 2.4.2 Ảnh hưởng của pH môi trường

Dùng Pasteur pipet có đường kính 0,6 cm đã tiệt trùng để cất khối agar có sợi nấm đang phát triển tốt đã chuẩn bị sẵn ở mục 2.4.1 và cho 3 khối agar chứa nấm vào bình tam giác 100 ml chứa sẵn 30 mL môi trường NBRIP lỏng đã khử trùng và được hiệu chỉnh về 4 mức pH môi trường khác nhau tương ứng với 4 nghiệm thức thí nghiệm gồm: 3, 5, 7 và 9. Mỗi nghiệm thức có 3 lặp lại tương ứng với 3 bình tam giác. Nghiệm thức đối chứng tương ứng với từng

mức pH môi trường khác nhau được thực hiện tương tự nhưng không chủng nấm vào. Các bình tam giác được đặt trên máy lắc tròn với tốc độ 120 vòng/phút, trong tối và ở điều kiện môi trường của phòng thí nghiệm. Hàm lượng lân hòa tan trong môi trường nuôi cấy được xác định sau 1, 3, 5, 7 ngày bố trí thí nghiệm. Phân tích lân hòa tan trong môi trường nuôi cấy lỏng bằng phương pháp hiện màu Molybdate (như trong mục 2.3.2).

#### 2.4.3 Ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl

Toàn bộ qui trình và cách bố trí thí nghiệm được thực hiện tương tự như thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của pH lên khả năng hòa tan lân của 2 dòng nấm B1 và B10 ở mục 2.4.2. Tuy nhiên, môi trường NBRIP lỏng trong thí nghiệm này có bổ sung 5 nồng độ NaCl khác nhau: 0; 0,15; 0,3; 0,5 và 1%. pH môi trường NBRIP nuôi cấy được hiệu chỉnh dựa vào kết quả thí nghiệm đánh giá pH môi trường ở mục 2.4.2. Hàm lượng lân hòa tan trong môi trường nuôi cấy được xác định sau 1, 3, 5 và 7 ngày bố trí thí nghiệm. Phân tích lân hòa tan trong môi trường nuôi cấy lỏng bằng phương pháp hiện màu Molybdate (như trong mục 2.3.2).

#### 2.4.4 Ảnh hưởng của nhiệt độ

Toàn bộ qui trình và cách bố trí thí nghiệm được thực hiện tương tự như thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của pH lên khả năng hòa tan lân của 2 dòng nấm B1 và B10 ở mục 2.4.2. Tuy nhiên, thí nghiệm này được bố trí ở 3 mức nhiệt độ khác nhau: 25°C, 35°C và 45°C. Môi trường NBRIP lỏng được hiệu chỉnh dựa vào kết quả thí nghiệm đánh giá pH ở mục 2.4.2 và nồng độ muối ở mục 2.4.3. Hàm lượng lân hòa tan trong môi trường nuôi cấy được xác định sau 1, 3, 5 và 7 ngày bố trí thí nghiệm. Phân tích lân hòa tan trong môi trường nuôi cấy lỏng bằng phương pháp hiện màu Molybdate (như trong mục 2.3.2).

#### 2.4.5 Đánh giá khả năng hòa tan hai dạng lân khó tan khác (FePO<sub>4</sub> và AlPO<sub>4</sub>)

Toàn bộ qui trình và cách bố trí thí nghiệm được thực hiện tương tự như thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của pH lên khả năng hòa tan lân của 2 dòng nấm B1 và B10 ở mục 2.4.2. Tuy nhiên, môi trường NBRIP lỏng trong thí nghiệm này được bố trí với 3 dạng lân khác nhau: Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, FePO<sub>4</sub> và AlPO<sub>4</sub>. Môi trường NBRIP lỏng chứa 3 dạng lân khác nhau được hiệu chỉnh dựa vào kết quả thí nghiệm đánh giá pH ở mục 2.4.2, nồng độ muối ở mục 2.4.3 và nhiệt độ ở mục 2.4.4. Hàm lượng lân hòa tan trong môi trường nuôi cấy được xác định sau 1, 3, 5 và 7 ngày bố trí thí nghiệm. Phân tích lân hòa tan trong môi trường nuôi cấy lỏng bằng phương pháp hiện màu Molybdate (như trong mục 2.3.2).

**2.5 Định danh 2 dòng nấm B1 và B10 có khả năng hòa tan lân cao nhất bằng phương pháp giải trình tự đoạn ITS**

DNA của 2 dòng nấm B1 và B10 cho khả năng hòa tan lân cao nhất được tách chiết bằng cách sử dụng CTAB 3% theo phương pháp của Ihrmark *et al.* (2012). Sau đó, sản phẩm trích DNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi tổng quát ITS1F/ITS4R (Gardes and Burns, 1993) với trình tự nucleotide như sau: ITS1F: 5' CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA 3' và ITS4R: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3' nhắm vào đoạn ITS. Các bước trong phản ứng PCR như sau: bước 1: 94°C trong 5 phút; bước 2: 94°C trong 1 phút; bước 3: 55°C trong 1 phút; bước 4: 72°C trong 2 phút; bước 5: lặp lại bước 2 thêm 34 chu kỳ; bước 6: 72°C trong 7 phút và bước 7: 4°C trong thời gian không xác định. Thành phần của một phản ứng PCR với tổng thể tích 25 µL như sau: 12,5 µL Go Taq Green Master Mix, 0,5 µL mồi xuôi (10 µM), 0,5 µL mồi ngược (10 µM), 10,5 µL nước không chứa DNA và 1 µL DNA tinh sạch và giải trình tự. Trình tự ADN của đoạn ITS được so sánh với cơ sở dữ liệu của trung tâm quốc gia về thông tin công nghệ sinh học (National Center for Biotechnology Information: NCBI) bằng BlastN ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) để so sánh mức

độ tương đồng của đoạn ITS của nấm phân lập với gen tương ứng của các nấm hiện có trong cơ sở dữ liệu.

**2.6 Phương pháp xử lý số liệu**

Số liệu thí nghiệm được tổng hợp, tính toán bằng phần mềm Excel và kiểm định thống kê ANOVA bằng phần mềm Minitab 16.2.

**3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1 Kết quả phân lập các dòng nấm có khả năng hòa tan lân từ nền đất trồng lúa áp dụng biện pháp tưới nước ngập khô xen kẽ kết hợp bón phân hữu cơ**

Kết quả phân lập nấm có khả năng hòa tan lân từ 7 mẫu đất lúa áp dụng biện pháp tưới nước ngập khô xen kẽ kết hợp với bón phân hữu cơ trong nhà lưới Bộ môn Khoa học Đất – Khoa Nông Nghiệp và Sinh học Ứng dụng – Trường Đại học Cần Thơ cho thấy tổng cộng có 37 dòng nấm có khả năng hòa tan lân thông qua việc thể hiện vòng halo bên ngoài khuẩn lạc trên môi trường NBRIP được phân lập (Bảng 1). Các dòng nấm phân lập này đều thuộc các chi nấm *Aspergillus* và *Penicillium*. Tất cả các dòng nấm này được trồng trên đĩa petri và ống nghiệm chứa môi trường PDA.

**Bảng 1: Các dòng nấm hòa tan lân được phân lập từ 7 mẫu đất lúa**

Chi nấm	Mẫu đất							Tổng Số dòng nấm
	1	2	3	4	5	6	7	
<i>Aspergillus</i>	2	0	1	1	2	4	0	10
<i>Penicillium</i>	3	1	6	3	4	8	2	27
Tổng số dòng nấm	5	1	7	4	6	12	2	37

**3.2 Khả năng hòa tan lân của 37 dòng nấm phân lập**

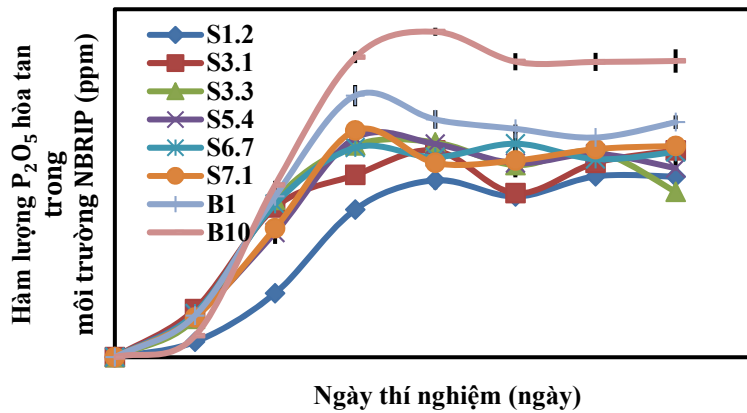
Kết quả đánh giá về khả năng hòa tan lân của 37 dòng nấm phân lập trong môi trường NBRIP lỏng sau 8 ngày nuôi cấy cho thấy các dòng nấm phân lập có khả năng hòa tan lân dao động từ 1300 mg.L<sup>-1</sup> đến 2200 mg.L<sup>-1</sup>. Trong đó, 8 dòng nấm ký hiệu S1.2, S3.1, S3.3, S5.4, S6.7, S7.1, B1 và B10 thể hiện khả năng hòa tan lân cao nhất sau 3 và 4 ngày nuôi cấy và dao động từ 1100 mg.L<sup>-1</sup> đến 2600 mg.L<sup>-1</sup> (Hình 1). Khả năng hòa tan lân của 8 dòng nấm tuyển chọn khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5% (p<0,05) khi so sánh với nhau. Tám dòng nấm thử nghiệm thể hiện khả năng hòa tan lân nhanh và cao nhất trong giai đoạn 0-4 ngày nuôi cấy, đạt ngưỡng cao nhất ở thời điểm 3-4 ngày nuôi cấy và sau đó giảm dần theo thời gian thí nghiệm. Dòng nấm ký hiệu B10 là dòng hòa tan lân cao nhất trong tổng số 8 dòng nấm tuyển chọn, khả năng hòa tan lân cao nhất đạt 2618 mg.L<sup>-1</sup> sau 4 ngày thí nghiệm,

kể đến là dòng nấm phân lập B1 có khả năng hòa tan lân cao nhất đạt 2104 mg.L<sup>-1</sup> sau 3 ngày nuôi cấy. Trong khi 6 dòng nấm còn lại hòa tan lân cao nhất vào thời điểm 3 ngày nuôi cấy và giao động trong khoảng từ 1100 mg.L<sup>-1</sup> đến 2100 mg.L<sup>-1</sup>. Do đó, 2 dòng nấm B1 và B10 này được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo. Kết quả hòa tan lân Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> của 2 dòng nấm B1 và B10 cao hơn so với một số dòng nấm phân lập từ các kết quả nghiên cứu trước đây. Điển hình như nghiên cứu của Ruangsanka (2014) cho thấy dòng nấm *Penicillium oxalicum* phân lập từ vùng rễ cây măng tây có khả năng hòa tan được 556 mg.L<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> từ dạng lân Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> khó tan trong môi trường NBRIP sau 4 ngày thí nghiệm. Iman (2008) đã đánh giá hiệu quả của hai dòng nấm phân lập gồm *Penicillium italicum* và *Aspergillus niger* và kết quả cho thấy hai dòng nấm này đã hoàn tan lân vô cơ và lần lượt đạt 275 và 490 µg .mL<sup>-1</sup> sau 7 ngày thí nghiệm. Tuy nhiên, khả năng hòa tan lân của hai dòng nấm B1 và B10 lại tương đương với kết quả



nghiên cứu của Hoàng Dương Thu Hương (2015) đã tiến hành phân lập và tuyển chọn chủng nấm mốc hòa tan lân vô cơ từ đất rừng ngập mặn ở Thừa Thiên Huế và kết quả đã phân lập được 2 chủng nấm mốc

ký hiệu M33 và M72 có khả năng hòa tan lân tốt nhất lần lượt đạt 2,07 mg/mL và 2,61 mg/mL sau 5 và 7 ngày thí nghiệm.



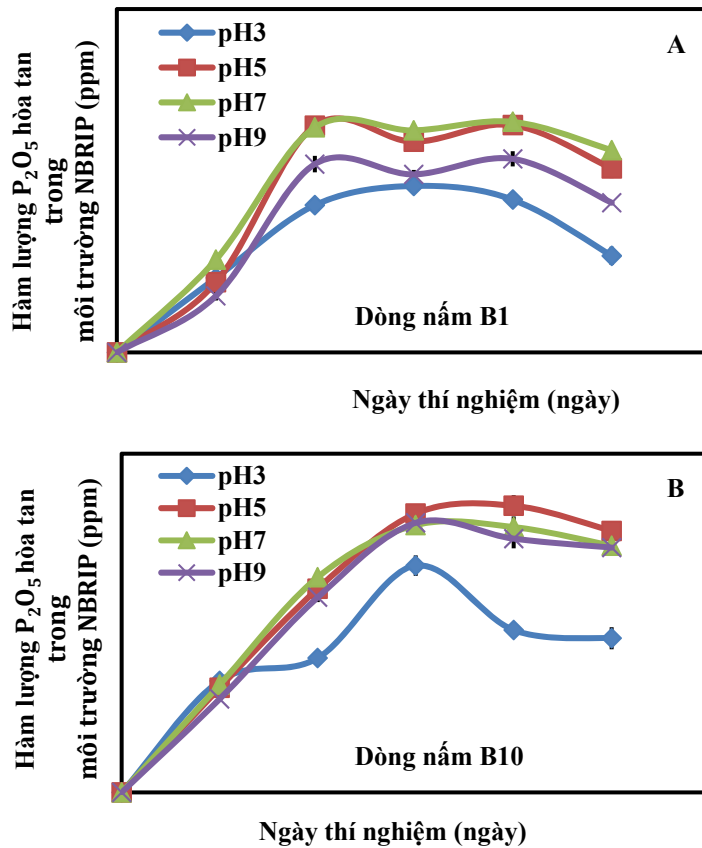
**Hình 1: Diễn biến hàm lượng lân hòa tan trong môi trường NBRIP lỏng bởi 8 dòng nấm tuyển chọn (n = 3, độ lệch chuẩn)**

### 3.3 Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường lên khả năng hòa tan lân của 2 dòng nấm B1 và B10

#### 3.3.1 Ảnh hưởng của pH môi trường

Khả năng hòa tan lân của hai dòng nấm B1 và B10 trong môi trường NBRIP lỏng ở các mức pH khác nhau trong 10 ngày nuôi cấy được trình bày trong Hình 2. Nhìn chung, hàm lượng lân hòa tan bởi dòng nấm B1 và B10 trong môi trường nuôi cấy có các mức pH khác nhau khác biệt thống kê ( $p < 0,05$ ) khi so sánh với nhau ở từng thời điểm thu mẫu. Đối với dòng nấm B1, ở tất cả các nghiệm thức có pH khác nhau, hàm lượng lân hòa tan đều tăng nhanh ở giai đoạn 0-3 ngày nuôi cấy, đạt cao nhất ở ngày 3 và sau đó có xu hướng giảm nhẹ theo thời gian thí nghiệm. Hai nghiệm thức pH 5 và pH 7 có hàm lượng lân hòa tan cao nhất ở tất cả các thời điểm thu mẫu và cao hơn hai nghiệm thức còn lại (pH 3 và pH 9), tuy nhiên, không khác biệt nhau khi so sánh với nhau ( $p > 0,05$ ). Nghiệm thức pH 3 cho khả năng hòa tan lân thấp nhất ở tất cả các thời điểm thu mẫu. Vào thời điểm 3 ngày nuôi cấy ở hai nghiệm thức pH 5 và pH 7 dòng nấm B1 hòa tan lân cao nhất lần lượt đạt  $1849 \text{ mg.L}^{-1} \text{ P}_2\text{O}_5$  và  $1836 \text{ mg.L}^{-1} \text{ P}_2\text{O}_5$ . Đối với dòng nấm B10, ở tất cả các nghiệm thức có pH khác nhau, hàm lượng lân hòa tan đều tăng nhanh ở giai đoạn 0-6 ngày nuôi cấy, đạt cao nhất ở ngày 6 và sau đó có xu hướng giảm nhẹ theo thời gian thí nghiệm. Ba nghiệm thức pH 5, pH 7 và pH

9 có hàm lượng lân hòa tan cao nhất ở tất cả các thời điểm thu mẫu và cao hơn so với nghiệm thức còn lại (pH 3), tuy nhiên, không khác biệt nhau khi so sánh với nhau ( $p > 0,05$ ). Nghiệm thức pH 3 cho khả năng hòa tan lân thấp nhất ở tất cả các thời điểm thu mẫu. Vào thời điểm 6 ngày nuôi cấy ở ba nghiệm thức pH 5, pH 7 và pH 9 dòng nấm B10 hòa tan lân cao nhất lần lượt đạt  $2305 \text{ mg.L}^{-1} \text{ P}_2\text{O}_5$ ,  $2209 \text{ mg.L}^{-1} \text{ P}_2\text{O}_5$  và  $2229 \text{ mg.L}^{-1} \text{ P}_2\text{O}_5$ . Như vậy, điều kiện pH môi trường tối ưu cho hai dòng nấm hòa tan lân B1 và B10 hòa tan lân tốt nhất ở ngưỡng pH 5-7. Kết quả này cũng tương tự kết quả nghiên cứu của Phạm Thị Ngọc Lan và Hoàng Dương Thu Hương (2014) cho thấy pH tối ưu cho hai dòng nấm *Aspergillus* sp. M33 và *Aspergillus* sp. M72 được phân lập từ đất vùng rễ của cây Giá (Chá) và cây đước sống ở đất ngập mặn Thừa Thiên Huế phân giải phosphate cao nhất ở pH từ 5,5-7. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu của Trần Thị Xuân Phương và ctv. (2017) cho thấy điều kiện pH 7-7,5 là tối ưu nhất cho sinh trưởng, phát triển và phân giải lân của 3 chủng nấm *Aspergillus* sp. HX11, TV21 và TD21 phân lập từ đất trồng rau màu. Tác giả Phạm Thị Ngọc Lan và Trần Thị Thanh Nhân (2008) cho thấy khả năng hòa tan lân cao nhất của hai chủng nấm mốc M8 và M24 phân lập từ đất trồng hoa màu ở tỉnh Thừa Thiên Huế ở môi trường có pH 6. Như vậy, đa số các chủng nấm hòa tan lân thường sinh trưởng, phát triển và hòa tan lân cao nhất ở môi trường có pH acid nhẹ, trung tính và hơi kiềm.

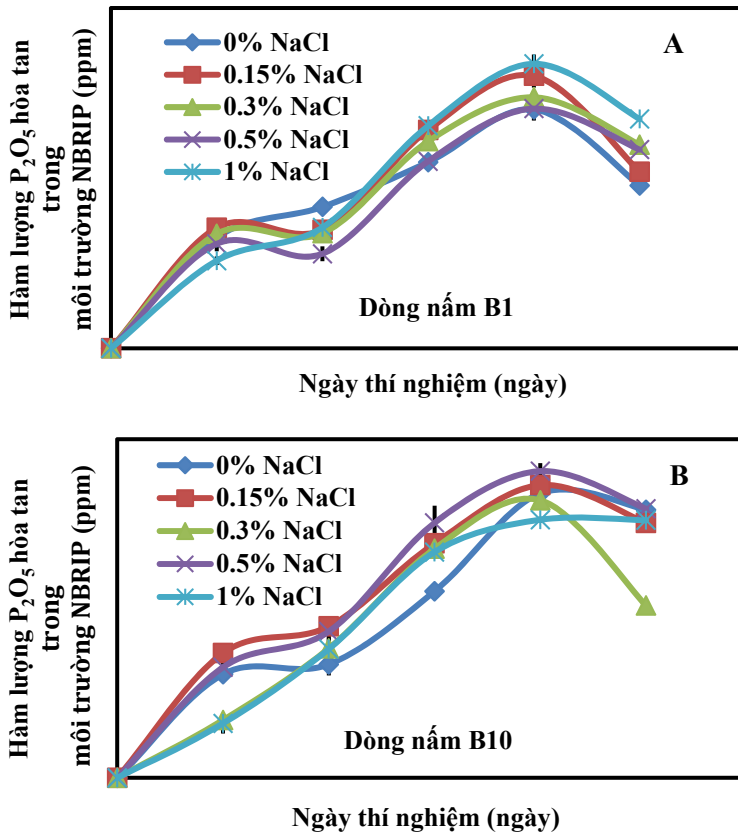


**Hình 2: Diễn biến hàm lượng lân hòa tan bởi dòng nấm B1 (A) và B10 (B) trong môi trường NBRIP lỏng ở các mức pH khác nhau sau 10 ngày nuôi cấy (n = 3, độ lệch chuẩn)**

3.3.2 Ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của các nồng độ muối NaCl khác nhau lên khả năng hòa tan lân của 2 dòng nấm B1 và B10 trong môi trường NBRIP lỏng trong 9 ngày nuôi cấy được trình bày ở Hình 3. Kết quả cho thấy trong dãy nồng độ muối khác nhau từ 0 - 1%, 2 dòng nấm B1 và B10 thể hiện khả năng hòa tan lân khác nhau. Hàm lượng lân hòa tan tăng liên tục ở các nghiệm thức trong giai đoạn từ 0-7 ngày, đạt cao nhất ở ngày 7 và sau đó giảm mạnh. Dòng nấm B1 có khả năng chịu được nồng độ muối NaCl của môi trường nuôi cấy lên đến 1% và ở nghiệm thức này dòng nấm B1 hoàn tan lân cao hơn so với các nghiệm thức khác ở một số thời điểm thu mẫu. Riêng dòng nấm B10, có khả năng chịu được nồng độ muối NaCl của môi trường nuôi cấy lên đến

0,5%. Ở một số thời điểm thu mẫu, hàm lượng lân hoà tan bởi dòng B10 ở nghiệm thức NaCl 0,5% cao nhất, mặc dù không khác biệt với một số nghiệm thức có nồng độ NaCl khác. Như vậy, kết quả này cho thấy khả năng chịu mặn NaCl của 2 dòng nấm B1 và B10 phân lập là khá cao và không giống nhau. Kết quả này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu của Phạm Thị Ngọc Lan và Hoàng Dương Thu Hương (2014) cho thấy dòng nấm *Aspergillus* sp. M33 hòa tan lân cao nhất ở nồng độ NaCl nằm trong dãy 5-15‰, trong khi dòng nấm *Aspergillus* sp. M72 hòa tan lân cao nhất ở nồng độ NaCl nằm trong dãy 5-10‰. Như vậy, 2 dòng nấm B1 và B10 phân lập trong nghiên cứu này có thể được dùng trong canh tác lúa trên cả nền đất nhiễm mặn giúp cung cấp lượng lân hữu dụng vốn đã bị giữ chặt trong keo đất cho cây lúa sinh trưởng và phát triển tốt.

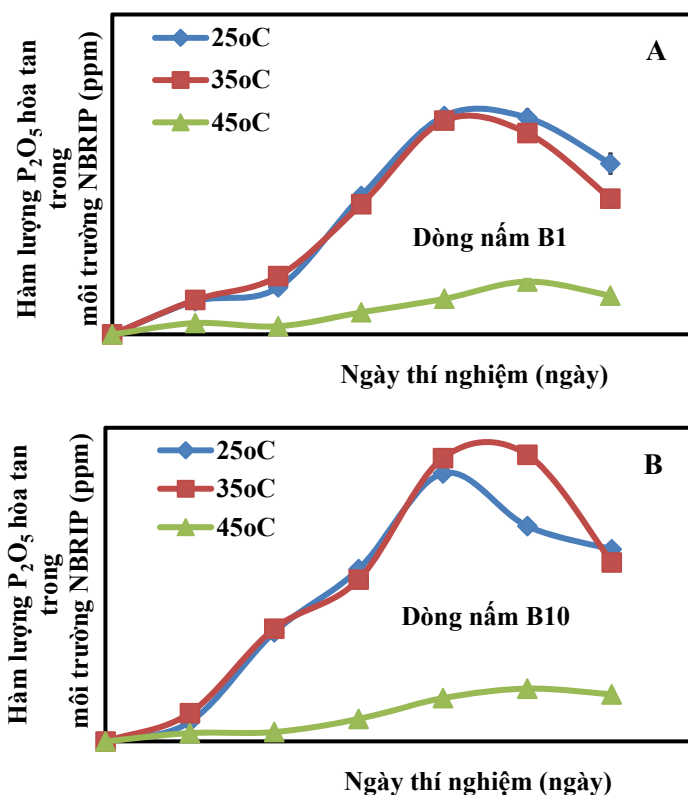


**Hình 3: Diễn biến hàm lượng lân hòa tan bởi dòng nấm B1 (A) và B10 (B) trong môi trường NBRIP lỏng ở các nồng độ mặn khác nhau sau 9 ngày nuôi cấy (n = 3, độ lệch chuẩn)**

**3.3.3 Ảnh hưởng của nhiệt độ**

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các mức nhiệt độ thí nghiệm khác nhau lên khả năng hòa tan lân của 2 dòng nấm B1 và B10 trong môi trường NBRIP lỏng trong 11 ngày nuôi cấy được trình bày trong Hình 4. Nhìn chung, cả hai dòng nấm thử nghiệm có cùng chung xu hướng về kết quả thí nghiệm và diễn biến hàm lượng lân hòa tan trong môi trường nuôi cấy lỏng. Hàm lượng lân hòa tan ở tất cả các nghiệm có xu hướng tăng nhanh ở giai đoạn 0-7 ngày nuôi cấy, đạt cao nhất ở ngày 7 và sau đó giảm dần theo thời gian thí nghiệm. Tuy nhiên, hàm lượng lân hòa tan trong môi trường nuôi cấy bởi 2 dòng nấm B1 và B10 trong thí nghiệm nhiệt độ này thấp hơn rất nhiều so với các thí nghiệm khác là do bình tam giác chứa mẫu không được lắc trên máy lắc mà được để yên ở trong tủ ủ với mức nhiệt độ tương thích. Cả hai dòng nấm thử nghiệm, hai nghiệm thức có nhiệt

độ nuôi cấy 25°C và 35°C không khác biệt thống kê ở hầu hết tất cả thời điểm khi so sánh hàm lượng lân hòa tan trong môi trường nuôi cấy lỏng và cả hai nghiệm thức này có hàm lượng lân hòa tan cao hơn và khác biệt thống kê ( $p < 0,05$ ) khi so sánh với nghiệm thức có nhiệt độ nuôi cấy 45°C. Hàm lượng lân hòa tan bởi hai dòng nấm B1 và B10 trong môi trường nuôi cấy lỏng ở nghiệm thức nhiệt độ nuôi cấy 45°C rất thấp ở tất cả thời điểm thu mẫu. Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu của Trần Thị Xuân Phương và ctv. (2017) cho thấy nhiệt độ thích hợp cho sinh trưởng và phát triển của chủng *Aspergillus* sp. TD21 là 30°C, hai chủng *Aspergillus* sp. HX11 và TV21 là 35°C. Ngoài ra, nghiên cứu của Phạm Thanh Hà và ctv. (2003) cho thấy nhiệt độ thích hợp cho quá trình phân giải phosphate của các chủng vi sinh vật dao động trong khoảng 20°C-40°C.



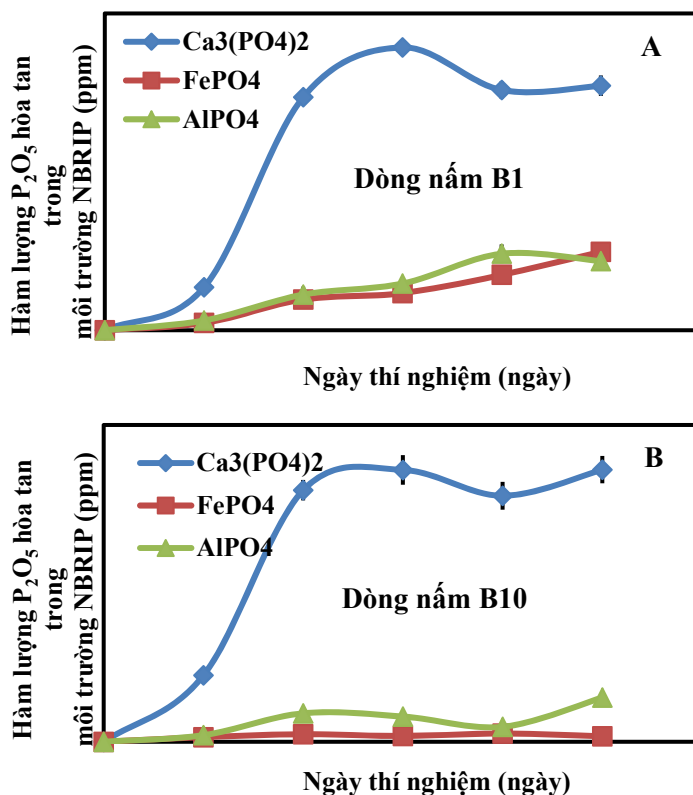
**Hình 4: Diễn biến hàm lượng lân hòa tan bởi dòng nấm B1 (A) và B10 (B) trong môi trường NBRIP lỏng ở các mức nhiệt độ khác nhau sau 11 ngày nuôi cấy (n = 3, độ lệch chuẩn)**

3.3.4 Đánh giá khả năng hòa tan lân từ các dạng lân khó tan  $FePO_4$  và  $AlPO_4$

Kết quả khảo sát khả năng hòa tan lân bởi hai dòng nấm B1 và B10 trong môi trường NBRIP lỏng với 3 dạng lân khó tan khác nhau gồm:  $Ca_3(PO_4)_2$ ,  $FePO_4$  và  $AlPO_4$  sau 10 ngày nuôi cấy được trình bày trong Hình 5. Kết quả cho thấy ở nghiệm thức môi trường NBRIP chứa lân khó tan dạng  $Ca_3(PO_4)_2$ , hàm lượng lân hòa tan trong môi trường nuôi cấy của 2 dòng nấm B1 và B10 đạt cao nhất lần lượt là 1716 mg/L  $P_2O_5$  và 2499,5 mg/L  $P_2O_5$  sau 5 ngày nuôi cấy và cao hơn rất nhiều so với hai nghiệm thức môi trường NBRIP bổ sung hai dạng lân khó tan  $FePO_4$  và  $AlPO_4$ . Ở nghiệm thức chứa  $AlPO_4$ , hàm lượng lân hòa tan trong môi trường nuôi cấy của 2 dòng nấm B1 và B10 đạt cao nhất lần lượt 279,5 mg/L  $P_2O_5$  và 676,2 mg/L  $P_2O_5$  sau 10 và 8 ngày nuôi cấy. Trong khi đó ở nghiệm thức chứa  $FePO_4$ ,

2 dòng nấm B1 và B10 hòa tan cao nhất lần lượt đạt 52,3 mg/L  $P_2O_5$  và 692 mg/L  $P_2O_5$  sau 8 và 10 ngày nuôi cấy. Kết quả này cho thấy khả năng hòa tan lân bởi 2 dòng nấm B1 và B10 với 3 dạng lân khó tan được xếp theo thứ tự như sau:  $Ca_3(PO_4)_2 > AlPO_4 > FePO_4$ . Dòng nấm B10 luôn cho khả năng hòa tan lân cao hơn so với dòng B1 khi so sánh với nhau trong cùng 1 nghiệm thức có chứa nguồn lân khó tan giống nhau ( $Ca_3(PO_4)_2$ ,  $AlPO_4$  và  $FePO_4$ ). Mặc dù, khả năng hòa tan lân dạng  $AlPO_4$  và  $FePO_4$  bởi 2 dòng nấm B1 và B10 thấp hơn nhiều so với dạng  $Ca_3(PO_4)_2$  nhưng kết quả này cho thấy 2 dòng nấm này có khả năng hòa tan được hai dạng lân khó tan trong đất đặc biệt là vùng đất phèn nơi lân bị bất động chủ yếu dưới dạng  $AlPO_4$  và  $FePO_4$ . Do đó, có thể ứng dụng 2 dòng nấm này cho việc cải thiện sự thiếu hụt lân trên nền đất phèn ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long.





**Hình 5:** Diễn biến hàm lượng lân hòa tan bởi dòng nấm B1 (A) và B10 (B) trong môi trường NBRIP lỏng bổ sung các dạng lân khó tan khác nhau sau 10 ngày nuôi cấy (n = 3, độ lệch chuẩn)

**3.4 Định danh 2 dòng nấm hòa tan lân B1 và B10 bằng phương pháp giải mã trình tự đoạn ITS**

So sánh trình tự đoạn ITS 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 B1 và B10 tương đồng với đoạn ITS của loài nấm *Penicillium funiculosum* và *Aspergillus tubingensis* với tính đồng hình lần lượt là 96% và 98%. Như vậy, hai dòng nấm B1 và B10 có chức năng hòa tan lân thuộc chi *Penicillium* và *Aspergillus* và được định danh lần lượt như *Penicillium funiculosum* B1 và *Aspergillus tubingensis* B10 (Bảng 2). Các nghiên cứu trước đây cũng cho thấy chi nấm *Penicillium* sp và *Aspergillus* có khả năng hòa tan lân rất cao và chúng được sử dụng rộng rãi cho cây trồng (Wakelin *et al.*, 2004). Ngoài ra, dòng nấm *Aspergillus niger* và một số loài trong chi *Penicillium* chứng minh là

có khả năng hòa tan lân cao và đồng thời có vai trò quan trọng trong phòng trừ sinh học và phân hủy chất hữu cơ (Chuang *et al.*, 2007; Richa *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2008). Bên cạnh đó, dòng nấm *Aspergillus niger* hòa tan lân cao lại có chức năng đối kháng với dòng nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh đạo ôn lúa và thối nhũn bắp cải lên đến 64%. Do đó, dòng nấm này có tiềm năng rất cao trong việc sử dụng như phân bón sinh học và phòng trừ sinh học nấm *Fusarium oxysporum* trong sản xuất măng tây hữu cơ (Ruangsanka, 2014). Nghiên cứu của Patil *et al.* (2012) cho thấy khi bón phân lân kết hợp chủng 2 dòng nấm *Penicillium bilaji* và *Penicillium* sp hòa tan lân vào đất giúp tăng năng suất bắp từ 20-23% so với nghiệm thức đối chứng. Tóm lại, 2 dòng nấm được định danh là *Penicillium funiculosum* B1 và *Aspergillus tubingensis* B10 có ích cho cây trồng và có triển vọng rất lớn trong việc sản xuất phân bón sinh học cho cây trồng.

**Bảng 2:** Kết quả định danh 2 dòng nấm B1 và B10 theo độ tương đồng của đoạn ITS

TT	Dòng	Độ tương đồng (%)	Các dòng nấm trên cơ sở dữ liệu		Định danh
			Nấm	Số đăng kí	
1	B1	96	<i>Penicillium funiculosum</i>	<u>JN676120.1</u>	<i>Penicillium funiculosum</i> B1
2	B10	98	<i>Aspergillus tubingensis</i>	<u>KM594388.1</u>	<i>Aspergillus tubingensis</i> B10

#### 4 KẾT LUẬN

Hai dòng nấm ký hiệu B1 và B10 phân lập từ mẫu đất trồng lúa áp dụng biện pháp tưới nước ngập khô xen kẽ kết hợp bón phân hữu cơ hòa tan lân  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  cao trong môi trường NBRIP lỏng, lần lượt đạt 2104 mg.L<sup>-1</sup> và 2618 mg.L<sup>-1</sup> sau 3 và 4 ngày thí nghiệm. Các điều kiện môi trường nuôi cấy tối ưu cho hai dòng nấm này hòa tan lân  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  cao nhất ở pH từ 5-7, nhiệt độ 25°C-35°C, nồng độ muối trong khoảng 0,5-1% NaCl và cả hai dòng này đều hòa tan được hai dạng lân khó tan như  $\text{AlPO}_4$  và  $\text{FePO}_4$ . Tuy nhiên, khả năng hòa tan lân  $\text{AlPO}_4$  của hai dòng nấm B1 và B10 tốt hơn so với lân  $\text{FePO}_4$ . Dòng nấm B10 có khả năng hòa tan lân cao hơn dòng nấm B1 ở tất cả các lân, đặc biệt là dạng lân  $\text{FePO}_4$ . Hai dòng nấm ký hiệu B1 và B10 được định danh lần lượt như *Penicillium funiculosum* B1 và *Aspergillus tubingensis* B10 và cả hai dòng nấm phân lập này có tiềm năng ứng dụng cao trong canh tác lúa trồng trên nền đất nhiễm mặn giúp hạn chế vấn đề thiếu hụt lân cho cây trồng.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Asea, P.E.A., Kucey, R.M.N. and Stewart, J.W.B., 1988. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 20(4): 459-464.
- Chai, B., Wu, Y., Liu, P., Liu, B. and Gao, M., 2011. Isolation and phosphate-solubilizing ability of a fungus, *Penicillium* sp. from soil of an alum mine. *Journal of Basic Microbiology*, 51(1): 5-14.
- Chakraborty, B.N., Chakraborty, U., Saha, A., Sunar, K. and Dey, P.L., 2010. Evaluation of phosphate solubilizers from soils of North Bengal and their diversity analysis. *World Journal of Agricultural Sciences*, 6(2): 195-200.
- Chuang, C.C., Kuo, Y.L., Chao, C.C. and Chao, W.L., 2007. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biology and Fertility of Soils*, 43(5): 575-584.
- Gardes, M. and Bruns, T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycete application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2): 113-118.
- Ghosh, P., Rathinasabapathi, B. and Ma, L.Q., 2011. Arsenic-resistant bacteria solubilized arsenic in the growth media and increased growth of arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Bioresource Technology*, 102(19): 8756-8761.
- Goldstein, A.H., 1994. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous mineral phosphates by gram - negative bacteria. In: A. Torriani-Gorini, E. Yagil and S. Silver, Eds., *Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology*, ASM Press, Washington DC, 1994, pp. 197-203.
- Halder, A.K., Mishr, A.K., Bhattacharya, P. and Chakrabarthy, P.K., 1990. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 36(2): 81-92.
- Hoàng Dương Thu Hương, 2015. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy một số chủng nấm mốc hòa tan phosphate vô cơ và thử nghiệm trồng cây ngập mặn. Luận văn tốt nghiệp cao học ngành công nghệ sinh học. Trường Đại học Khoa học Thừa Thiên Huế.
- Igual, J.M., Valverde, A., Cervantes, E. and Velazquez, E., 2001. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie*, 21(6): 561-568.
- Ihrmark, K., Inga, T.M., Bødeker, K.C.M., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J., Brandstrom-Durling, M., Clemmensen, K.E., Lindahl, B.D., 2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454 sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 82(3): 666-677.
- Iman, M. and Azouni, E.I., 2008. Effect of phosphate solubilizing fungi on growth and nutrient uptake of soybean (*Glycine max* L.) plants. *Journal of Applied Sciences Research*, 4(6): 592-598.
- Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphorus solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letter*, 170(1): 2017-2021.
- Nguyễn Hữu Hiệp và Hà Danh Đức, 2009. Phân lập các dòng vi khuẩn cố định đạm và hòa tan lân cho đậu phộng trồng ở Trà Vinh. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, 11(b): 123-133.
- Nguyễn Xuân Thành, Nguyễn Đường Hoàng Hải và Vũ Thị Hoàn, 2007. *Giáo trình sinh học đất*. Nhà xuất bản Giáo Dục, 271 trang.
- Omar, S.A., 1998. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular-arbuscular mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(2): 211-218.
- Pandey, A., Das, B., Kumar, K., Rinu, K., and Trivedi, P., 2008. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. isolated from soil samples of Indian Himalayan region. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(1): 97-102.
- Patil, R. M., Kuligod, V. B., Hebsur, N. S., Patil, C. R. and Kulkarni, G. N., 2012. Effect of phosphate solubilizing fungi and phosphorus levels on growth, yield and nutrient content in maize (*Zea mays*). *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 25(1): 58-62.
- Phạm Thanh Hà, Nguyễn Thị Quỳnh Mai, Hồ Thị Kim Anh và Nguyễn Thị Phương Chi, 2003. Ảnh

- hường của nhiệt độ đối với vi sinh vật hòa tan phosphate. Báo cáo hội nghị Công Nghệ Sinh Học toàn quốc. Hà Nội: NXB Khoa học và Kỹ thuật: 381-383.
- Phạm Thị Ngọc Lan và Hoàng Dương Thu Hương, 2014. Nghiên cứu tuyển chọn chủng nấm mốc hòa tan phosphate vô cơ phân lập từ đất rừng ngập mặn ở Thừa Thiên Huế. Tạp chí khoa học và phát triển, 12(8): 1294-1301.
- Phạm Thị Ngọc Lan và Trần Thị Thanh Nhân, 2008. Điều kiện nuôi cấy tối ưu cho sinh trưởng và phát triển của một số chủng nấm mốc hòa tan phosphate vô cơ. Tạp chí khoa học, Trường Đại học Huế, 48: 103-108.
- Pradhan, N. and Sukla, L.B., 2005. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. African Journal of Biotechnology, 5(10): 850-854.
- Richa, G., Khosla, B., and Reddy, M., 2007. Improvement of maize plant growth by phosphate solubilizing fungi in rock phosphate amended soils. World Journal of Agricultural Science, 63(1): 481-484.
- Ruangsanka, S., 2014. Identification of phosphate-solubilizing fungi from asparagus rhizosphere as antagonist of root and crown rot pathogen, *Fusarium oxysporum*. Science Asia, 40(1): 16-20.
- Trần Thanh Phong, 2012. Đánh giá khả năng cố định đạm của vi khuẩn nội sinh đến năng suất và chất lượng của trái khóm trồng tại huyện Tân Phước, tỉnh Tiền Giang. Luận án tiến sĩ Ngành vi sinh vật, Trường đại Học Cần Thơ. Truy cập ngày 4/5/2016 tại [http://gs.ctu.edu.vn/tomtat\\_LATS/VSVH\\_TTPhong.pdf](http://gs.ctu.edu.vn/tomtat_LATS/VSVH_TTPhong.pdf).
- Trần Thị Xuân Phương, Nguyễn Thị Thu Thủy, Lê Xuân Diễm Ngọc, Nguyễn Lê Nhật Quang và Võ Hoàng Minh Thu, 2017. Xác định điều kiện nuôi cấy tối ưu cho một số chủng nấm *Aspergillus* sp. phân giải phosphate vô cơ được phân lập trong đất trồng rau màu ở Thừa Thiên Huế. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp, Trường Đại học Huế, 1(2): 337-344.
- Xiao, C.Q., Chi, R.A., Lix, H., Xia, M. and Xia, Z.W., 2011. Biosolubilization of rock phosphate by three stress tolerant fungal strains. Applied Biochemistry and Biotechnology, 165(2): 719-727.
- Yasser, M.M., Mousa, A.S.M., Massoud, O.N. and Nasr, S.H., 2014. Solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing fungi isolated from Egyptian soils. Journal of Biology and Earth Sciences, 4(1): 83-90.
- Wakelin, S.A., R.A. Warren, P.R. Harvey and M.H. Ryder, 2004. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. Biology and Fertility of Soils. 40(1): 36-43.
- Wani, P.A., M.S. Khan and Zaidi, A., 2007. Co-inoculation of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria to promote growth, yield and nutrient uptake in chickpea. Acta Agronomica Hungarica, 53(3): 315-323.
- Whitelaw, M.A., 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. Advances in Agronomy, 69: 99-151.