

Nghiên cứu sàng lọc các chủng nấm *Trichoderma* phân lập từ đất trồng nghệ vàng (*Curcuma longa*) tại Hưng Yên trong xử lý bã thải sau chế biến nghệ vàng

Vũ Xuân Tạo^{1*}, Lê Thu Hương^{1,2}, Trần Bảo Trâm¹, Đào Ngọc Ánh¹, Lê Thị Hoàng Yến¹, Đỗ Mai Linh¹

¹Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ, 25 Lê Thánh Tông, phường Phan Chu Trinh, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

²Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 21/3/2023; ngày chuyển phản biện 24/3/2023; ngày nhận phản biện 17/4/2023; ngày chấp nhận đăng 20/4/2023

Tóm tắt:

Tình hình trồng và chế biến nghệ vàng (*Curcuma longa*) đang ngày càng được mở rộng, kéo theo đó là lượng lớn phụ phẩm bã nghệ vàng chưa được xử lý gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng. Nấm *Trichoderma* được coi là nguồn vi sinh vật xử lý phụ phẩm nông nghiệp hiệu quả do có khả năng sinh tổng hợp nhiều loại enzym ngoại bào cao. Trong nghiên cứu này, 15 chủng nấm *Trichoderma* được phân lập từ đất trồng nghệ vàng tại tỉnh Hưng Yên, trong đó tuyển chọn được 4 chủng nấm HYT11, HYT12, HYT13 và HYT14 có khả năng sinh tổng hợp cellulase, amylase và protease cao. Dựa trên các đặc điểm hình thái đặc trưng và trình tự gen vùng ITS rDNA, 3 chủng nấm HYT11, HYT12, HYT13 được xác định thuộc loài *Trichoderma asperellum*, còn HYT14 thuộc loài *Trichoderma harzianum*. Cả 4 chủng nấm này đều có khả năng sinh trưởng và hình thành bào tử trên cơ chất bã nghệ vàng. Đồng thời, nghiên cứu cũng xác định được điều kiện thích hợp cho sự hình thành bào tử của 4 chủng nấm, bao gồm môi trường dinh dưỡng chứa dịch chiết khoai tây (200 g/l) bổ sung 2% glucose, 1% pepton, 2% agar, nuôi 7 ngày ở 30°C. Như vậy, nghiên cứu đã tuyển chọn được 4 chủng nấm *Trichoderma* HYT11, HYT12, HYT13 và HYT14 có tiềm năng ứng dụng trong xử lý bã thải sau chế biến nghệ vàng.

Từ khóa: amylase, bã nghệ vàng, cellulase, *Curcuma longa*, protease, *Trichoderma*.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Cây nghệ vàng thuộc họ gừng (*Zingiberaceae*), được trồng ở nhiều quốc gia khác nhau như Trung Quốc, Ấn Độ, Indonesia, Việt Nam... có công dụng làm gia vị và nguyên liệu cho ngành dược. Đặc biệt, củ nghệ vàng được coi là nguồn nguyên liệu chủ yếu cho sản xuất curcumin - hoạt chất có nhiều ứng dụng trong y học như kháng ung thư, tác dụng điều trị với các bệnh tự miễn, thần kinh, tim mạch, tiểu đường [1]. Chính vì vậy, những năm gần đây diện tích trồng nghệ vàng liên tục được mở rộng. Tại Việt Nam, cây nghệ vàng được trồng tại nhiều tỉnh như Yên Bái, Đắk Lắk, Hưng Yên... Tại Hưng Yên, cây nghệ vàng được quy hoạch trồng nhiều tại huyện Khoái Châu với diện tích trồng nghệ vàng khoảng 300 ha, sản lượng hàng năm trên 9.000 tấn củ, tập trung ở các xã như Chí Tân, Tứ Dân... Việc phát triển các vùng trồng nghệ vàng đã hình thành nên các vùng nguyên liệu gắn liền với chế biến và tiêu thụ. Tuy nhiên, việc chế biến nghệ vàng chủ yếu diễn ra tại các cơ sở thu mua nhỏ với hoạt động chính là thu mua, sơ chế, nghiền củ để thu tinh bột nghệ vàng và curcumin. Củ nghệ vàng chứa khoảng 6,3% protein, 5,1% chất béo, 3,5% khoáng, 69,4% carbohydrat... Phụ phẩm trong quá trình sản xuất tinh bột nghệ vàng và curcumin thải ra rất lớn, đặc biệt là bã nghệ vàng. Nguồn phụ phẩm bã thải này chứa thành phần chủ yếu cellulose, tinh bột [2], chúng là nguy cơ gây ô nhiễm môi trường cao nếu nguồn bã thải này không được xử lý.

Việc ứng dụng vi sinh vật xử lý các nguồn phụ phẩm trong chế biến và sản xuất nông nghiệp thành phân hữu cơ vi sinh là biện pháp hiệu quả, không những tạo ra nguồn phân bón chất lượng cao

mà còn giải quyết được vấn đề dư thừa nguồn phụ phẩm gây ô nhiễm môi trường. Nhiều loài vi nấm đã được nghiên cứu sử dụng vào việc phân giải các chất hữu cơ làm phân bón, trong đó chi nấm *Trichoderma* được đánh giá là một chi nấm an toàn và có khả năng sinh tổng hợp nhiều loại enzym ngoại bào phân giải chất hữu cơ như cellulase, amylase, protease [3-5]. Nhiều nghiên cứu đã tiến hành phân lập, tuyển chọn các chủng nấm *Trichoderma* có hoạt tính sinh enzym ngoại bào cao dùng cho phân giải các loại phụ phẩm như rơm rạ, bã thải trồng nấm làm phân bón [6, 7]. Nguồn phân bón tạo ra đã được chứng minh có hiệu quả tốt khi bón cho giống Đậu xanh 208 [6], hiệu quả cao khi bón cho rau với năng suất rau tăng 20,34%, đặc biệt là tỷ lệ sâu bệnh giảm 15% [7]. Hơn nữa, đây là chi nấm có hoạt tính đối kháng với một số nấm gây bệnh cũng như kích thích sinh trưởng ở cây trồng [8].

Việc ứng dụng các chủng nấm *Trichoderma* trong xử lý bã thải sau chế biến nghệ vàng chưa có nhiều nghiên cứu đề cập. Trong củ nghệ vàng chứa nhiều curcumin và tinh dầu dẫn tới phần bã thải sau chế biến sẽ chứa một lượng nhất định các thành phần này. Curcumin và tinh dầu nghệ vàng là các thành phần có hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm mạnh [9, 10], do đó, điều kiện đầu tiên cần có đối với các chủng vi sinh vật dùng cho xử lý bã nghệ vàng là phải có khả năng sinh trưởng mạnh trên nguồn bã thải này. Hơn nữa, mục đích của việc tuyển chọn các chủng nấm *Trichoderma* là dùng cho xử lý bã nghệ vàng làm phân bón sử dụng cho chính cây nghệ vàng tại các vùng trồng nghệ vàng chuyên canh, vì vậy đối tượng dùng để phân lập các chủng nấm là các mẫu đất vùng rễ cây nghệ vàng khỏe

*Tác giả liên hệ: Email: taovx.tsa@gmail.com

Screening *Trichoderma* strains isolated from soil growing *Curcuma longa* in Hung Yen province for treating waste after turmeric processing

Xuan Tao Vu^{1*}, Thu Huong Le^{1,2}, Bao Tram Tran¹,
Ngoc Anh Dao¹, Thi Hoang Yen Le¹, Mai Linh Do¹

¹Center for Experimental Biology, National Center for Technological Progress, Ministry of Science and Technology, No. 25 Le Thanh Tong Street, Phan Chu Trinh Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

²National Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi, 334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 21 March 2023; revised 17 April 2023; accepted 20 April 2023

Abstract:

The cultivation and processing of turmeric are developing, resulting in a large amount of turmeric waste causing serious environmental pollution. *Trichoderma* fungi are potential microbial sources for agricultural waste treatment thanks to their ability to synthesise several extracellular enzymes. In this study, 15 strains of *Trichoderma* were isolated from turmeric-growing soil in Hung Yen province. Among them, 4 strains, which were named HYT11, HYT12, HYT13, and HYT14, were found to have a high potential for synthesising cellulase, amylase, and protease enzymes. Based on morphological characteristics and ITS rDNA sequence analysis, 3 strains (HYT11, HYT12, and HYT13) were identified as *Trichoderma asperellum* and the strain HYT14 was identified as *Trichoderma harzianum*. All four strains showed the ability to grow and form conidia on turmeric waste. The study also determined the optimal conditions for the conidia formation of these strains, including a nutrient medium containing potato extract (200 g/l) supplemented with 2% glucose, 1% peptone, and 2% agar, and the cultivation of 7 days at 30°C. In summary, the research has selected four *Trichoderma* strains, HYT11, HYT12, HYT13, and HYT14, which are promising for application in treating turmeric waste.

Keywords: amylase, cellulase, *Curcuma longa*, protease, *Trichoderma*, turmeric waste.

Classification number: 4.6

manh. Đây là nghiên cứu khá mới với các kết quả bước đầu đánh giá được tiềm năng ứng dụng các chủng nấm *Trichoderma* phân lập từ đất trồng nghệ vàng trong xử lý bã thải sau chế biến nghệ vàng.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Các mẫu đất vùng rễ cây nghệ vàng sinh trưởng tốt được thu thập sử dụng cho phân lập các chủng nấm *Trichoderma*. Các mẫu được bảo quản trong túi nilon sạch. Sau khi thu thập, mẫu được đưa ngay về phòng thí nghiệm để phân lập.

Mẫu bã nghệ vàng được thu thập tại một số cơ sở chế biến tinh bột nghệ vàng. Mẫu được bảo quản trong túi nilon sạch và lưu giữ ở 4°C.

Các mẫu đất và bã nghệ vàng được thu thập tại vùng chuyên canh và chế biến nghệ vàng ở xã Chí Tân, huyện Khoái Châu, tỉnh Hưng Yên. Thời gian thu mẫu từ tháng 1 đến tháng 6/2022.

2.2. Phân lập và xác định đặc điểm hình thái các chủng nấm *Trichoderma*

Các mẫu đất thu thập được tiến hành pha loãng ở các nồng độ từ 10⁻¹ đến 10⁻⁵ bằng nước cất đã khử trùng. Cây trái các mẫu đã pha loãng trên môi trường PDA có bổ sung kháng sinh chloramphenicol (100 µg/ml) để ức chế vi khuẩn. Các đĩa được nuôi ở 28°C trong 3-5 ngày để thu nhận các khuẩn lạc nấm riêng rẽ. Các khuẩn lạc có các đặc trưng như sợi nấm màu trắng, bào tử có màu xanh hoặc xanh vàng được tách riêng, nuôi cấy thuần khiết và giữ trong ống nghiệm thạch nghiêng PDA. Hình thái hệ sợi nấm và cường độ sinh bào tử của mỗi chủng nấm được xác định bằng cách nuôi cấy trực tiếp mỗi chủng nấm trên bề mặt tiêu bản hiển vi vô trùng có chứa sẵn môi trường PDA trong 2-3 ngày ở 28°C và quan sát dưới kính hiển vi [11].

2.3. Thu bào tử nấm

Các chủng nấm *Trichoderma* được nuôi cấy trên môi trường PDA ở 25-28°C sau 3-5 ngày để thu bào tử nấm. Quy trình thu bào tử nấm *Trichoderma* được tiến hành theo T.X. Vu và cs (2018) [11]. Nồng độ của dịch bào tử được xác định bằng buồng đếm Thoma.

2.4. Đánh giá khả năng sinh cellulase, amylase và protease của các chủng nấm phân lập

Các chủng nấm *Trichoderma* được tiến hành lên men xốp để thu dịch enzym thô theo V.H. Vu và cs (2011) [12] có cải tiến. Môi trường lên men xốp bao gồm: 5 g vỏ trấu, 0,2% chất cảm ứng (Carboxymethyl cellulose - CMC, tinh bột, sữa gầy) và bổ sung 10 ml nước cất chứa trong hộp nhựa hình trụ (650 ml và đường kính 9 cm) được khử trùng. Mỗi hộp môi trường được cấy 1 ml dịch bào tử nấm (10⁶ bào tử/ml) và tiến hành nuôi ở 30°C. Sau 3 ngày nuôi, bổ sung 10 ml nước cất, lắc đều và thu phần dịch enzym thô. 50 µl dịch enzym thô được nhỏ vào giếng đã đục sẵn trên môi trường thạch chứa 1% cơ chất tương ứng. Đĩa được ủ ở nhiệt độ 4°C trong 4 giờ để dịch enzym khuếch tán và ủ tiếp 12 giờ ở 30°C. Sử dụng dung dịch Lugol để hiện vòng phân giải đối với dịch cellulase và amylase thô [13].

Xác định hoạt độ cellulase và amylase trong dịch enzym thô theo quy trình của G.L. Miller (1959) [14], hoạt độ protease được xác định theo M.L. Anson (1938) [15].

2.5. Định danh các chủng nấm *Trichoderma* dựa trên trình tự vùng ITS của rDNA

Các chủng nấm được tiến hành nuôi cấy trong môi trường PDB ở 28-30°C trong 3 ngày để thu hệ sợi nấm dùng cho tách chiết DNA tổng số. DNA tổng số của các chủng nấm được tách chiết theo quy trình của V.T. Tran và cs (2017) [16]. Vùng ITS rDNA được khuếch đại từ mẫu DNA tổng số mỗi chủng nấm bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGC-GG)/ITS4 (TCC TCCGCTTATTGATATGC) [17]. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 0,7%, sau đó được tinh sạch bằng bộ kit tinh sạch DNA của Hãng Promega (Mỹ). Mẫu DNA thu được sau tinh sạch được tiến hành giải trình tự tại Công ty 1st BASE (Singapore). Trình tự gen sau khi giải được so sánh với cơ sở dữ liệu trên GenBank (NCBI). Phần mềm MEGA6 được sử dụng để xây dựng cây phát sinh loài [18].

2.6. Đánh giá khả năng sinh trưởng và hình thành bào tử của các chủng nấm *Trichoderma* trên nguồn cơ chất bã nghệ vàng

Thí nghiệm được bố trí trong các hộp nhựa có nắp đậy, hình trụ (650 ml), mỗi hộp chứa 100 g môi trường gồm bã nghệ vàng và 1% ri đường, độ ẩm môi trường đạt 80-85%. Các hộp chứa môi trường được chia làm 2 lô thí nghiệm, gồm lô không khử trùng và lô khử trùng. Tiến hành cấy 1 ml dịch bào tử (10^6 bào tử/ml) mỗi chủng nấm *Trichoderma* đều lên bề mặt môi trường. Các hộp ở 2 lô thí nghiệm được ủ ở 30°C trong 10 ngày. Tiến hành quan sát sự sinh trưởng của các chủng nấm ở cả 2 lô thí nghiệm, xác định mật độ bào tử nấm bằng phương pháp pha loãng môi trường sau 10 ngày ủ và cấy trải trên môi trường TSM (môi trường chọn lọc cho nấm *Trichoderma*) [19, 20]. Đồng thời trước khi cấy nấm, môi trường ở 2 lô thí nghiệm (khử trùng và không khử trùng) được tiến hành xác định hàm lượng curcuminoid và tinh dầu. Hàm lượng curcuminoid (gồm các loại curcumin I, II, III) được xác định bằng phương pháp quang phổ UV theo S. Revathy và cs (2016) [21]. Hàm lượng tinh dầu được xác định theo phương pháp chưng cất lôi kéo hơi nước trên hệ thống Clevenger [22].

2.7. Xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sự hình thành bào tử đối với các chủng nấm *Trichoderma*

Điều kiện nuôi cấy tối ưu đối với mỗi chủng nấm *Trichoderma* được xác định bằng cách so sánh mật độ bào tử nấm thu được của mỗi chủng nấm ở các điều kiện khác nhau. $10 \mu\text{l}$ dịch bào tử mỗi chủng nấm (10^6 bào tử/ml) được cấy vào giữa đĩa môi trường (đĩa petri Ø9) và nuôi ở các điều kiện thử nghiệm, sau đó bổ sung 15 ml nước cất đã khử trùng lên mỗi đĩa để thu dịch bào tử. Quá trình thu bào tử nấm *Trichoderma* được tiến hành theo quy trình của T.X. Vu và cs (2018) [11]. Mật độ bào tử nấm được xác định bằng cách đếm trên buồng đếm Thoma. Các điều kiện tối ưu bao gồm: nguồn cacbon (môi trường PDA được thay thế nguồn cacbon (glucose) lần lượt là sucrose, maltose, glucose, lactose và tinh bột với lượng thay thế là 2%, điều kiện nuôi là 25°C trong 5 ngày); hàm lượng nguồn cacbon là 1, 2, 3 và 4%; nguồn nitơ là pepton, cao nấm men, bột

đậu tương với hàm lượng 1%; hàm lượng nguồn nitơ là 0,25, 0,5, 1 và 2%; nhiệt độ nuôi cấy là 25, 30 và 35°C; thời gian nuôi cấy là 5, 7, 10 và 12 ngày.

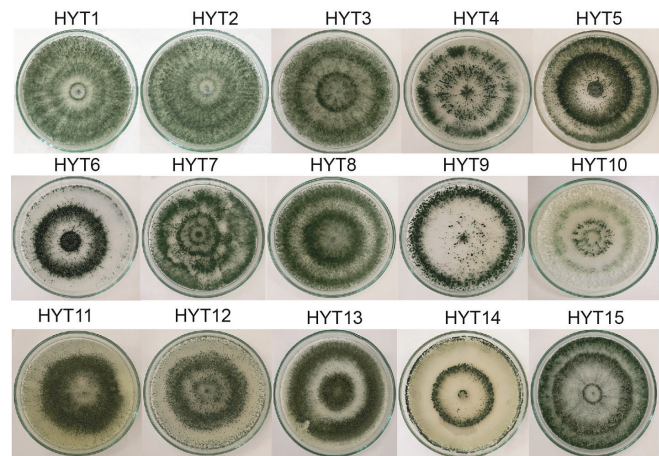
2.8. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê sinh học bằng phần mềm Excel 2016.

3. Kết quả và bàn luận

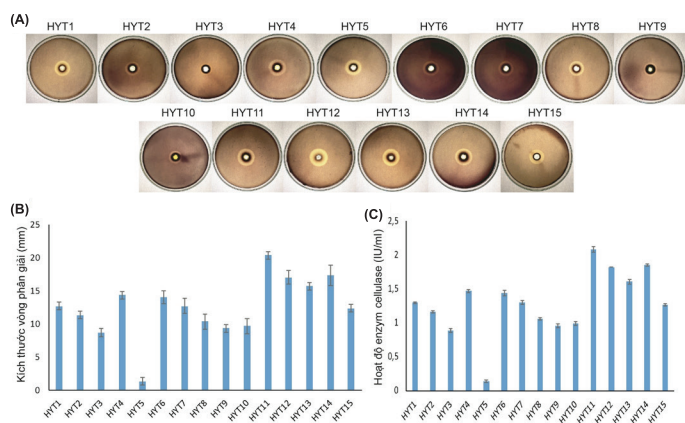
3.1. Phân lập và tuyển chọn các chủng nấm *Trichoderma* sinh cellulase, amylase và protease cao

Từ các mẫu đất thu thập, 15 chủng nấm có đặc điểm hình thái giống với nấm *Trichoderma* đã được phân lập. Trên môi trường thạch PDA, sau 5 ngày ở 28°C, hệ sợi của các chủng nấm đã phát triển thành các vòng đồng tâm, lan phủ toàn bộ bề mặt đĩa thạch, trên hệ sợi nấm hình thành bào tử màu xanh nhạt tới đậm (hình 1). Đây là các đặc điểm điển hình của chi nấm *Trichoderma* [23].

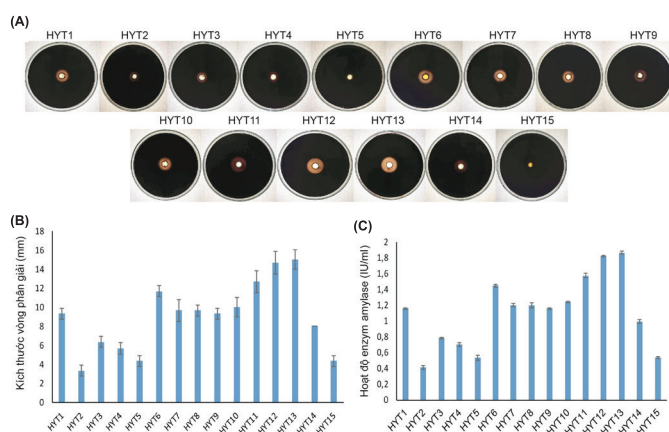


Hình 1. Hình thái khuẩn lạc các chủng nấm có đặc điểm hình thái giống *Trichoderma* phân lập từ đất trồng nghệ vàng trên môi trường PDA.

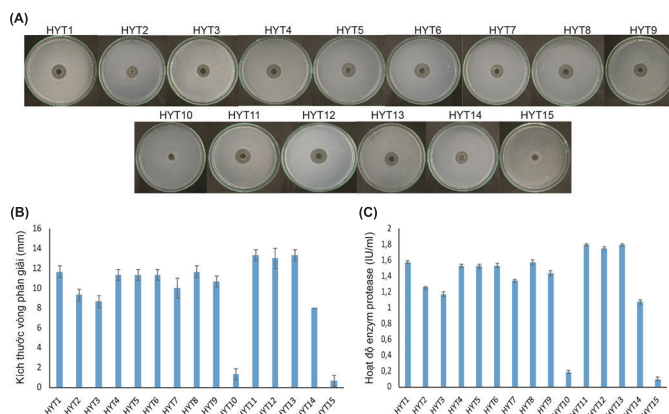
Kết quả xác định kích thước vòng phân giải cơ chất CMC và hoạt độ cellulase cho thấy, 4 chủng nấm *Trichoderma* HYT11, HYT12, HYT13 và HYT14 có khả năng sinh cellulase mạnh nhất (hình 2). Tương tự, nghiên cứu này cũng cho thấy, 3 chủng nấm *Trichoderma* HYT11, HYT12, HYT13 có khả năng sinh tổng hợp mạnh amylase và protease (hình 3 và 4). Nấm *Trichoderma* đã được chứng minh có khả năng sinh một số enzym ngoại bào cao như cellulase, amylase, protease [3-5]. Nghiên cứu này nhằm tuyển chọn các chủng nấm *Trichoderma* xử lý nguồn bã nghệ vàng làm phân bón hữu cơ vi sinh cho chính cây nghệ vàng. Do đó, việc có được các chủng nấm *Trichoderma* bản địa từ đất vùng rễ cây nghệ vàng là định hướng ưu tiên. Trong khi đó, các nghiên cứu tuyển chọn chủng nấm *Trichoderma* từ đất vùng rễ cây nghệ vàng có khả năng sinh enzym ngoại bào cao chưa được thực hiện. Vì vậy, với kết quả nghiên cứu đạt được, 4 chủng nấm *Trichoderma* HYT11, HYT12, HYT13 và HYT14 được lựa chọn sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 2. Khả năng sinh cellulase của các chủng nấm *Trichoderma* phân lập từ đất trồng nghệ vàng tại Hưng Yên. (A) Vòng phân giải trên môi trường chứa 1% CMC; (B) Kích thước vòng phân giải; (C) Hoạt độ cellulase.



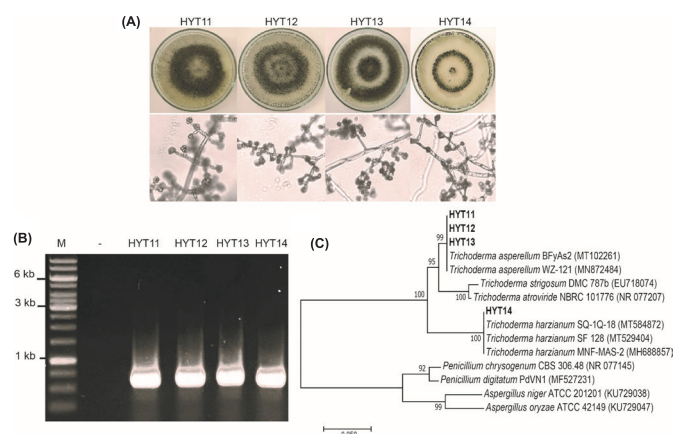
Hình 3. Khả năng sinh amylase của các chủng nấm *Trichoderma* phân lập từ đất trồng nghệ vàng tại Hưng Yên. (A) Vòng phân giải trên môi trường chứa 1% tinh bột; (B) Kích thước vòng phân giải; (C) Hoạt độ amylase.



Hình 4. Khả năng sinh protease của các chủng nấm *Trichoderma* phân lập từ đất trồng nghệ vàng tại Hưng Yên. (A) Vòng phân giải trên môi trường chứa 1% sữa gầy; (B) Kích thước vòng phân giải; (C) Hoạt độ protease.

3.2. Định danh các chủng nấm *HYT11*, *HYT12*, *HYT13* và *HYT14* dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự vùng ITS rDNA

Để đảm bảo độ chính xác tới loài cho 4 chủng nấm *HYT11*, *HYT12*, *HYT13* và *HYT14* dùng cho nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh xử lý bã thải nghệ vàng làm phân bón, 4 chủng nấm này được định danh tới loài dựa vào các đặc điểm về hình thái kết hợp với trình tự vùng ITS rDNA. Trình tự vùng ITS (gồm ITS1, 5,8S rRNA, ITS2) được sử dụng phổ biến trong phân loại nấm do đây là vùng trình tự có mức độ biến đổi cao khi so sánh giữa các loài gần gũi [24]. Trên môi trường PDA, hệ sợi của 4 chủng nấm *HYT11*, *HYT12*, *HYT13*, *HYT14* đều hình thành và phát triển thành các vòng đồng tâm, lan phủ toàn bộ bề mặt đĩa thạch, trên hệ sợi nấm hình thành bào tử màu xanh nhạt tới đậm. Hệ sợi các chủng nấm có cấu trúc phân nhánh, trên cuống sinh bào tử hình thành các bào tử hình chài đặc trưng của chi nấm *Trichoderma* [23] (hình 5A). DNA tổng số của 4 chủng nấm trên được tiến hành tách chiết từ hệ sợi nấm dùng cho phản ứng PCR khuếch đại trình tự vùng ITS rDNA với cặp mồi đặc hiệu ITS1/ITS4. Kết quả khuếch đại vùng ITS rDNA của 4 chủng nấm chỉ cho 1 băng DNA duy nhất, có kích thước khoảng hơn 500 bp (hình 5B). Kết quả phân tích cho thấy, 3 chủng nấm *HYT11*, *HYT12*, *HYT13* thuộc loài *T. asperellum*, chủng nấm *HYT14* thuộc loài *T. harzianum* với độ tương đồng về trình tự ITS rDNA 99-100% (hình 5C). Theo các nghiên cứu đã công bố [8, 23] và hướng dẫn số 90/679/EWG của Cộng đồng châu Âu về an toàn sinh học, 2 loài nấm *T. asperellum* và *T. harzianum* được xếp vào mức độ an toàn cấp 1, được sử dụng cho sản xuất chế phẩm sinh học dùng cho cây trồng.

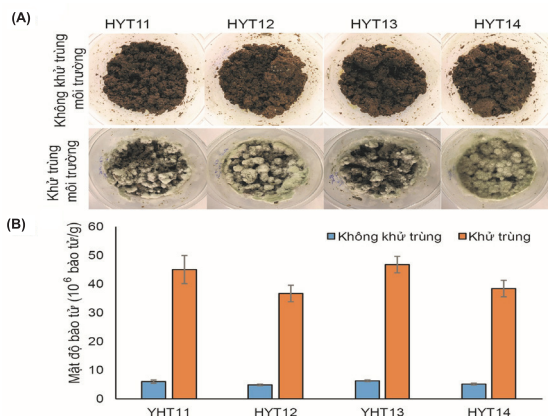


Hình 5. Định danh các chủng nấm *Trichoderma* dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự vùng ITS rDNA. (A) Hình thái hệ sợi, cấu trúc sinh bào tử; (B) Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR vùng ITS rDNA; (C) Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự vùng ITS rDNA, M: 1 kb DNA marker.

3.3. Khả năng sinh trưởng và hình thành bào tử của các chủng nấm *Trichoderma* trên nguồn cơ chất bã nghệ vàng

Bốn chủng nấm tuyển chọn *T. asperellum* *HYT11*, *HYT12*, *HYT13* và *T. harzianum* *HYT14* là những chủng nấm có hoạt tính sinh các enzym ngoại bào cao như cellulase, amylase, protease. Tuy nhiên, để có thể ứng dụng các chủng nấm này trong xử lý bã nghệ vàng thì điều kiện đầu tiên cần có là các chủng nấm này phải có khả năng sinh trưởng và hình thành bào tử trên nguồn cơ chất bã nghệ vàng.

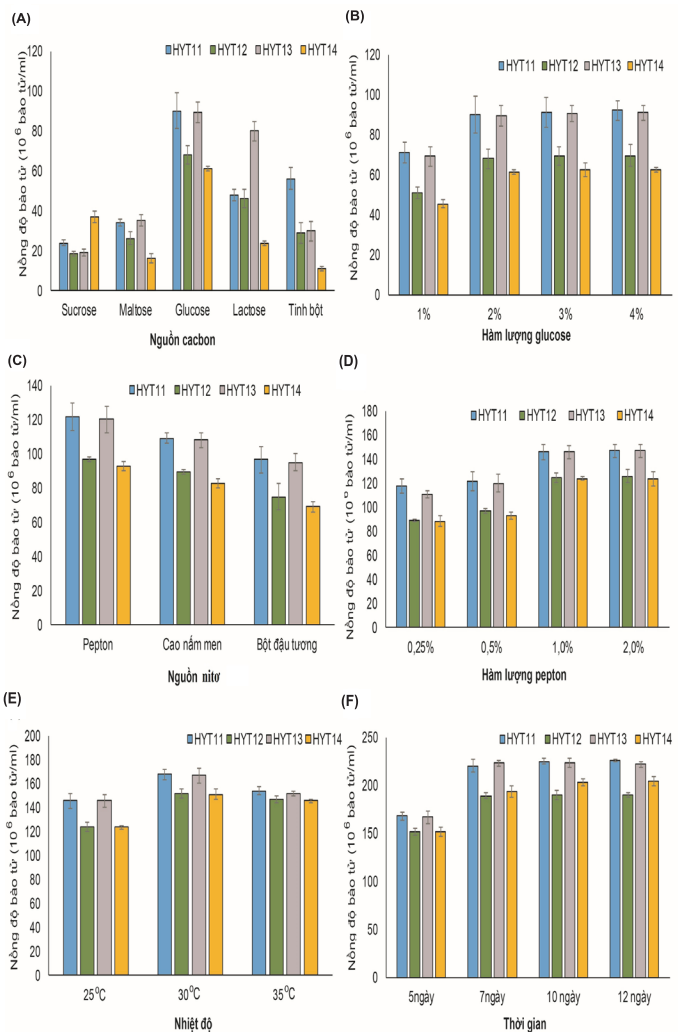
năng sinh trưởng trên nguồn cơ chất bã nghệ vàng. Trong nghiên cứu này, 4 chủng nấm *Trichoderma* tuyển chọn được đánh giá khả năng sinh trưởng và hình thành bào tử trên nguồn cơ chất bã nghệ vàng có bổ sung 1% ri đường. Ri đường là thành phần thường được bổ sung vào các công thức ủ các loại phụ phẩm làm phân bón nhằm cung cấp nguồn cacbon ban đầu cho vi sinh vật phát triển, lượng ri đường bổ sung thường là 1-5% [25, 26]. Kết quả cho thấy, cả 4 chủng nấm đều có khả năng sinh trưởng trên môi trường chứa bã nghệ vàng chưa khử trùng, sau 10 ngày nuôi cấy hệ sợi nấm đã xuất hiện trên bề mặt môi trường (hình 6A). Mật độ bào tử trung bình của 4 chủng nấm *T. asperellum* HYT11, HYT12, HYT13 và *T. harzianum* HYT14 trên môi trường bã nghệ vàng không khử trùng đạt tương ứng là 6×10^6 , $4,8 \times 10^6$, $6,3 \times 10^6$ và $5,2 \times 10^6$ bào tử/g (hình 6B). Hơn nữa, trên môi trường đã khử trùng, các chủng nấm sinh trưởng rất mạnh, hệ sợi nấm bao phủ toàn bộ bề mặt môi trường sau 10 ngày nuôi cấy (hình 6A). Mật độ bào tử trung bình của 4 chủng nấm thử nghiệm trên môi trường bã nghệ vàng đã khử trùng sau 10 ngày đạt tương ứng là 45×10^6 , 37×10^6 , 47×10^6 và 38×10^6 bào tử/g. Kết quả này bước đầu cho thấy, việc xử lý nhiệt (khử trùng) bã nghệ vàng sẽ tạo điều kiện cho sự phát triển của nấm *Trichoderma*. Đồng thời trong nghiên cứu này, các mẫu môi trường bã nghệ vàng (không khử trùng và khử trùng) trước khi cấy nấm đã được xác định hàm lượng curcuminoid và tinh dầu, đây là các thành phần có hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm mạnh [8, 9]. Kết quả phân tích cho thấy, hàm lượng curcuminoid trong mẫu không khử trùng và khử trùng không có sự chênh lệch nhiều, hàm lượng tương ứng là 0,022 và 0,02%. Trong khi đó, việc khử trùng môi trường đã làm bay hơi hết tinh dầu, cụ thể trong môi trường chưa khử trùng lượng tinh dầu được xác định là 0,5%, trong khi đó môi trường bã nghệ vàng khử trùng tinh dầu đã không còn. Kết quả này có thể cho thấy, bã nghệ vàng nếu được xử lý nhiệt thích hợp thì tiềm năng hiệu quả xử lý bằng nấm *Trichoderma* sẽ cao hơn. Tuy nhiên, vấn đề này cần được nghiên cứu sâu hơn để xác định được phương pháp xử lý nhiệt hiệu quả và phù hợp với thực tế. Với kết quả đạt được cho thấy, cả 4 chủng *T. asperellum* HYT11, HYT12, HYT13 và *T. harzianum* HYT14 đều có tiềm năng ứng dụng trong xử lý bã nghệ vàng.



Hình 6. Khả năng sinh trưởng và hình thành bào tử của các chủng nấm *Trichoderma* trên nguồn cơ chất bã nghệ vàng. (A) Các chủng nấm sinh trưởng trên nguồn cơ chất bã nghệ vàng; (B) Khả năng hình thành bào tử sau 10 ngày nuôi cấy.

3.4. Điều kiện nuôi cấy thích hợp cho hình thành bào tử đối với các chủng nấm *Trichoderma*

Mật độ bào tử là thông số quan trọng hàng đầu đối với việc sản xuất chế phẩm nấm *Trichoderma*. Trong khi đó, môi trường dinh dưỡng, nhiệt độ, thời gian nuôi cấy... là các yếu tố quan trọng, ảnh hưởng tới khả năng hình thành bào tử ở nấm *Trichoderma* [27]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các chủng nấm *Trichoderma* hình thành bào tử mạnh nhất trên môi trường với nguồn cacbon là 2% glucose, nguồn nitơ là 1% pepton và nuôi ở 30°C trong 7 ngày (hình 7). Ở điều kiện nuôi cấy thích hợp với môi trường gồm dịch chiết khoai tây 200 g/l, glucose 2%, 1% pepton và agar 2%, nuôi ở 30°C trong 7 ngày, lượng bào tử thu được của 4 chủng *T. asperellum* HYT11, HYT12, HYT13 và *T. harzianum* HYT14 lần lượt là 220×10^6 , 189×10^6 , 222×10^6 và 193×10^6 bào tử/ml. Các điều kiện nuôi cấy này sẽ là cơ sở khoa học quan trọng để thiết lập quy trình sản xuất bào tử 4 chủng nấm trên ở quy mô sản xuất để tạo chế phẩm xử lý nguồn bã thải sau chế biến nghệ vàng.



Hình 7. Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy tới khả năng hình thành bào tử các chủng nấm *Trichoderma*. (A) Nguồn cacbon; (B) Hàm lượng glucose; (C) Nguồn nitơ; (D) Hàm lượng pepton; (E) Nhiệt độ; (F) Thời gian.

4. Kết luận

Từ các mẫu đất trồng nghệ vàng tại tỉnh Hưng Yên đã phân lập được 15 chủng nấm *Trichoderma*, trong đó 4 chủng nấm HYT11, HYT12, HYT13 và HYT14 có khả năng sinh tổng hợp cellulase, amylase, protease cao. Dựa trên các đặc điểm hình thái và trình tự gen vùng ITS rDNA, 3 chủng nấm HYT11, HYT12, HYT13 được xác định thuộc loài *T. asperellum*, chủng nấm HYT14 thuộc loài *T. harzianum*. Tất cả 4 chủng nấm này đều có khả năng sinh trưởng và hình thành bào tử trên cơ chất bã nghệ vàng trong điều kiện phòng thí nghiệm. Điều kiện thích hợp cho sự hình thành bào tử của 4 chủng nấm *Trichoderma* bao gồm, môi trường dinh dưỡng chứa dịch chiết khoai tây (200 g/l) bổ sung 2% glucose, 1% pepton, 2% agar, nuôi 7 ngày ở 30°C. 4 chủng nấm *Trichoderma* HYT11, HYT12, HYT13 và HYT14 có tiềm năng ứng dụng trong xử lý bã nghệ vàng.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ nhiệm vụ KH&CN cấp tỉnh Hưng Yên và sự hỗ trợ về trang thiết bị của Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B. Kocaadam, N. Şanlıer (2017), "Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **57**(13), pp.2889-2895, DOI: 10.1080/10408398.2015.1077195.
- [2] A. Kumar, J. Dora, A. Singh (2011), "A review on spice of life *Curcuma longa* (turmeric)", *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, **2**(4), pp.371-379.
- [3] P. Liu, A. Lin, G. Zhang, et al. (2019), "Enhancement of cellulase production in *Trichoderma reesei* RUT-C30 by comparative genomic screening", *Microbial Cell Factories*, **18**(1), pp.1-16, DOI: 10.1186/s12934-019-1131-z.
- [4] W.H. Abdulaal (2018), "Purification and characterization of α -amylase from *Trichoderma pseudokoningii*", *BMC Biochemistry*, **19**(1), pp.1-6, DOI: 10.1186/s12858-018-0094-8.
- [5] L. Kredics, Z. Antal, A. Szekeres, et al. (2005), "Extracellular proteases of *Trichoderma* species", *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, **52**(2), pp.169-184, DOI: 10.1556/amicro.52.2005.2.3.
- [6] T.T. Le (2012), "Selection of *Trichoderma* spp. strongly decompose cellulose to produce microbial organic fertilizer and study their effects on green bean variety 208 in the spring 2011 crop at Huong Long cooperative, Hue city", *Journal of Science, Hue University*, **17**(2), pp.203-214 (in Vietnamese).
- [7] N.T. Minh (2016), "Research on treatment of mushroom by-products as safe organic substrate for growing vegetables", *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, **14**(11), pp.1781-1788 (in Vietnamese).
- [8] M. Verma, S.K. Brar, R.D. Tyagi, et al. (2007), "Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control", *Biochemical Engineering Journal*, **37**(1), pp.1-20, DOI: 10.1016/j.bej.2007.05.012.
- [9] Y. Hussain, W. Alam, H. Ullah, et al. (2022), "Antimicrobial potential of curcumin: Therapeutic potential and challenges to clinical applications", *Antibiotics*, **11**(3), pp.322-343, DOI: 10.3390/antibiotics11030322.
- [10] Z. Parveen, S. Nawaz, S. Siddique, et al. (2013), "Composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of *Curcuma longa* L. Kasur variety", *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **75**(1), pp.117-122, DOI: 10.4103/0250-474X.113544.
- [11] T.X. Vu, T.T. Ngo, L.T.D. Mai, et al. (2018), "A highly efficient *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation system for the postharvest pathogen *Penicillium digitatum* using *DsRed* and *GFP* to visualize citrus host colonization", *Journal of Microbiological Methods*, **144**, pp.134-144, DOI: 10.1016/j.mimet.2017.11.019.
- [12] V.H. Vu, T.A. Pham, K. Kim (2011), "Improvement of fungal cellulase production by mutation and optimization of solid-state fermentation", *Mycobiology*, **39**(1), pp.20-25, DOI: 10.4489/MYCO.2011.39.1.020.
- [13] P. Yang, H. Zhang, L. Cao, et al. (2016), "Construction of *Aspergillus niger* integrated with cellulase gene from *Ampullaria gigas* Spix for improved enzyme production and saccharification of alkaline-pretreated rice straw", *3 Biotech*, **6**(2), pp.1-10, DOI: 10.1007/s13205-016-0545-0.
- [14] G.L. Miller (1959), "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", *Analytical Chemistry*, **31**(3), pp.426-428, DOI: 10.1021/ac60147a030.
- [15] M.L. Anson (1938), "The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin", *The Journal of General Physiology*, **22**(1), pp.79-89, DOI: 10.1085/jgp.22.1.79.
- [16] V.T. Tran, T.B.X.L. Do, T.K. Nguyen, et al. (2017), "A simple, efficient and universal method for the extraction of genomic DNA from bacteria, yeasts, molds and microalgae suitable for PCR-based applications", *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, **59**(4), pp.66-74, DOI: 10.31276/VJSTE.59(4).66.
- [17] T.J. White, T. Bruns, S. Lee, et al. (1990), "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics", *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, **18**(1), pp.315-322.
- [18] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, et al. (2013), "MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0", *Molecular Biology and Evolution*, **30**(12), pp.2725-2729, DOI: 10.1093/molbev/mst197.
- [19] Y. Elad, I. Chet, Y. Henis (1981), "A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil", *Phytoparasitica*, **9**, pp.59-67, DOI: 10.1007/BF03158330.
- [20] N.T. Phuong (2018), "Producing and evaluating the effectiveness of microbial organic fertilizer from wastewater sludge from beer factories and seafood processing factories on vegetable productivity", *Journal of Science, University of Science and Technology, Can Tho University*, **54**, pp.81-89 (in Vietnamese).
- [21] S. Revathy, S. Elumalai (2016), "Evaluation of curcuminoids in turmeric rhizome (*Curcuma longa* L.) collected from different places in India", *Biosciences Biotechnology Research Asia*, **8**(1), pp.259-264.
- [22] T.B. Tram (2022), "Chemical composition and ability to resist *Malassezia* fungus that causes disease on human skin of tulsi essential oil (*Ocimum sanctum* L.) grown in Hanoi", *Journal of Science and Technology Vietnam - MOST*, **64**(5), pp.26-30 (in Vietnamese).
- [23] L. Li, Q. Qu, B. Tian, et al. (2005), "Induction of chlamydo spores in *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium roseum* by antifungal compounds produced by *Bacillus subtilis* C2", *Journal of Phytopathology*, **153**(11-12), pp.686-693, DOI: 10.1111/j.1439-0434.2005.01038.x.
- [24] J. Curran, F. Driver, J.W.O. Ballard, et al. (1994), "Phylogeny of *Metarhizium*: Analysis of ribosomal DNA sequence data", *Mycological Research*, **98**(5), pp.547-552, DOI: 10.1016/S0953-7562(09)80478-4.
- [25] D.D. Hieu, L.C.N. Phuong, V.T.K. Thanh, et al. (2012), "Production of bio-organic fertilizer from sawdust waste after mushroom harvest and livestock waste", *Journal of Biology*, **34**(3), pp.154-160 (in Vietnamese).
- [26] T.T. Lua, N.T. Nguyet, N.V. Hiep, et al. (2021), "Isolation and selection of microbial strains used for treating pangasius sludge as organic fertilizer", *Vietnam Journal of Agricultural Science and Technology*, **4**(125), pp.124-130.
- [27] S. Sachdev, A. Singh, R.P. Singh (2018), "Optimization of culture conditions for mass production and bio-formulation of *Trichoderma* using response surface methodology", *3 Biotech*, **8**(8), pp.360-367, DOI: 10.1007/s13205-018-1360-6.