

NGHIÊN CỨU TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG NẤM *Trichoderma* CÓ KHẢ NĂNG CHỊU NHIỆT VÀ PHÂN GIẢI CELLULOSE TẠI LÂM ĐỒNG, VIỆT NAM

Lê Ngọc Triệu¹, Nguyễn Thị Thùy Linh¹, Lê Thị Anh Tú¹, Nguyễn Thị Bích Liên¹,
Phan Trung Trục², Mai Thị Mỹ Lanh¹, Nguyễn Khoa Trường¹

¹Trường Đại học Đà Lạt

²Công ty Nông sản và Dược liệu Trà My

TÓM TẮT

Nghiên cứu tuyển chọn các chủng nấm *Trichoderma* có khả năng chịu nhiệt và phân giải cellulose tại Lâm Đồng có ý nghĩa quan trọng trong việc lựa chọn chủng nấm *Trichoderma* tại địa phương có các đặc tính ưu việt, từ đó ứng dụng hiệu quả vào quá trình xử lý các phế phụ phẩm tại tỉnh Lâm Đồng và ứng phó với tình hình nóng lên toàn cầu như hiện nay. Từ 50 mẫu thu thập từ các đồng ủ phế phụ phẩm và đất canh tác tại tỉnh Lâm Đồng, đã tuyển chọn được 3 chủng nấm có khả năng phân giải cellulose lần lượt là TDD2.2 có đường kính phân giải cellulose đạt 21,1 mm; chủng TDT1.3 đạt 21,9 mm; chủng TLD1.2 đạt 16,1 mm, cả 3 chủng nấm này đều có khả năng chịu được nhiệt độ cao, lên đến 55°C và hoạt tính enzyme cellulase hoạt động ổn định ở nhiệt độ từ 40 - 45°C. Dựa trên kết quả phân tích các trình tự gen ITS và so sánh với các trình tự tham chiếu trên Genbank, chủng nấm TDD2.2 đã được xác định thuộc loài *Trichoderma afroharzianum*, TDT1.3 thuộc loài *T. longibrachiatum* và TLD1.2 thuộc loài *T. harzianum*. Đây là những chủng nấm *Trichoderma* có tiềm năng để xử lý phế phụ phẩm nông nghiệp và thích nghi mạnh mẽ với tình hình biến đổi khí hậu hiện nay.

Từ khoá: Cellulose, chịu nhiệt, phế phụ phẩm nông nghiệp, *Trichoderma*.

SELECTION OF *TRICHODERMA* STRAINS WITH HEAT TOLERANCE AND CELLULOSE DEGRADATION ABILITY IN LAM DONG PROVINCE, VIETNAM

Le Ngoc Trieu¹, Nguyen Thi Thuy Linh¹, Le Thi Anh Tu¹, Nguyen Thi Bich Lien¹, Mai Thi My Lanh¹,
Phan Trung Truc², Nguyen Khoa Truong¹

¹Da Lat University

²Tra My Agricultural Products and Medicinal Materials Company

SUMMARY

Selection of *Trichoderma* strains with heat tolerance and cellulose degradation ability is of significant importance in choosing superior *Trichoderma* strains with desirable characteristics at the local level. This research aims to efficiently apply these strains in the treatment of agricultural waste in Lam Dong province, Vietnam and cope with the current global warming situation. From a collection of 50 samples taken from agricultural waste piles and cultivated soils in Lam Dong province, we have successfully selected three fungi strains capable of cellulose degradation. The strains include TDD2.2 with a cellulose degradation diameter of 21.1 mm, TDT1.3 with 21.9 mm, and TLD1.2 with 16.1 mm. All three fungal strains exhibit the ability to withstand high temperatures up to 55°C and maintain stable cellulase enzyme activity at temperatures ranging from 40 to 45°C. The TDD2.2 strain belongs to the *T. afroharzianum*, TDT1.3 belongs to *T. longibrachiatum*, and TLD1.2 belongs to *T. harzianum*. These *Trichoderma* strains have significant potential for agricultural waste treatment and demonstrate strong adaptability to the current climate change scenario.

Keywords: Cellulose, heat resistance, agricultural waste, *Trichoderma*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lâm Đồng là một trong những địa phương có điều kiện khí hậu thuận lợi cho canh tác và phát triển nông, lâm nghiệp bền vững. Ước tính sản lượng sản phẩm nông nghiệp hàng ngày lên đến 7.000 - 8.000 tấn nông sản. Tuy nhiên, để sản xuất và tạo ra một lượng nông sản như trên thì tỷ lệ phế phụ phẩm nông nghiệp đi kèm cũng rất lớn. Theo Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, trong năm 2020, lượng phế phụ phẩm nông nghiệp sinh ra trên cả nước lên đến 156,8 triệu tấn. Tuy nhiên, chỉ có một phần ít trong số này được tận dụng để tái sử dụng cho vụ mùa trồng trọt tiếp theo (Nguyễn Vũ, 2021). Hiện nay, nhu cầu xử lý phế phụ phẩm nông nghiệp bằng phương pháp sinh học ngày càng tăng cao, tuy nhiên người nông dân lại khó khăn trong việc tiếp cận được những chế phẩm sinh học có chất lượng. Hơn thế nữa, trong quá trình xử lý phế phụ phẩm thì nhiệt độ trong đồng ủ tăng cao dẫn đến hiệu suất chuyển hóa thấp và thời gian xử lý kéo dài làm ảnh hưởng đến nhiều khía cạnh khác nhau trong quá trình canh tác nông nghiệp.

Nấm *Trichoderma* có thể phát triển ở hầu hết các môi trường sống và điều này đạt được nhờ khả năng trao đổi chất đa dạng dẫn đến việc tổng hợp nhiều loại enzyme và các chất chuyển hóa thứ cấp khác nhau như enzyme cellulase, 1-3 beta-glucanase, và chitinase (Harman *et al.*, 2004; Ahamed and Vermette, 2008; Sandhya *et al.*, 2004). Hầu hết các chủng nấm *Trichoderma* đều thích nghi với nhiệt độ từ 15 - 21°C (Eastburn and Butler, 1991) và có rất ít các nghiên cứu về khả năng chịu nhiệt trên 25°C của *Trichoderma* (Chet *et al.*, 1981). Mặc dù trong quá trình canh tác thì nhiệt độ của đất không ảnh hưởng quá nhiều đến khả năng của nấm *Trichoderma*, tuy nhiên với sự nóng lên toàn cầu thì nấm *Trichoderma* phải đối mặt với những thay đổi bất thường về nhiệt độ và ảnh

hưởng trực tiếp đến hoạt động sống và làm giảm những lợi ích mà chúng mang lại cho môi trường nông nghiệp (Mukherjee and Raghu, 1997; Poosapati *et al.*, 2014).

Tại Việt Nam, nấm *Trichoderma* thường được ứng dụng để đối kháng nấm gây bệnh, hỗ trợ sinh trưởng, phát triển của cây trồng cũng như được sử dụng rộng rãi trong việc xử lý các phế phụ phẩm nông nghiệp (Võ Thị Ngọc Cẩm, 2015; Trần Thị Lệ *et al.*, 2017). Tuy nhiên, trong những năm gần đây, cùng với sự nóng lên toàn cầu và ở Lâm Đồng hiện nay đang gia tăng diện tích canh tác nông nghiệp trong nhà màng làm cho nhiệt độ tại các khu vực trồng trọt đã tăng lên đáng kể. Điều này làm ảnh hưởng đến sự phát triển của các vi sinh vật có lợi trong đất nông nghiệp, đặc biệt là nấm *Trichoderma*. Hiện nay, nhóm nghiên cứu chưa ghi nhận nghiên cứu nào về nấm *Trichoderma* có khả năng chịu nhiệt độ cao và sinh tổng hợp enzyme cellulase tại Việt Nam. Do đó, nghiên cứu này sẽ là tiền đề để tiếp tục thực hiện các nghiên cứu tiếp theo về vi sinh vật chịu nhiệt, có hoạt tính phân giải cellulose mạnh để ứng dụng cho lĩnh vực nông, lâm nghiệp ở Việt Nam nói chung và Lâm Đồng nói riêng.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu đất được thu tại các địa điểm canh tác nông nghiệp (25 mẫu) và tại các đồng ủ phế phụ phẩm nông nghiệp (25 mẫu) ở các huyện Đơn Dương, Đức Trọng, Lâm Hà, Lạc Dương và thành phố Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng. Mẫu được ghi thông tin (địa chỉ, ngày thu mẫu, pH, nhiệt độ, độ ẩm trung bình). Mẫu đại diện được thu và chứa trong túi nilon vô trùng, bảo quản trong thùng trữ lạnh (10 - 15°C) và chuyển về Phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh, Khoa Sinh học, Trường Đại học Đà Lạt để bảo quản và tiến hành phân lập.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập nấm *Trichoderma*

Các chủng nấm *Trichoderma* được phân lập trên môi trường TMS (*Trichoderma* selective medium) bằng phương pháp pha loãng cấy trái (Koch, 1883). Cân 10 g mẫu cho vào bình tam giác chứa 90 ml nước muối sinh lý (NaCl 0,85%) đã khử trùng và pha loãng đến nồng độ 10^{-6} . Hút 100 μ l dung dịch pha loãng ở 3 nồng độ liên tiếp nhỏ vào các đĩa thạch tương ứng và trải đều bằng que trải thủy tinh. Nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong vòng 48 - 72 giờ. Các khuẩn lạc mang các đặc điểm đặc trưng của chi nấm *Trichoderma* phát triển trên môi trường thạch được ghi nhận. Mô tả đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào, sau đó cấy chuyển sang môi trường mới để làm thuần và giữ giống phục vụ các nghiên cứu tiếp theo.

2.2.2. Đánh giá sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng và phát triển của nấm *Trichoderma*

Các chủng nấm *Trichoderma* được cấy vào 100 ml môi trường lỏng PDB (Potato dextrose broth) và nuôi ở nhiệt độ 40, 45, 50, 55 và 60°C trong khoảng thời gian 1 giờ, 2 giờ và 4 giờ (Plesofsky-Vig and Brambl, 1985; Poosapati *et al.*, 2014). Kiểm tra mật độ bào tử nấm *Trichoderma* sau khi bị sốc nhiệt bằng phương pháp đếm trực tiếp trên buồng đếm hồng cầu (Nguyễn Đức Lượng *et al.*, 2006). Thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần.

2.2.3. Đánh giá sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulase của nấm *Trichoderma*

Nấm *Trichoderma* được nuôi trên môi trường lỏng PDB có chứa 0,2% CMC tại các điều kiện nhiệt độ 40, 45, 50, 55 và 60°C trong 72 giờ. Đánh giá hoạt tính enzyme cellulase theo phương pháp đục lỗ thạch được mô tả bởi Saratete và đồng tác giả (2009). Ly tâm dung

dịch nuôi cấy tại 8.000rpm trong 15 phút để thu phần dịch nổi chứa enzyme. Hút 100 μ l dịch nổi nhỏ vào giếng (d = 6 mm) của môi trường CMC thạch, đặt đĩa thạch tại nhiệt độ 4°C trong 2 giờ rồi chuyển sang ủ tại 35°C trong vòng 48 giờ. Sau thời gian ủ, tiến hành nhuộm Lugol và xác định khả năng phân giải cellulose của các chủng nấm *Trichoderma*. Mỗi thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần.

2.2.4. Đánh giá sự ảnh hưởng của nồng độ CMC trong môi trường nuôi cấy đến khả năng phân giải cellulose

Nấm *Trichoderma* được nuôi trên môi trường lỏng PDB chứa nồng độ CMC khác nhau (1; 1,5; 2; 2,5; 3%) ở nhiệt độ 35°C trong vòng 48 giờ. Sau đó tiến hành đánh giá khả năng phân giải cellulose theo phương pháp đục lỗ thạch (Saratete *et al.*, 2009).

2.2.5. Định danh các chủng nấm *Trichoderma*

Các mẫu nấm được ghi nhận về các đặc điểm hình thái trong quá trình nuôi cấy bao gồm hình thái khuẩn lạc, sợi nấm, cuộn bào tử và bào tử để so sánh với các mô tả có trước nhằm định danh (Đặng Vũ Hồng Miên, 2015). Để hỗ trợ cho kết quả định danh dựa trên hình thái, việc định danh dựa trên dữ liệu phân tử được tiến hành dựa trên phân tích trình tự DNA vùng ITS1 -5.8SrRNA - ITS2.

Các mẫu khảo sát được tách chiết DNA theo phương pháp CTAB có cải tiến bằng cách bổ sung 7% thể tích SDS 10% vào đệm chiết, nghiền mẫu bằng chày teflon. Sử dụng môi ITS1F (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3'); ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3') (White *et al.*, 1990) để khuếch đại vùng ITS1 -5.8SrRNA - ITS2. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit tinh sạch HI-412 PCR Purification của Công ty ABT và giải trình tự hai chiều tại Công ty PHUSA BIOCHEMICAL (Việt Nam) theo phương

pháp Sanger với các môi đã sử dụng để khuếch đại. Để định danh nấm, công cụ BLAST được sử dụng để tìm trình tự DNA đã công bố từ dữ liệu ngân hàng gen NCBI có mức tương đồng cao với các mẫu DNA đã được giải trình tự, từ đó chỉ ra cách mà các mẫu nghiên cứu có thật sự gần gũi với các taxon đã định danh dựa trên hình thái.

Cây quan hệ phát sinh giữa các mẫu nấm khảo sát với các taxon tương đồng cao với chúng cũng được xây dựng thông qua việc sử dụng phần mềm MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013) theo phương pháp Maximum Likelihood, giá trị bootstrap 2000 với chuẩn ngoại được sử dụng thuộc loài *Aspergillus heldtiae* có mã truy cập ngân hàng gene là MK450656.

2.2.6. Xử lý thống kê

Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel và kiểm định ý nghĩa thống kê theo phép thử Tukey HSD bằng phần mềm R 4.0.2. Các dữ liệu gen được xử lý bằng phần mềm AGTC.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập nấm *Trichoderma* có khả năng phân giải cellulose

Từ 50 mẫu đất và phế phụ phẩm đã thu tại 5 huyện thị là Đơn Dương, Đức Trọng, Lạc Dương, Lâm Hà và thành phố Đà Lạt, chúng tôi phân lập và dựa vào đặc điểm khuẩn lạc ghi nhận 13 nhóm nấm *Trichoderma* khác nhau, điều kiện nơi thu mẫu và mật độ nấm trung bình thể hiện tại bảng 1 và bảng 2.

Bảng 1. Kết quả phân lập nấm *Trichoderma* có khả năng phân giải cellulose trong đồng ủ phế phụ phẩm nông nghiệp tại Lâm Đồng

Địa điểm thu mẫu	Nhiệt độ trung bình (°C)	pH trung bình	Độ ẩm trung bình (%)	Mật độ trung bình (10^4 CFU/g)
Đơn Dương	52,4	5,5	51,7	3,4
Đức Trọng	57,0	5,3	53,8	2,3
Lâm Hà	56,3	5,4	54,5	1,8
Lạc Dương	53,3	5,7	53,4	2,2
Đà Lạt	54,0	5,5	55,3	2,6

Đa số các chủng nấm *Trichoderma* thường sinh trưởng và phát triển ở nhiệt độ từ 15 - 21°C (Eastburn and Butler, 1991), tuy nhiên kết quả từ bảng 1 cho thấy các chủng nấm *Trichoderma* có sự thích nghi và phát triển trong điều kiện nhiệt độ từ 52,4 - 57°C và độ ẩm 51,7 - 55,3% với mật

độ trung bình ghi nhận được là $2,46 \times 10^4$ CFU/g. Như vậy, đây là cơ sở để tuyển chọn được các chủng nấm *Trichoderma* có khả năng sinh trưởng phát triển trong điều kiện nhiệt độ cao và có tiềm năng ứng dụng phát triển ngành nông lâm nghiệp trong tương lai.

Bảng 2. Kết quả phân lập nấm *Trichoderma* có khả năng phân giải cellulose trong đất canh tác nông nghiệp

Địa điểm thu mẫu	Nhiệt độ trung bình (°C)	pH trung bình	Độ ẩm trung bình (%)	Mật độ trung bình (10^4 CFU/g)
Đơn Dương	20,1	5,3	53,9	17,2
Đức Trọng	21,2	5,5	51,7	9,5
Lâm Hà	20,5	5,6	47,3	2,4
Lạc Dương	20,6	5,5	48,7	20,0
Đà Lạt	19,8	5,7	52,3	20,3

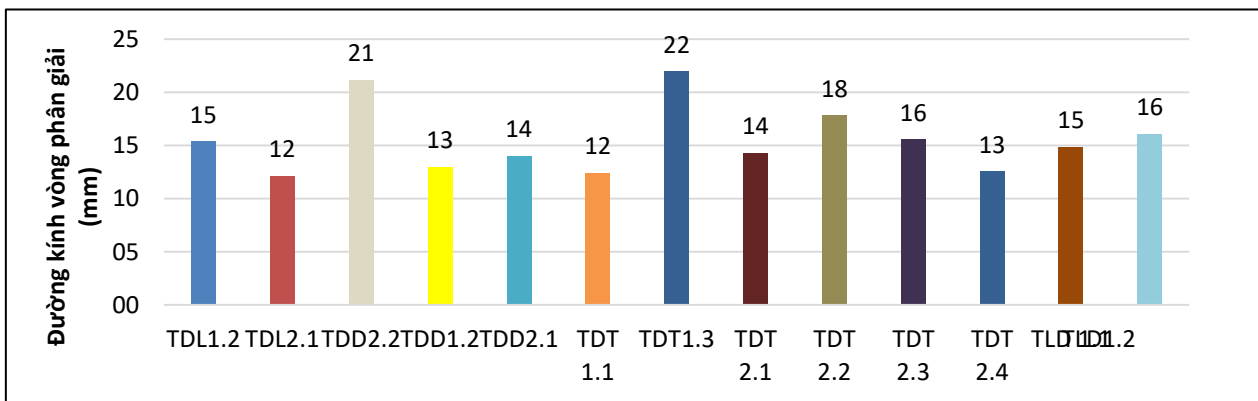
Kết quả từ bảng 2 cho thấy trong đất canh tác nông nghiệp có điều kiện nhiệt độ dao động từ 19,8 - 21,2°C, pH trung bình từ 5,3 - 5,7 và độ ẩm từ 48,7 - 53,9% là các điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của nấm *Trichoderma* với mật độ trung bình đạt $25,3 \times 10^4$ CFU/g.

Từ bảng 1 và bảng 2, có thể thấy rằng mật độ các chủng nấm *Trichoderma* tại tỉnh Lâm Đồng không đồng bộ. Trong những mẫu có nhiệt độ vừa phải từ 20 - 21°C thì mật độ nấm *Trichoderma* cao hơn so với nơi có nhiệt độ cao từ 50 - 60°C. Đây là một khuynh hướng tất yếu bởi vì trong môi trường canh tác nông nghiệp thì thuận lợi hơn cho các nhóm vi sinh vật phát triển, còn trong môi trường đồng ủ - nơi có nhiệt

độ cao hơn thì mật độ nấm *Trichoderma* giảm đáng kể.

Nhìn chung, hiện nay các nông hộ thường sử dụng nhiều chế phẩm vi sinh có chứa nấm *Trichoderma* khác nhau để xử lý các phế phụ phẩm nông nghiệp tạo phân bón hữu cơ với mục đích tái sử dụng cho trồng trọt. Nhưng nhiều mẫu đất canh tác nông nghiệp lại không xuất hiện nấm *Trichoderma*, điều này có thể minh chứng cho việc người nông dân ít hoặc không sử dụng nấm *Trichoderma* mà thay vào đó là sử dụng các chủng vi sinh vật có lợi khác cho cây trồng của họ.

Đánh giá khả năng phân giải cellulose của các nhóm nấm *Trichoderma*, thu được kết quả chi tiết tại biểu đồ 1.



Biểu đồ 1. Khả năng phân giải CMC của các chủng nấm *Trichoderma*

Ghi chú: Đường kính vòng phân giải < 10 mm: hoạt tính phân giải yếu;

Đường kính vòng phân giải 10 mm ≤ d < 20 mm: hoạt tính phân giải trung bình;

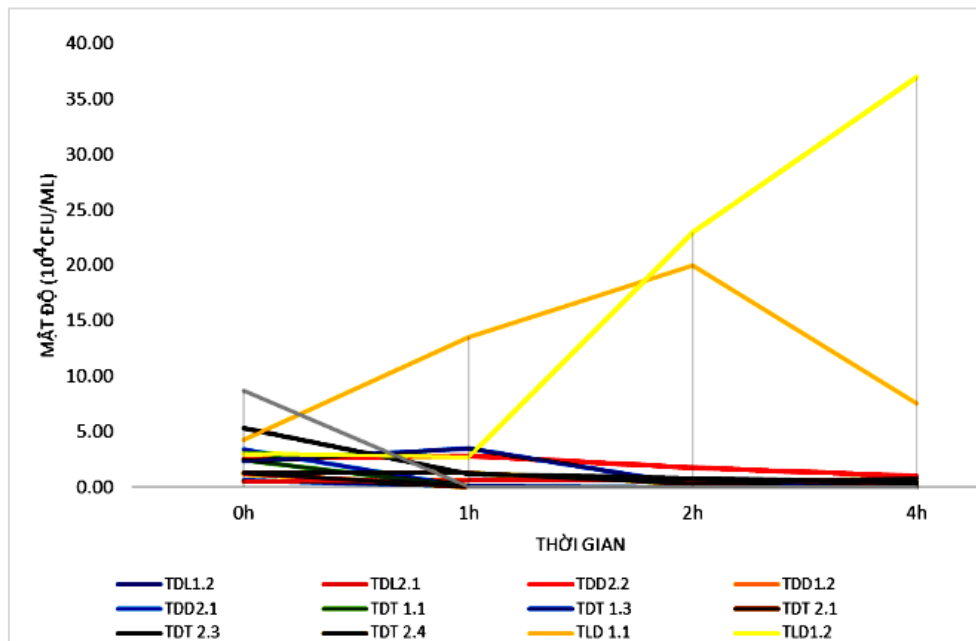
Đường kính vòng phân giải > 20 mm: hoạt tính phân giải mạnh.

Từ các chủng nấm *Trichoderma* đã phân lập, ghi nhận có 13 chủng nấm *Trichoderma* có đường kính vòng phân giải cellulose từ 12,2 - 21,9 mm. Theo Nguyễn Thị Thúy Nga và đồng tác giả (2015), đây là những chủng nấm *Trichoderma* có khả năng phân giải cellulose từ mức trung bình (10 mm ≤ d < 20 mm) đến mạnh (>20 mm). Khả năng phân giải cellulose của các chủng nấm *Trichoderma* này là tương đương với các chủng nấm *Trichoderma* được phân lập tại một số địa phương có canh tác nông nghiệp ở Huế với đường kính vòng phân

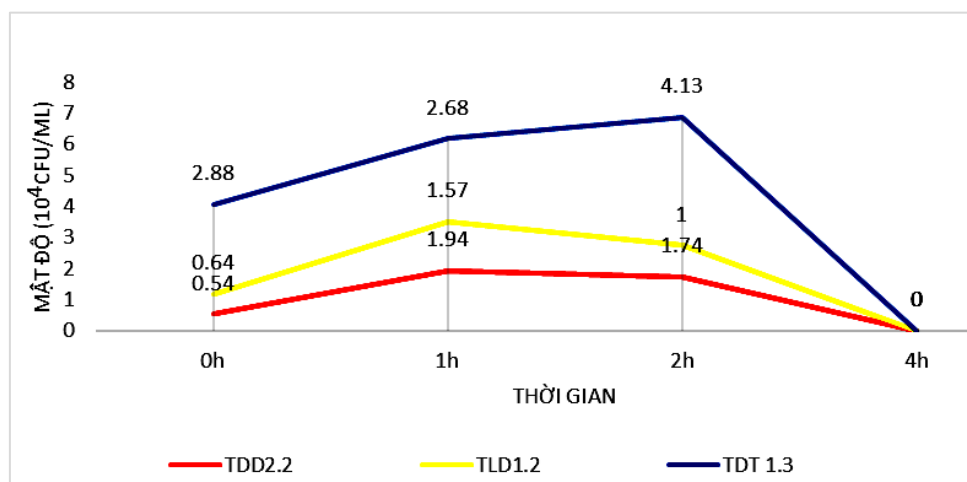
giải được ghi nhận từ 8,67 - 25,33 mm (Trần Thị Lệ *et al.*, 2012).

3.2. Đánh giá khả năng chịu nhiệt của các chủng nấm *Trichoderma*

Đánh giá khả năng chịu nhiệt của các chủng nấm *Trichoderma* qua các thời gian, chúng tôi ghi nhận rằng hầu hết 13 chủng nấm *Trichoderma* này đều có khả năng chịu được nhiệt độ lên đến 50°C và có 3 chủng nấm có khả năng chịu được nhiệt độ lên đến 55°C, chi tiết thể hiện tại biểu đồ 2 và biểu đồ 3.



Biểu đồ 2. Khả năng chịu nhiệt của nấm *Trichoderma* tại 50°C



Biểu đồ 3. Khả năng chịu nhiệt của nấm *Trichoderma* tại 55°C

Từ biểu đồ 2 và 3 có thể thấy rằng các chủng nấm *Trichoderma* có khả năng chịu được nhiệt độ lên đến 50°C trong vòng 2 - 4 giờ. Trong đó, có ba chủng nấm *Trichoderma* có ký hiệu là TDD2.2, TDT1.3 và TLD1.2 có khả năng chịu được nhiệt độ lên đến 55°C.

Trong điều kiện thí nghiệm, tại nhiệt độ 55°C, mật độ của các chủng nấm *Trichoderma* tăng nhẹ sau 1 giờ nuôi cấy và bắt đầu giảm dần cho đến 4 giờ thì không có ghi nhận sự sinh trưởng của hệ sợi nấm trên môi trường kiểm tra. Tuy

nhiên, trong số các chủng nấm phân lập được, chủng nấm TDT1.3 không chỉ có khả năng chịu được nhiệt độ cao trong thời gian dài mà còn có khả năng sinh trưởng trong thời gian 2 giờ sau khi được sốc nhiệt ở 55°C với mật độ trung bình đạt $4,13 \times 10^4$ CFU/ml. So sánh các chủng nấm *Trichoderma* này với kết quả nghiên cứu của Poosapati và đồng tác giả (2014) có 13 chủng nấm *Trichoderma* khác nhau được phân lập từ đất canh tác các cây trồng như lạc, đậu nành, lúa, bông và mía tại

Ấn Độ có khả năng chịu được nhiệt độ lên đến 52°C trong vòng 4 giờ. Trong nghiên cứu của Akpomie và đồng tác giả (2021), các tác giả báo cáo rằng chủng nấm *T. asperellum* được phân lập trong chất thải công nghiệp tại Nigeria chỉ có khả năng chịu nhiệt độ đến 45°C.

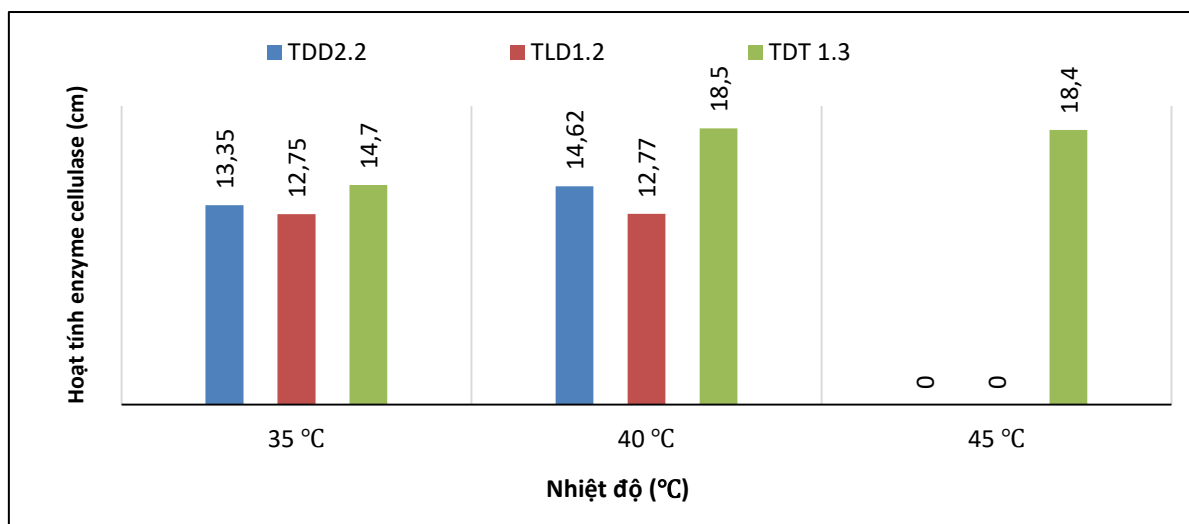
Các loài nấm có nhiều cơ chế để chịu nhiệt và các căng thẳng phi sinh học khác nhau, trong đó bao gồm các cơ chế về hòa tan lipid, ổn định nhiệt ở cấp độ phân tử và cấu trúc siêu hiển vi, tăng tính linh động của lipid bão hòa ở nhiệt độ cao, cho phép tăng cường hoạt động ở nhiệt độ cao hơn 40°C (Kuhad *et al.*, 2011, Kim and Suriya, 2016), tăng cường sản xuất protein sốc nhiệt, duy trì pH nội bào, giảm hoạt độ nước hoặc phân bố lại nguồn nước trong ngăn tế bào chất và khử độc các loại oxy phản ứng (Chang *et al.*, 2004; Tereshina *et al.*, 2005). Để củng cố cho những cơ chế này, Possapati và đồng tác giả (2014) đã chứng minh rằng các chủng nấm *T. longibrachiatum* và *T. asperelum* đã sử dụng con đường MAPK (mitogen-activated protein

kinases), con đường phản ứng sốc nhiệt, giảm sự tích tụ các protein bị sai lệch thông qua con đường phản ứng protein để thích nghi với môi trường nhiệt độ cao.

Nghiên cứu này đã tuyển chọn được ba chủng nấm *Trichoderma* có khả năng chịu nhiệt đến 55°C. Điều này, bước đầu đã khẳng định được các chủng nấm này có thể được xem là thích nghi và sinh trưởng, phát triển ở những điều kiện khắc nghiệt. Đây là những chủng nấm *Trichoderma* tiềm năng để hỗ trợ phát triển ngành nông, lâm nghiệp trong điều kiện nóng lên toàn cầu.

3.3. Đánh giá sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính enzyme cellulase các chủng *Trichoderma* tuyển chọn

Hoạt tính của enzyme cellulase được sản sinh từ ba chủng nấm TDD2.2, TDT1.3 và TLD1.2 được khảo sát tại các mức nhiệt độ khác nhau, kết quả khảo sát được trình bày tại biểu đồ 4.



Biểu đồ 4. Sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính enzyme cellulase

Từ biểu đồ 4, có thể thấy rằng enzyme cellulase được sinh ra từ ba chủng nấm *Trichoderma* chịu nhiệt có khả năng hoạt động tổng hợp cellulase tốt ở nhiệt độ từ 35 - 40°C và chỉ duy nhất enzyme cellulase được sinh tổng hợp bởi chủng nấm

TDT1.3 ở điều kiện nhiệt độ 45°C với đường kính vòng phân giải cellulose là 18,4 mm.

Trong quá trình phân giải cơ chất trong đồng ủ, nhiệt độ có thể lên đến 55 - 60°C trong vòng 2 - 3 ngày đầu tiên và đây cũng là thời điểm thích

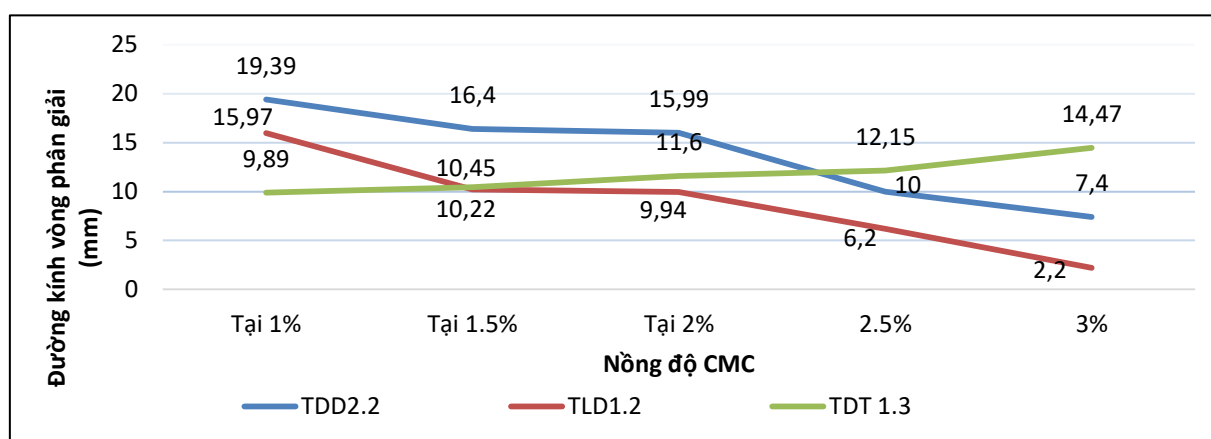
hợp cho nấm *Trichoderma* phát triển hệ sợi và sản sinh lượng enzyme cellulose cần thiết để phân hủy cơ chất. Khi nhiệt độ tăng lên trên 40°C, protein, cellulose, hemicellulose, lignin bị chuyển hóa và một phần biến thành mùn (Diaz *et al.*, 1993; McKinley and Vestal, 1985; Crawford, 1983). Ủ cơ chất ở điều kiện nhiệt độ 45°C sẽ giúp tăng tốc độ phản ứng sinh hóa, thúc đẩy quá trình phân hủy diễn ra nhanh hơn và cellulose sẽ được phân hủy trong giai đoạn ưa nhiệt này (Brady and Weil, 1999).

Ngoài ra, khi đông ủ bắt đầu giai đoạn hạ nhiệt độ, thì bào tử nấm *Trichoderma* được hình thành trước đó sẽ nảy mầm sinh trưởng tạo hệ sợi và các enzyme cellulase từ chủng TDT1.3 được tiết ra sẽ hoạt động sớm hơn các enzyme

từ vi sinh vật khác. Do đó, sẽ thúc đẩy toàn bộ quá trình phân hủy cơ chất diễn ra nhanh hơn.

3.4. Đánh giá sự ảnh hưởng của nồng độ CMC đến khả năng phân giải cellulose

Nồng độ CMC có sự ảnh hưởng đối với khả năng phân giải cellulose của các enzyme cellulase do nấm *Trichoderma* sinh ra. Đối với hai chủng nấm TDD2.2, TLD1.2, có thể thấy rằng khả năng phân giải cellulose tỷ lệ nghịch với nồng độ CMC có trong môi trường. Ngược lại, đối với chủng nấm TDT1.3 thì khả năng phân giải cellulose lại tỷ lệ thuận với nồng độ CMC có trong môi trường nuôi cấy, kết quả chi tiết thể hiện tại biểu đồ 5.



Biểu đồ 5. Sự ảnh hưởng của nồng độ CMC đến khả năng phân giải cellulose của nấm *Trichoderma*

Khả năng hoạt động của enzyme cellulase được tiết ra từ chủng nấm có ký hiệu TDT1.3 vẫn vượt trội hơn so với các chủng nấm còn lại. Trong khi tăng nồng độ CMC, khả năng phân giải cellulose của enzyme cellulase từ hai chủng nấm TDD2.2 và TLD1.2 giảm dần, ngược lại, khả năng phân giải cellulose của enzyme cellulase được sinh ra từ chủng TDT1.3 lại có xu hướng tăng dần, đỉnh điểm tại nồng độ CMC đạt 3% thì đường kính vòng phân giải đạt cao nhất là 14,47 mm.

Nhìn chung, enzyme cellulase được sinh ra từ chủng nấm TDT1.3 vừa có khả năng hoạt động

tốt ở nhiệt độ 45°C và ở nồng độ CMC cao là một trong những enzyme hứa hẹn khả năng ứng dụng thực tiễn trong tương lai gần.

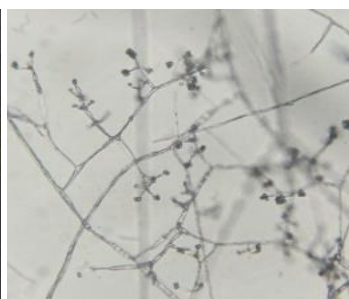
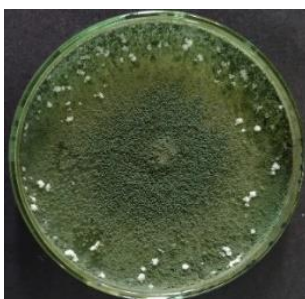
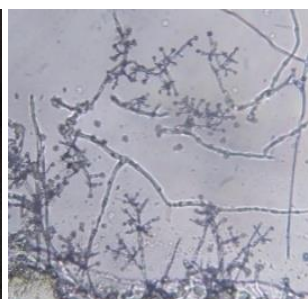
3.5. Định danh các dòng nấm *Trichoderma* đã tuyển chọn

Ba chủng nấm *Trichoderma* có ký hiệu là TDD2.2, TDT1.3 và TLD1.2 thể hiện khả năng vượt trội hơn các chủng nấm khác về khả năng chịu nhiệt độ cao và sinh tổng hợp được enzyme cellulase có hoạt tính tốt được ghi nhận về các đặc điểm về hình thái khuẩn lạc, sợi nấm, bào tử, túi bào tử cũng như kết quả BLAST trên

Ngân hàng gene. Kết quả được ghi nhận lại trong bảng 3.

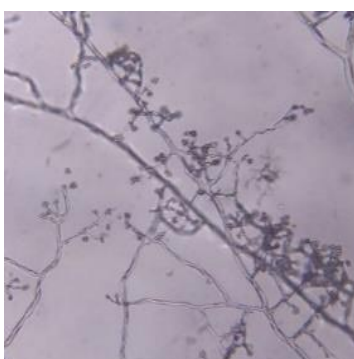
Bảng 3. Đặc điểm khuẩn lạc và hình thái hệ sợi nấm *Trichoderma* đã tuyển chọn

STT	Ký hiệu	Đặc điểm khuẩn lạc	Hình thái tế bào	Kết quả định BLAST trên Ngân hàng gene
1	TDD2.2	Sợi nấm dày bông xốp, mọc tỏa tròn, có bào tử màu xanh phun nhiều ở trung tâm và thưa dần khi ra ngoài rìa (hình 1)	Sợi nấm phân nhiều nhánh, cơ quan sinh sản dạng cành cây, cuống bào tử phân nhánh, thể bình hình chai mọc đối xứng tỏa tròn, bào tử hình cầu dính lại với nhau và dính trên thể bình (hình 1)	Trình tự ITS được khuếch đại dài 657bp, tương đồng 99,84% với các loài <i>Trichoderma afroharzianum</i> (OM515008 và PP837617; <i>T. harzianum</i> (KY25652 và KY25654).
2	TDT1.3	Sợi nấm mỏng, mọc tỏa tròn sát mặt thạch, có bào tử xanh phun dày ở giữa khuẩn lạc (hình 2).	Sợi nấm phân nhánh ít, cơ quan sinh sản dạng cành cây, cuống bào tử ngắn, thể bình hình chai thuôn dài mọc đối xứng (thưa), bào tử hình cầu dính trên thể bình (hình 2).	Trình tự ITS được khuếch đại dài 657bp, tương đồng 99,84% với loài <i>T. longibrachiatum</i> (OR899156, MN511324, KJ010953 và OL953191).
3	TLD1.2	Sợi nấm dày bông xốp, có bào tử màu xanh phun mỏng đều trên khắp bề mặt khuẩn lạc nhưng dày ở trung tâm (hình 3).	Sợi nấm phân nhiều nhánh, cơ quan sinh sản (cuống bào tử) dạng cành cây phân nhiều nhánh nhỏ, thể bình hình chai mọc đối xứng tỏa tròn, bào tử hình cầu dính vào thể bình (hình 3).	Trình tự ITS được khuếch đại dài 648bp, tương đồng 99,85% với các loài <i>T. afroharzianum</i> (OM515019 và PP837617; <i>T. harzianum</i> (KY25652 và KY25654).



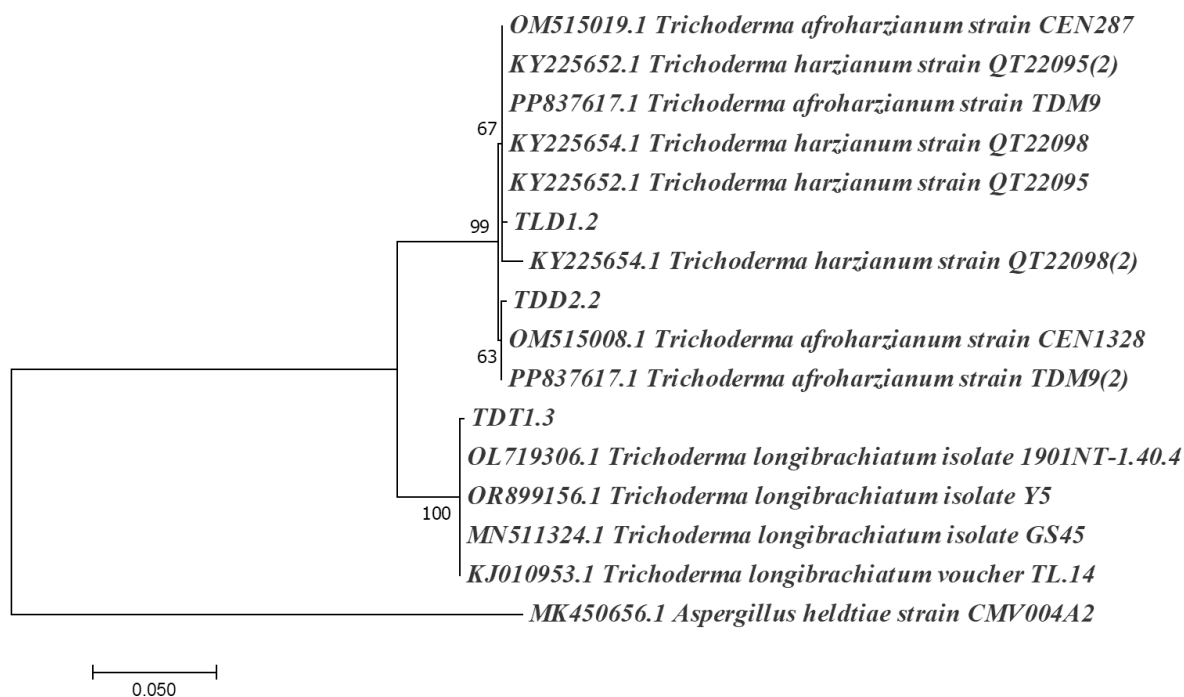
Hình 1. Đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào chủng nấm TDD2.2

Hình 2. Đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào chủng nấm TDT1.3



Hình 3. Đặc điểm khuẩn lạc và hình thái tế bào chủng nấm TLD1.2

Cây quan hệ phát sinh giữa các mẫu nấm khảo sát với các taxon tương đồng cao với chúng được thể hiện trong hình 4.



Hình 4. Cây quan hệ phát sinh giữa các mẫu nấm khảo sát với các taxon tương đồng cao dựa trên trình tự ITS

Việc lập nhóm giữa các taxon khảo sát cho thấy hai các chủng TDD2.2 và TLD1.2 gần gũi nhau hơn so với chủng TDT1.3. Hai chủng TDD2.2 và TLD1.2 nằm trong nhóm với các taxon thuộc hai loài *T. afroharzianum* và *T. harzianum* trong khi TDT1.3 lập nhóm chặt chẽ với loài *T. longibrachiatum*.

Từ đặc điểm hình thái khuẩn lạc, sợi nấm và bào tử có thể nhận thấy chủng TDD2.2 có hình thái tương đồng cao với loài *Trichoderma afroharzianum* đã được mô tả trước đây, cho dù đặc điểm vùng ITS giống với cả hai loài *T. afroharzianum* và *T. harzianum* (các trình tự ITS tương đồng cao với trình tự từ chủng TDD2.2 ghi nhận cho hai loài này giống nhau). Từ đó cho thấy mẫu TDD2.2 thuộc loài *T. afroharzianum*.

Đặc điểm hình thái khuẩn lạc, sợi nấm và bào tử của chủng TDT1.3 tương đồng cao với các đặc

điểm ghi nhận cho loài *Trichoderma longibrachiatum*, đặc điểm vùng ITS giống loài này. Đây là cơ sở để định danh mẫu TDT1.3 thuộc loài *T. longibrachiatum*.

Các đặc điểm hình thái khuẩn lạc, sợi nấm và bào tử được mô tả trước đây cho loài *T. harzianum* thể hiện rõ ở chủng TLD1.2, cho dù đặc điểm vùng gen ITS giống với cả hai loài *T. harzianum* và *T. afroharzianum* (các trình tự ITS tương đồng cao với trình tự từ chủng TLD1.2 ghi nhận cho hai loài này giống nhau). Từ đó cho thấy mẫu TLD1.2 thuộc loài *T. harzianum*.

Đa số các loài nấm *Trichoderma* là loài hoại sinh và tham gia vào các quá trình phân hủy các polyme sinh học như cellulose, hemicellulose và chitin (Schuster và Schmoll, 2010; Do Vale *et al.*, 2012). Cấu trúc 3D của enzyme cellulase sinh ra từ *T. harzianum* được xác định đầu tiên

bởi Rouvien và đồng tác giả (1990), tiếp theo đó lần lượt các báo cáo cũng xác định nhiều cấu trúc và vai trò sâu hơn của cellulase từ loài nấm này (Divne *et al.*, 1994). *T. longibrachiatum* là một loài nấm được tìm thấy khắp nơi trên thế giới, nhưng chủ yếu xuất hiện nhiều ở vùng ẩm hơn (Druzhinina *et al.*, 2012). Loại nấm này có khả năng tiết ra một lượng lớn cellulase, chitinase để phân hủy gỗ và thành chitin của một số loại nấm khác. Ngoài ra, nó có thể phân giải protein và sản xuất nhiều sản phẩm thứ cấp khác (Semuels *et al.*, 2012; Xie, 2014, Hamdan and Jasim, 2021). Ngoài ra, nấm *Trichoderma longibrachiatum* và *Trichoderma harzianum* là một trong các chủng nấm được xác định là có khả năng chịu được nhiệt độ cao và chịu mặn tốt trong nghiên cứu của Poosaoatital và đồng tác giả (2014).

IV. KẾT LUẬN

Từ 25 mẫu đất canh tác nông nghiệp và 25 mẫu phế phụ phẩm nông nghiệp đang được xử lý, đã phân lập được 13 chủng nấm và tuyển chọn được 3 chủng nấm *Trichoderma* có khả năng chịu được nhiệt độ cao và sinh tổng hợp enzyme cellulase, lần lượt là chủng TDD2.2 thuộc loài

Trichoderma afroharzianum (Có khả năng chịu nhiệt đến 55°C, đường kính vòng phân giải đạt 14,62 mm tại 40°C), chủng TDT1.3 thuộc loài *T. longibrachiatum* (Có khả năng chịu nhiệt ở 55°C, đường kính vòng phân giải đạt 18,4 mm tại 45°C) và chủng TLD1.2 thuộc loài *T. harzianum* (Có khả năng chịu nhiệt đến 55°C, đường kính vòng phân giải đạt 12,77 mm tại 40°C). Đặc biệt, enzyme cellulase sinh ra từ chủng nấm *T. longibrachiatum* có khả năng hoạt động ở nhiệt độ 45°C. Đây là những chủng nấm có tiềm năng xử lý phụ phẩm nông lâm nghiệp và đáp ứng với điều kiện biến đổi khí hậu toàn cầu và nhiệt độ ngày càng nóng.

Lời cảm ơn: Công trình này là sản phẩm của đề tài “Nghiên cứu xây dựng công nghệ xử lý chất thải từ nguồn phụ phẩm công nghệ trồng và chế biến nấm để phục vụ sản xuất nông nghiệp bền vững” thuộc chương trình Khoa học và Công nghệ cấp Bộ “Nghiên cứu xây dựng mô hình kinh tế nông nghiệp tuần hoàn từ nguồn tài nguyên nấm khu vực Tây Nguyên phục vụ công tác đào tạo, nghiên cứu và chuyển giao công nghệ”. Các tác giả xin ghi nhận và cảm ơn Bộ Giáo dục và Đào tạo và Trường Đại học Đà Lạt đã tài trợ kinh phí nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ahamed, A. and Vermette, P., 2008. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 40(3), 399-407.
2. Akpomie, O.O., Okonkwo, K.E., Gbemre, A.C., Akpomie, K.G., Ghosh, S., Ahmadi, S., & Banach, A.M., 2021. Thermotolerance and cellulolytic activity of fungi isolated from soils/waste materials in the industrial region of Nigeria. *Current Microbiology*, 78(7), 2660-2671.
3. Brady, N.C. and Weil, R.R., 1999. The nature and properties of soils (12thedn.). Prentice Hall, New Jersey.
4. Chang, Y.C., Tsai, H.F., Karos, M., Kwon-Chung, K.J., 2004. THTA, a thermotolerance gene of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Gene*.
5. Chet, I., Harman, G.E., Baker, R., 1981. *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microbial Ecology*, 7(1), 29-38.
6. Crawford, J.H., 1983. Composting of agricultural waste - a review. *Process biochem*, 18, 14-18.
7. Diaz, L.F., Savage, G.M., Eggerth, L.L., Golueke, C.G., 1993. *Composting and Recycling: Municipal Solid Waste*. CRC Press, Boca Raton, FL.

8. Divne, C., Ståhlberg, J., Reinikainen, T., Ruohonen, L., Pettersson, G., Knowles, J.K.,... & Jones, T.A., 1994. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Science*, 265(5171), 524-528.
9. Do Vale, L.H., Gómez-Mendoza, D.P., Kim, M.S., Pandey, A., Ricart, C.A., Edivaldo, X.F.F., Sousa, M.V., 2012. Secretome analysis of the fungus *Trichoderma harzianum* grown on cellulose. *Proteomics*, 12(17), 2716-2728.
10. Druzhinina, I.S.; Komoń-Zelazowska, M.; Ismaiel, A.; Jaklitsch, W.; Mullaw, T.; Samuels, G.J.; and Kubicek, C.P., 2012. Molecular phylogeny and species delimitation in the section *Longibrachiatum* of *Trichoderma*. *Fungal Genetics and Biology*. 49 (5): 358-368.
11. Đặng Vũ Hồng Miên, 2015. Hệ nấm mốc ở Việt Nam. NXB Khoa học và Kỹ thuật, 608 trang.
12. Eastburn, D. M., Butler, E. E., 1991. Effects of soil moisture and temperature on the saprophytic ability of *Trichoderma harzianum*. *Mycologia*, 83(3), 257-263.
13. Hamdan, N.T., & Jasim, H.M., 2021. Cellulase from *Trichoderma longibrachiatum* fungus: a review. *World Bulletin of Public Health*, 4, 52-68.
14. Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1), 43-56.
15. Kim, S.K., and Suriya, J., 2016. Marine enzymes biotechnology: production and industrial applications, Part II—Marine organisms producing. In: Toldra F (ed) *Advances in food and nutrition research*, vol 79, 1st edn. Elsevier, Amsterdam, pp 67-98.
16. Koch, R., 1883. Über die neuen Untersuchungsmethoden zum Nachweis der Mikrokosmen in Boden. *Luft und Wasser Aerztliches Vereinsblatt f., Deutschland*.
17. Kuhad, R.C., Gupta, R., Singh, A., 2011. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Res* 2011:280696.
18. Mckinley, V.L., Vestal, J.R., 1985. Physical and chemical correlates of microbial activity and biomass in composting municipal sewage sludge. *Appl. Environ. Microiok.*, 50, 1395-1403.
19. Mukherjee, P.K. and Raghu, K., 1997. Effect of temperature on antagonistic and biocontrol potential of shape *Trichoderma* sp. on *Sclerotium rolfsii*. *Mycopathologia*, 139(3), 151-155.
20. Nguyễn Đức Lượng, Phan Thị Huyền, Nguyễn Ánh Tuyết, 2006. Thí nghiệm công nghệ sinh học: tập 2: Thí nghiệm vi sinh vật học. NXB Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, 463tr.
21. Nguyễn Thị Thúy Nga, Phạm Quang Nam, Lê Xuân Phúc, Phạm Quang Thu, Nguyễn Minh Chí, 2015. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn phân giải xelulo sản xuất phân hữu cơ sinh học. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, 2,3841-3850
22. Nguyễn Thị Thu Thủy, Nguyễn Tiến Long, Trần Thanh Đức, 2018. Phân lập, tuyển chọn và định danh vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose để sản xuất phân hữu cơ vi sinh. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 127(3A), 117-127, DOI:10.26459/hueuni-jard.v127i3A.4413.
23. Nguyễn Vỹ, 2021. Phế phụ phẩm nông nghiệp quý như vàng nhưng còn lãng phí quá nhiều. *Báo Dân Việt*, ngày đăng 10 tháng 09 năm 2021 tại <https://danviet.vn/phe-phu-pham-nong-nghiep-quy-nhu-vang-nhung-con-lang-phi-qua-nhieu-2021091014200325.html>
24. Plesofsky-Vig, N. and Brambl, R., 1985. Heat shock response of *Neurospora crassa*: protein synthesis and induced thermotolerance. *J. Bacteriol*, 162(3):1083-1091
25. Poosapati, S., Ravulapalli, P.D., Tippirishetty, N., Vishwanathaswamy, D.K., & Chunduri, S., 2014. Selection of high temperature and salinity tolerant *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Sclerotium rolfsii*. *SpringerPlus*, 3(1), 1-11, DOI: 10.1186/2193-1801-3-641.
26. Samuels, G.J.; Ismaiel, A; Mulaw, T.B.; Szakacs, G.; Druzhinina, I.S.; Kubicek, C.P. and Jaklitsch, W.M. 2012. The *Longibrachiatum* Clade of *Trichoderma*: a revision with new species. *Fungal Diversity*. 55(1): 77-108.
27. Sandhya, C., Adapa, L.K., Nampoothiri, K.M., Binod, P., Szakacs, G., & Pandey, A., 2004. Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 44(1), 49-58.

28. Saratete, G.D., Lo, Y.C., Chen, W.M., Bai, M.D., Chang, J.S., 2009. Isolation of cellulose-hydrolytic and applications of the cellulotic enzymes for cellulosic biohydrogen production. *Enzyme and Microbial Technology*, 44, 417-425.
29. Schuster, A., & Schmoll, M., 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(3), 787-799.
30. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S 2013 MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30(12): 2725-2729.
31. Tereshina, V.M., 2005. Thermal resistance in fungi: the role of heat shock proteins and trehalose. *Mikrobiologiya* 74(3):293-304
32. Trần Thị Lê, Trần Thị Thu Hà, Nguyễn Thị Thanh, Nguyễn Xuân Kỳ, 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 HTX Hương Long, Thành phố Huế. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 71(2), tại <http://jos.hueuni.edu.vn/index.php/TCKHDHH/article/view/200>
33. Võ Thị Ngọc Cẩm, Nguyễn Thị Kiều Oanh, Đỗ Hoàng Sang, Nguyễn Thị Tô Quyên, Đỗ Thị Xuân, Dương Minh Viễn, Nguyễn Khởi Nghĩa, 2015. Phân lập và tuyển chọn một số dòng nấm bản địa phân hủy một số vật liệu hữu cơ từ nền đất thâm canh lúa tại xã Phong Hòa, huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 36, 1-11.
34. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18 (1): 315 - 322.
35. Xie, B.B.; Qin, Q.L.; Shi, M.; Chen, L.L.; Shu, Y.L.; Luo, Y.; Wang, X.W.; Rong, J.C.; Gong, Z.T.; Li, D.; Sun, C.Y.; Liu, G.M., 2014. Comparative Genomics Provide Insights into Evolution of *Trichoderma* Nutrition Style. *Genome Biology and Evolution*. 6 (2): 379-390.

Email tác giả liên hệ: truongnk@dlu.edu.vn

Ngày nhận bài: 07/10/2024

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 16/10/2024; 29/10/2024

Ngày duyệt đăng: 10/10/2024