

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP NẤM *TRICHODERMA* VÀ KHẢO SÁT KHẢ NĂNG SINH ENZYME, ỨNG DỤNG TRONG XỬ LÝ BÃ THẢI NẤM

ISOLATION OF *TRICHODERMA* FUNGI AND EVALUATION OF THEIR ENZYME ACTIVITY WITH APPLICATION IN MUSHROOM RESIDUES TREATMENT

Phạm Thị Kim Thảo, Nguyễn Thị Minh Xuân, Đặng Đức Long

Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng; Email: kimthao011087@gmail.com

Tóm tắt: *Trichoderma* là loài vi nấm được ứng dụng rộng rãi trong nông nghiệp nhờ hệ enzyme phong phú và có hoạt tính cao, đặc biệt phân giải các hợp chất polysaccharide tự nhiên. Bã thải từ trồng nấm đang trở thành một vấn đề cần giải quyết do sự mở rộng quy mô sản xuất mặt hàng này. Lượng cellulose có trong bã thải nấm rất lớn, đây là cơ chất tốt để sản sinh enzyme cellulase, một loại enzyme có nhiều hướng ứng dụng trong xử lý môi trường và công nghiệp. Nhằm tiến tới việc sản xuất enzyme này dựa trên việc xử lý nguồn phế phẩm ngành trồng nấm, chúng tôi đã tiến hành phân lập giống nấm *Trichoderma* từ bã thải nấm, rơm, và từ mẫu chế phẩm thương mại. Bốn giống nấm *Trichoderma* đã được phân lập đều có khả năng sinh chitinase và cellulase, trong đó giống T4 có nguồn gốc từ bã thải nấm sinh enzyme cellulase mạnh hơn hẳn. Qua khảo sát chủng T4 sinh cellulase có hoạt độ cao nhất (0,326 U/ml) ở điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ 25°C, pH = 5,2, nguồn carbon: bã thải nấm, nguồn nitrogen: pepton.

Từ khóa: bã thải nấm; *Trichoderma*; cellulase; phân vi sinh; phân lập.

1. Đặt vấn đề

Trichoderma là loài nấm mốc được tìm thấy nhiều nhất trong đất. *Trichoderma* chứa hệ enzyme phong phú với hoạt lực mạnh. Các chủng giống khác nhau của loài *Trichoderma* đã được ứng dụng nhiều trong thực tế ở nhiều lĩnh vực khác nhau như: công nghiệp thực phẩm, công nghiệp dệt, xử lý môi trường, làm thức ăn gia súc và các dạng phân bón sinh học.

Một số nghiên cứu gần đây cho thấy chủng vi nấm *Trichoderma* có khả năng cải tạo đất trồng, làm tăng độ phì nhiêu cho đất bằng cách chuyển hóa các hợp chất phospho khó tan có rất nhiều trong đất mà cây không hấp thụ được, và khả năng tiết các enzyme cellulase, glucanase để phân hủy chất hữu cơ cellulose và glucan thành các dạng dễ hấp thụ. Bên cạnh đó, *Trichoderma* cũng tác động trực tiếp lên vùng rễ như loại bỏ mầm bệnh, làm tăng sự sinh trưởng và phát triển của rễ hoặc từ những điểm mà *Trichoderma* tác động đến sẽ kích thích cây trồng tăng sản xuất các enzyme nội sinh, và các hợp chất kháng sinh giúp cây đề kháng tốt với mầm bệnh [5].

Trong quá trình sinh sản, *Trichoderma* có thể xảy ra hiện tượng đột biến do sự sai sót từ quá trình phân chia tế bào và tác động của điều kiện môi trường sống khác nhau. Điều này sẽ dẫn đến sự đa dạng trong kiểu gen, kiểu hình của cùng một loài *Trichoderma*. Và vì vậy tạo ra những dòng thích nghi tốt trong điều kiện sinh thái, địa lý khác nhau và đây chính là những dòng rất có ý nghĩa trong nghiên cứu cũng như trong việc tạo chế phẩm phân hữu cơ vi sinh từ các nguồn hữu cơ khác nhau [4].

Nhờ vào giá trị dinh dưỡng và giá trị kinh tế cao, nấm ăn đang được trồng ngày một phổ biến ở Việt Nam. Tuy vậy,

Abstract: *Trichoderma* species have been applied widely in agriculture, especially in producing microbial fertilizers, because of their diverse and strong enzyme systems, especially natural polysaccharide-degrading ones. A large quantity of mushroom spent has increasingly become a big problem for the environment in Vietnam. This solid waste contains several substances, of which cellulose can be utilized by microorganism, especially microbial fungi, to produce high valuable enzymes such as cellulase, which is used in the environmental treatment and in many industries. In this study, we isolated *Trichoderma* strains from mushroom spent, straw, and commercial *Trichoderma* products. Four isolated *Trichoderma* strains all produce cellulase and chitinase, in which T4 one from a local mushroom spent has the strongest activity of cellulase. The best condition for producing cellulase (the relative activity: 0,326 U/ml) by T4 strain is at 25°C, with pH 5.2, carbon source: mushroom spent, nitrogen source: pepton.

Key words: mushroom spent; *Trichoderma*; cellulase; microbial fertilizer; isolation.

nó cũng nảy sinh một vấn đề mới cần được giải quyết đó là bã thải sau khi thu hoạch nấm. Bã thải này vẫn còn chứa một lượng rất lớn các chất dinh dưỡng cũng như hệ sợi nấm, thu hút sự phát triển của vi sinh vật, ruồi... Nếu không được giải quyết bã thải này có thể trở thành một nguồn gây bệnh. Ngược lại nếu được xử lý một cách thích hợp chúng lại trở thành nguồn phân bón vô cùng tốt cho cây trồng hoặc tận dụng để làm cơ chất sản xuất enzyme cellulase, một enzyme đang được quan tâm đặc biệt trong lĩnh vực sản xuất bioethanol từ cellulose.

Với mục tiêu tìm kiếm chủng vi sinh vật có hoạt tính cao để xử lý bã thải nấm chúng tôi tiến hành phân lập chủng *Trichoderma* đặc thù ở địa phương có sẵn trên nguồn bã thải này, trong đó rơm, cũng như từ chế phẩm thương mại, tiếp đó khảo sát khả năng sinh enzyme của các chủng giống nhằm đánh giá sơ bộ khả năng sử dụng chúng trong xử lý bã thải nấm.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Mẫu bã thải nấm tại cơ sở sản xuất nấm ăn Công ty TNHH Việt Úc, Đà Nẵng.

Mẫu đồng rơm ủ tại hộ gia đình Hòa Vang Đà Nẵng.

Chế phẩm sinh học có chứa nấm *Trichoderma* (VI-ĐK).

Chủng nấm *Trichoderma harzianum* từ viện Công nghệ Sinh học TP HCM.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- **Phương pháp pha loãng:** Các mẫu phải được xử lý trước khi phân lập bằng cách phơi khô 2-3 ngày, sau đó

dùng rây qua sàng có kích thước 2-3mm. Pha loãng mẫu ở các nồng độ pha loãng khác nhau: 10^{-4} , 10^{-5} là 2 độ pha loãng thích hợp để phân lập nấm trong các mẫu này [8]. Cây trái dịch pha loãng lên đĩa petri chứa môi trường phân lập TSM (g/l): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2g, K_2HPO_4 0,8g, KCl 0,15g, NH_4NO_3 1g, D-glucose 3g, Rose Bengal 0,15g, Chloramphenicol 0,25g, PCNB (Quintozene) 0,2g, Agar 20g. Ủ đĩa nhiệt độ phòng 5 ngày. Cây chuyển làm thuần khiết những khuẩn lạc đặc trưng giống với khuẩn lạc *Trichoderma harzianum* trên cùng môi trường TSM.

- **Phương pháp định loài:** Dựa theo nghiên cứu định loài của Samuels et al., 2006, cây giống nấm lên 2 môi trường: môi trường PDA (Merck), và môi trường CMD (g.l⁻¹) gồm: Bột bắp 2g, Dextrose 2g, Streptomycin sulfat 0.02g, Neomycin sulfat 0.02g, Agar 20g [7]. Tiến hành so sánh các đặc điểm hình thái khuẩn lạc, và các đặc điểm vi học như bào tử, cuống sinh bào tử của các chủng mẫu *Trichoderma harzianum* với các đặc điểm tương ứng của chủng cần định loại. Nếu các đặc điểm của 2 chủng phù hợp với nhau thì có thể khẳng định loài (hoặc thứ) của chủng nấm mốc cần định loài.

- **Xác định hoạt tính enzyme bằng phương pháp vòng thủy phân:** 0,5 ml dịch nuôi cấy được cho vào lỗ thạch đã chứa sẵn 1% cơ chất CMC (carchomethyl cellulose) hoặc 1% chitin ở nhiệt độ 30°C, qua đêm. Enzyme cellulase hoặc chitinase có trong dịch chiết sẽ khuếch tán vào trong các lỗ thạch để thủy phân CMC (Carbonmethyl cellulose) hoặc chitin thành các phân tử mạch ngắn hơn và vì vậy không còn bắt màu với thuốc thử lugol, tạo thành một vòng tròn trong suốt. Dựa vào đường kính của vòng tròn trong suốt này (đường kính vòng trong suốt = đường kính ngoài - đường kính của lỗ thạch) để đánh giá sơ bộ hoạt tính hệ enzyme cellulase hoặc chitinase của dịch nuôi cấy [6].

- **Xác định hoạt độ enzyme cellulase bằng phương pháp đường khử DNS:** 0,5 ml dịch nuôi cấy có chứa enzyme cellulase tác dụng với 0,5 ml sau khi tác dụng với các loại cơ chất cảm ứng khác nhau: 1% (w/v) CMC, Giấy lọc, Bã thải nấm (sấy đến khối lượng không đổi); sau đó đường khử sinh ra tác dụng với thuốc thử DNS (dinitrosalicylic acid) tạo ra dịch có màu đỏ được đo tại bước sóng 540nm [3]. Đơn vị hoạt độ enzyme là số μmol glucose được giải phóng ra bởi 0,5 ml dịch enzyme sau thời gian 1 phút ở 40°C, pH 4.8.

3. Kết quả và thảo luận

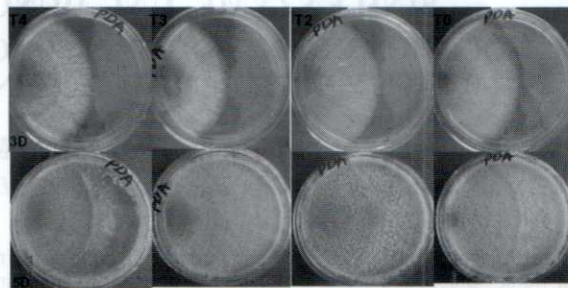
3.1. Kết quả phân lập loài *Trichoderma*

Tiến hành phân lập các chủng nấm mốc từ các nguồn khác nhau và thu được các chủng giống được ký hiệu như trong Bảng 1. Sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA ở 30°C, chúng tôi làm tiêu bản quan sát dưới kính hiển quang học đặc điểm hình thái của sợi nấm, cuống sinh bào tử và bào tử ở độ phóng đại 1000x, chụp ảnh bào tử và dùng phần mềm ImageJ để tính toán kích thước bào tử.

Bảng 1. Ký hiệu chủng nấm phân lập

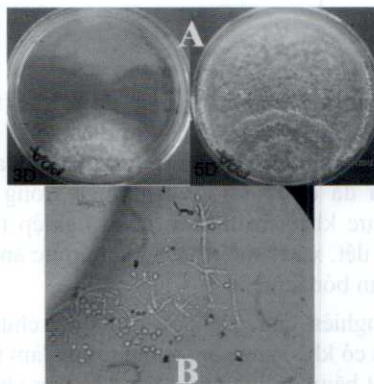
Kí hiệu chủng nấm	Nguồn phân lập
T0	Đồng ủ rơm
T2	Chế phẩm thương mại

T3	Chế phẩm thương mại
T4	Bã thải nấm

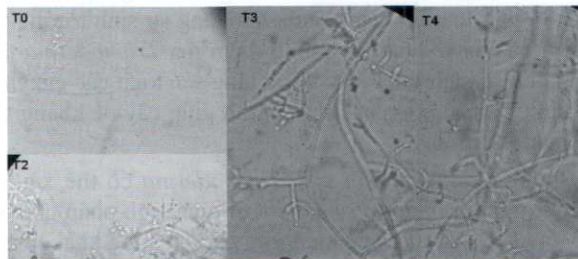


Hình 1. Khuẩn lạc 4 chủng phân lập trên môi trường PDA sau 3 và 5 ngày nuôi cấy

Từ Hình 1, Hình 2 cho thấy rằng chủng phân lập có đặc điểm nuôi cấy và đặc điểm hình thái chủng với chủng mẫu *T.harzianum*: khuẩn lạc mọc tỏa ra thành vòng tròn đồng tâm, bề mặt khuẩn lạc bong sợi, màu sắc thay đổi theo tuổi nấm, khuẩn ty màu trắng trên PDA. Đặc điểm vi học ở Hình 3: sợi khuẩn ty có vách ngăn, cuống sinh bào tử phân nhánh cao. Kiểu phát sinh bào tử trần là phát sinh kiểu thể bình rõ rệt. Đỉnh 1 bào tử trần duy nhất tại ngọn thể bình. Kiểu bào tử trần Euconidi. Các thể bình có thể được giữ trên các nhánh tạo một góc nhất định so với nhánh chính.



Hình 2. Đặc điểm nuôi cấy và vi học *T.harzianum*.
A: Khuẩn lạc *T.harzianum* trên PDA theo thời gian nuôi cấy 3 ngày và 5 ngày
B: Cuống sinh bào tử *T.harzianum* (1000x)



Hình 3. Đặc điểm vi học 4 chủng phân lập 1000X

Vậy có thể kết luận rằng, 4 chủng nấm phân lập được thuộc loài *Trichoderma* và mỗi chủng phân lập có những đặc điểm khác nhau được mô tả tại Bảng 2.

Bảng 2. Đặc điểm nuôi cấy và đặc điểm vi học chủng nấm phân lập

Đặc điểm	T0	T2	T3	T4
1. Bào tử				
- Hình dạng	Gần cầu đến oval	Gần cầu	Gần cầu đến cầu	Hình trứng đến elip
- Dài (D)(μm)	1.8-3	1.8-2.7	1.6-2.4	2.7-4
- Rộng (R) (μm)	2.1-2.8	2.1-2.4	1.4-2.6	1.7-2.7
- Tỉ số D/R	0.9-1.1	0.9-1.1	0.7-1.2	1.1-2.1
- Giữ trong giọt lỏng	Không	Không	Không	Không
2. Cuống bào tử				
- Hình dạng	Thế bình phình to phần đáy	Thế bình phình to phần đáy	Thế bình phình to phần đáy	Thế bình phình to phần đáy
- Phát sinh nhánh từ cuống bào tử	Không	Có	không	không
- Cụm bào tử trên CMD	Có	Không	Có	Có
Bào tử chống chịu (chlamydospores)	Không	Không	Không	Không
Khuẩn ty	Có vách ngăn	Có vách ngăn	Có vách ngăn	Có vách ngăn
Bán kính KL (R)mm				
-PDA,25°C, 72h,	65	64	62	72
-PDA,30°C, 72h,	37	68	36	67
-PDA,35°C, 72h,	23	30	2	3
-PDA,40°C, 72h,	Không phát triển	Không phát triển	Không phát triển	Không phát triển
Mùi khuẩn lặc ngọt dừa	Có	Có	Có	Không

3.2. Kết quả đánh giá sơ bộ khả năng sinh chitinase và cellulase

Bảng 3. Khả năng sinh chitinase và cellulase của 4 chủng *Trichoderma* phân lập

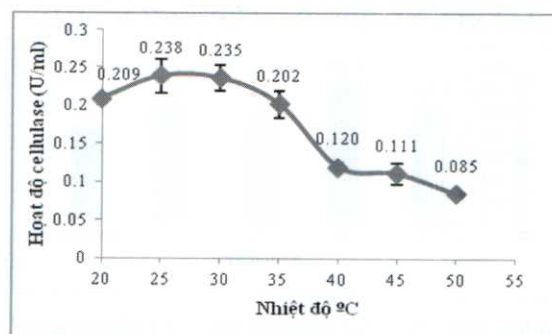
Kí hiệu	Kích thước vòng thủy phân chitin (mm)	Kích thước vòng thủy phân cellulose (mm)
T0	40	60
T2	30	40
T3	30	40
T4	80	100

Với kết quả từ Bảng 3, cả 4 chủng phân lập đều có khả năng sinh chitinase và cellulase tuy nhiên chủng *Trichoderma* T4 sinh enzyme mạnh hơn hẳn.

3.3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng các yếu tố đến khả năng sinh cellulase ở chủng T4

3.3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

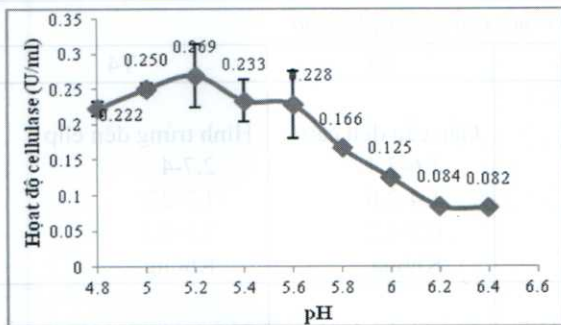
Sử dụng CMC làm nguồn carbon để khảo sát sự ảnh hưởng của các yếu tố nhiệt độ, pH nuôi cấy đến khả năng sinh enzyme. Giống bổ sung là các bào tử thu nhận sau khi nuôi cấy trên môi trường PDA sao cho dịch nuôi cấy ban đầu chứa khoảng 10^6 bào tử/ml.

**Hình 4.** Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp cellulase chủng T4

Chủng T4 phát triển mạnh ở nhiệt độ 30°C và không phát triển ở 40°C, tuy nhiên khi khảo sát sự ảnh hưởng đối với khả năng sinh enzyme cellulase, quan sát đồ thị Hình 4 thấy rằng 25°C là nhiệt độ thích hợp, hoạt độ enzyme đạt cao nhất là $0,238 \pm 0,022$ U/ml. Bên cạnh đó, hoạt độ enzyme là tương đối ổn định trong khoảng từ 25 đến 30°C, đây là khoảng nhiệt độ dao động thường thấy ở Đà Nẵng. Điều này cho thấy khả năng ứng dụng cao của chủng T4 vào điều kiện thực tế.

3.3.2. Ảnh hưởng pH

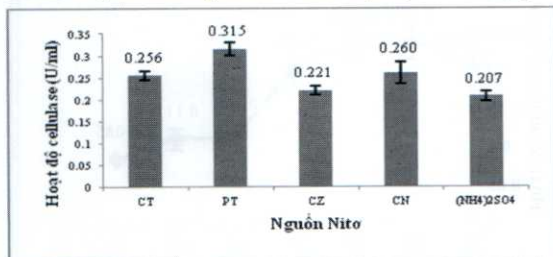
Chủng nấm *Trichoderma* phát triển trong khoảng pH khá rộng từ 2,5 đến 9,5, phát triển tốt nhất từ 4,5 – 6,5, do đó việc khảo sát sự ảnh hưởng của yếu tố pH được thực hiện trong khoảng này. Sau khi nuôi cấy ở nhiệt độ 25°C trong thời gian là 7 ngày, từ đồ thị Hình 5 cho thấy hoạt độ enzyme cao nhất ở giá trị pH=5,2 là $0,269 \pm 0,044$ U/ml.



Hình 5. Ảnh hưởng của pH nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp cellulase chủng T4.

3.3.3. Ảnh hưởng nguồn nitrogen

Nguồn nitơ sử dụng trong nghiên cứu bao gồm cao thịt (CT), peptone (PT), Casein (Cz), cao nấm men (CN) và muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Từ Hình 6 thấy rằng môi trường dinh dưỡng chứa muối nitơ vô cơ cho hoạt tính enzyme sinh tổng hợp thấp nhất, có sự chênh lệch không đáng kể hoạt tính enzyme giữa môi trường dinh dưỡng chứa các nguồn nitơ còn lại, riêng đối với môi trường dinh dưỡng chứa peptone hoạt tính enzyme cao nhất đạt $0,315 \pm 0,015$ U/ml. Tác giả Baig khi nghiên cứu ảnh hưởng nguồn nitơ đến sinh tổng hợp enzyme nhờ giống *Trichoderma lignorum* cũng cho kết quả rằng nguồn peptone thích hợp cho sinh tổng hợp cellulase, đặc biệt là đối với nguồn peptone từ đậu nành cho hoạt tính enzyme cao nhất đạt 0,31 U/ml [1].



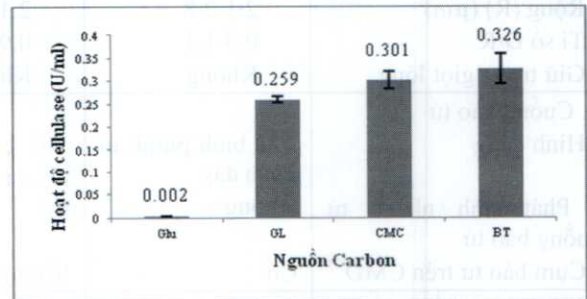
Hình 6. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến khả năng sinh tổng hợp cellulase

3.3.4. Ảnh hưởng nguồn carbon

Để làm rõ sự ảnh hưởng của nguồn carbon đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của *Trichoderma* phân lập, chúng tôi sử dụng glucose, giấy lọc, CMC, bã thải nấm, lượng bổ sung vào môi trường là 1%w/v. Riêng đối với bã thải nấm sấy đến khối lượng không đổi, sau đó mới bổ sung vào môi trường dinh dưỡng, lên men bán rắn, nguồn carbon thích hợp cho chủng phân lập sinh cellulase gồm có giấy lọc, CMC, bã thải nấm, tuy nhiên trên bã thải nấm lượng enzyme cellulase tổng hợp cao hơn hẳn là $0,326 \pm 0,034$ U/ml (Hình 7).

Từ Hình 7 thể hiện nguồn C thích hợp sinh cellulase là bã thải nấm. Trong môi trường sống tự nhiên, ngoài nguồn cellulose còn có rất nhiều thành phần như các polysaccharide các nguyên tố khoáng, yếu tố kích thích tăng trưởng... vi sinh vật sinh trưởng phát triển, tiết enzyme sẽ tốt hơn bất kỳ môi trường tổng hợp nào [2]. Nguồn bã thải nấm là phế phẩm sau trồng nấm, ngoài nguồn cellulose, hemicellulose còn các thành phần khác, trong đó

bao gồm cả các khuẩn ty, sinh khối nấm ăn còn sót lại đây cũng là nguồn cung cấp dinh dưỡng khoáng, nitơ..., ngoài ra còn có các vi sinh vật khác phát triển, chúng phân hủy các thành phần khác nhau tạo ra các chất dinh dưỡng, các yếu tố kích thích sản sinh enzyme,... nên việc tổng hợp enzyme cellulase trên cơ chất tự nhiên sẽ cho hiệu quả cao.



Hình 7. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến khả năng sinh tổng hợp cellulase

4. Kết luận

Như vậy nghiên cứu này đã phân lập được 4 chủng nấm *Trichoderma* có khả năng sinh chitinase và cellulase. Trong đó chủng T4 sinh enzyme cellulase mạnh với hoạt tính cao nhất đạt 0,326 U/ml khi chủng T4 được nuôi lên men bán rắn trên nguồn cơ chất bã thải trồng nấm, nguồn nitrogen là pepton, ở nhiệt độ 25°C, pH của môi trường 5,2. Hơn nữa, chủng T4 được phân lập trên vùng đất chứa bã thải nấm tại địa bàn Đà Nẵng, nên có thể sử dụng để sinh tổng hợp cellulase từ nguồn bã thải nấm, là nguồn cơ chất vừa rẻ tiền, tận dụng được phế phẩm của nghề trồng nấm ăn, góp phần giảm thiểu ô nhiễm môi trường tại địa phương.

Tài liệu tham khảo

- [1] Baig M M V, Cellulolytic enzymes of *Trichoderma lignorum* produced on banana agro-waste optimisation of culture medium and condition, *Journal of Scientific & Industrial Research*, Vol.64, January 2005, pp 57-60.
- [2] Duff S J B, 1987, Effect of media composition and growth conditions on production of cellulase and glucosidase by a mixed fungal fermentation, *enzyme Microbiol Technol* 9, 45-52.
- [3] Ghose T K, 1987, Measurement of cellulose activities, *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 59, No. 2, pp. 257-268.
- [4] Gary E. Harman., 2000, *Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp., Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system), Cornell University, Geneva, NY 14456.
- [5] Grondona I., Hermosa R., Tejada M., Gomis M.D., Mateos P.F., Bridge P.D., Monte E. and Garcia-Acha I., 1997, Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, (8):3189.
- [6] Nguyễn Đức Lương, Phan Thị Huyền, Nguyễn Ánh Tuyết, *Thí nghiệm công nghệ sinh học tập II*, NXB ĐHQG TP. Hồ Chí Minh, 2003, Trang 121-125.
- [7] Samuels, G. J., P. Chaverri, D. F. Farr and E. B. McCray, 2006, *Trichoderma online*, Systematic Botany and Mycology Lab., ARS, USA.
- [8] <http://vietsciences.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/vinam01a.htm>; Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Liên Hoa, Lê Hoàng yễn, Nguyễn Văn Bắc (23 tháng 6 năm 2006) "Vi nấm (Microfungi)". Chương trình Vi sinh vật (bằng tiếng việt), *mục Nấm sợi 01*. Vietsciences. Truy cập ngày 10 tháng 6 năm 2011.