

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC DÒNG NẤM *Trichoderma* spp. CÓ HOẠT TÍNH CELLULASE CAO TRONG ĐIỀU KIỆN MẶN

Trần Thụy Ái Tâm^{1,2}, Trần Thị Ngọc Diệu², Trần Thị Giang¹, Đỗ Tấn Khang^{1*}

¹ Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ, Cần Thơ, Việt Nam

² Trường Đại học Tiền Giang, Tiền Giang, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Đỗ Tấn Khang <dtkhang@ctu.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 09-10-2025; Hoàn thành phản biện: 06-03-2026; Ngày chấp nhận đăng: 13-03-2026)

Tóm tắt. Trước thực trạng biến đổi khí hậu, xâm nhập mặn, việc nghiên cứu tuyển chọn dòng nấm sợi có khả năng chịu mặn và có hoạt tính cellulase cao ứng dụng trong nông nghiệp đang là vấn đề cấp thiết. Mục tiêu của nghiên cứu là tuyển chọn được các dòng nấm *Trichoderma* spp. có hoạt tính cellulase cao và có khả năng chịu mặn. Từ các mẫu đất vùng rẫy cây lúa hoang tại các xã của tỉnh Đồng Tháp, đã phân lập được 110 dòng nấm *Trichoderma* spp. phong phú, đa dạng về hình dạng, màu sắc và có các đặc điểm đặc trưng của loài. Trong đó có 29 dòng sinh tổng hợp enzyme cellulase ngoại bào có hoạt tính CMC (Carboxymethylcellulose) cao với đường kính vòng phân giải CMC dao động từ 25,00 mm đến 33,33 mm. Các dòng nấm tiềm năng đã được chọn để đánh giá khả năng chịu mặn ở nồng độ 0‰, 5‰, 10‰, khi nồng độ muối càng cao thì sự sinh trưởng, phát triển, hoạt tính sinh cellulase của các dòng nấm *Trichoderma* spp. chậm lại. Kết quả tuyển chọn được 3 dòng nấm tiềm năng TP17, TP42 và TP107 có hoạt tính cellulase mạnh ($\Delta D \geq 25$ mm), ở nồng độ muối NaCl 10‰, đường kính vòng phân giải cellulase dao động từ 25,00 mm - 28,00 mm. Kết quả định danh dòng nấm TP107 có độ tương đồng với *Trichoderma asperellum* KC993073.1 là 98,37%.

Từ khóa: *Trichoderma* spp., cellulase, vùng rẫy lúa hoang, chịu mặn

Isolation and selection of *Trichoderma* spp. strains with high cellulase activity under saline conditions

Tran Thuy Ai Tam^{1,2}, Tran Thi Ngoc Dieu², Tran Thi Giang¹, Do Tan Khang^{1*}

¹ Insitute Of Food and Biotechnology, Can Tho University, Cantho, Vietnam

² Tien Giang University, Tiengiang, Vietnam

* Correspondence to Do Tan Khang <dtkhang@ctu.edu.vn>

(Received: 09 October 2025; Revised: 06 March 2026; Accepted: 13 March 2026)

Abstract. In the context of climate change and saltwater intrusion, research on selecting filamentous fungal strains with salt tolerance and high cellulase activity for agricultural applications has become an urgent issue. The objective of this study was to screen *Trichoderma* spp. strains exhibiting high cellulase activity and salt tolerance. From rhizospheric soil samples collected around wild rice plants in communes of Dong Thap Province, a total of 110 *Trichoderma* spp. strains were isolated, showing rich diversity in morphology, color, and characteristic features of the genus. Among them, 29 strains were capable of synthesizing extracellular cellulase enzymes with high CMC (Carboxymethylcellulose)

activity, with the diameter of the hydrolysis zones ranging from 25.00 mm to 33.33 mm. The potential strains were further evaluated for salt tolerance at concentrations of 0‰, 5‰, and 10‰ NaCl. As salt concentration increased, the growth, development, and cellulase production of *Trichoderma* spp. strains decreased. Three potential strains, TP17, TP42, and TP107, were selected for their strong cellulase activity ($\Delta D \geq 25$ mm); at 10‰ NaCl, the cellulase hydrolysis zone diameters ranged from 25,00 mm to 28,00 mm. The identification results showed that strain TP107 exhibited 98.37% similarity to *Trichoderma asperellum* (accession number KC993073.1).

Keywords: Cellulase, rhizosphere of wild rice, salinity tolerance, *Trichoderma* spp.

1 Mở đầu

Hiện nay các hoạt động khai thác tài nguyên nước thượng nguồn, biến đổi khí hậu và nước biển dâng đã và đang gây ra những tác động tiêu cực đến Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), trong đó xâm nhập mặn được xem là một trong những tác động nghiêm trọng nhất [1]. Theo thống kê của Cục thông tin khoa học và công nghệ quốc gia, năm 2011 hạn hán đã làm nước mặn xâm nhập nhiều địa phương vùng ĐBSCL sớm hơn trung bình nhiều năm. Tại một số tỉnh ven biển ĐBSCL, nước biển xâm nhập sâu vào các sông, rạch khiến các dòng sông bị nhiễm mặn từ giữa tháng 2, gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến đời sống người dân và hoạt động sản xuất nông nghiệp. Năm 2016, ĐBSCL tiếp tục hứng chịu thiệt hại nặng nề với diện tích lúa bị ảnh hưởng trên 160.000 ha, hoa màu trên 7.000 ha và số hộ dân bị ảnh hưởng là 400.000 hộ. Đến năm 2020, hạn mặn lại xảy ra với cường độ và quy mô lớn hơn, ranh giới ảnh hưởng bởi độ mặn lớn hơn 4 g/l chiếm diện tích 1.688.600 ha [2, 3]. Nồng độ muối cao làm đất kém màu mỡ, giảm khả năng giữ nước, giảm đa dạng sinh học, gây hại cho sự phát triển của cây trồng và hệ sinh thái. Ngoài ra, ĐBSCL có khoảng 50% diện tích đất phèn mặn chiếm khoảng 70% diện tích đất nông nghiệp của khu vực. Việc nghiên cứu, tuyển chọn vi sinh vật có khả năng chịu mặn thích nghi với điều kiện khí hậu khắc nghiệt phục vụ cải tạo đất trồng rất cần thiết.

Trong tế bào thực vật, cellulose là thành phần chiếm tỉ lệ cao nhất. Hằng năm, có đến hàng

tỉ tấn cellulose tích lũy trong đất dưới dạng rác thải hữu cơ thực vật hoặc do chính thực vật thải ra trong quá trình sinh trưởng phát triển [4, 5]. Tuy nhiên, việc phân hủy cellulose bằng phương pháp vật lý và hóa học phức tạp, tốn kém và gây độc hại cho môi trường. Trong khi đó, việc xử lý các chất thải hữu cơ chứa cellulose bằng công nghệ sinh học, đặc biệt sử dụng các enzyme cellulase ngoại bào từ vi sinh vật sẽ có nhiều ưu điểm về cả mặt kỹ thuật, kinh tế và môi trường. Mặt khác, việc ứng dụng enzyme cellulase để xử lý phế phụ phẩm nông nghiệp, đồng thời tạo ra các sản phẩm phụ như thức ăn gia súc, cồng sinh học, biogas, ... đang là hướng phát triển tiềm năng của công nghệ sinh học [6].

Chi nấm đóng vai trò quan trọng trong nông nghiệp bằng cách phân hủy các sản phẩm phụ và quản lý chất thải môi trường. Nấm *Trichoderma* spp. hiện nay đang phổ biến và phân bố rộng rãi trên toàn thế giới, hiện diện gần như trong tất cả các loại đất và trong một số môi trường sống khác với mật độ cao. Nấm có nhiều cơ chế kiểm soát bệnh hại thực vật như: Cạnh tranh dinh dưỡng, tạo chất kháng sinh hay tiết enzyme thủy phân vách tế bào ký chủ (glucanases, chitinases, cellulases,...), đóng vai trò quan trọng trong việc phân hủy chất hữu cơ trong đất [7–9]. Nhiều dòng nấm tiết ra lượng cellulase cao hơn so với vi khuẩn, trong đó *Trichoderma* spp. là dòng dẫn đầu [10]. Hầu hết các cellulase thương mại là các enzyme ưa nhiệt do nấm sợi *Trichoderma reesei* sản xuất. Quá trình này cho thấy, nấm sợi là những chất tiết protein ngoại bào hiệu quả và có thể sản xuất các enzyme

cellulase công nghiệp với số lượng khả thi. Vì sản xuất enzyme cellulase rất tốn kém, nên việc sử dụng phụ phẩm nông nghiệp có thể cung cấp chất nền rẻ hơn để giảm tổng chi phí.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguồn phân lập nấm

Nấm *Trichoderma* spp. được phân lập từ đất vùng rễ cây lúa hoang thu được tại các xã Tân Hòa, Tân Điền, Gia Thuận, Tân Đông, Tân Thới, Gò Công Đông, Tân Phú Đông, tỉnh Đồng Tháp.

2.2 Hóa chất và môi trường

Môi trường TSM (*Trichoderma* Specific Medium): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g; K_2HPO_4 0,9 g; KCl 0,15 g; NH_4NO_3 1 g; Glucose 3 g; Agar 20 g; Chloramphenicol: 500 mg; nước cất (vừa đủ) 1000 mL.

Môi trường PDA (Potato Dextrose Agar): Khoai tây 200 g, Dextrose 20 g, Agar 20 g, nước cất 1000 mL.

Chloramphenicol, Congo Red, NaCl.

2.3 Phương pháp phân lập nấm *Trichoderma* spp.

Phương pháp này được thực hiện dựa trên mô tả của Kumar và cs [11]. Cân 1 g đất cho vào 9 mL nước cất vô trùng được mẫu pha loãng có nồng độ 10^{-1} . Vortex đều trong 15 - 30 phút. Hút 1 mL dịch từ mẫu pha loãng nồng độ 10^{-1} vào 9 mL nước cất vô trùng trộn đều được nồng độ pha loãng 10^{-2} , tiếp tục cho đến ống nghiệm cuối cùng có nồng độ 10^{-5} . Hút 0,1 mL dung dịch ở 3 nồng độ pha loãng 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} và trang đều lên đĩa môi trường TSM có bổ sung kháng sinh chloramphenicol. Các đĩa được ủ ở $28 \pm 2^\circ C$ trong 96 giờ. Lựa chọn các khuẩn lạc riêng rẽ cấy chuyển sang môi trường PDA đến khi chỉ còn một loại khuẩn lạc. Nấm *Trichoderma* spp. được giám

định sơ bộ dựa vào hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào khi quan sát bằng kính hiển vi quang học ở vật kính 100 X. Các mẫu nấm thuần được bảo quản ở $4^\circ C$ và được sử dụng trong quá trình nghiên cứu.

2.4 Phương pháp xác định hình thái nấm *Trichoderma* spp.

Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào của các dòng phân lập được đánh giá theo phương pháp của [12]. Đặc điểm khuẩn lạc bao gồm hình dạng, màu sắc. Đặc điểm tế bào bao gồm sợi nấm, cuống bào tử, thể bình, bào tử.

2.5 Phương pháp khảo sát hoạt tính cellulase của nấm *Trichoderma* spp.

Cấy nấm *Trichoderma* spp. vào môi trường PDA chứa CMC 2%. Đĩa sau khi cấy được ủ ở $28 \pm 2^\circ C$ trong 24 giờ. Sau 24 giờ nuôi cấy, nhiệt độ ủ sẽ được nâng lên $37^\circ C$ trong 3 - 5 ngày nhằm hạn chế sự lan rộng của khuẩn lạc và thu vòng phân giải CMC tối đa. Xác định đường kính vòng tròn phân hủy bằng cách đổ ngập dung dịch Congo Red vào đĩa trong 30 phút và rửa bằng dung dịch NaCl 1 M. Có vòng sáng halo thì vi nấm có khả năng phân hủy CMC, không có vòng sáng thì vi nấm không phân hủy CMC.

Chỉ tiêu theo dõi: Xác định hoạt tính CMC bằng cách đo kích thước vòng phân giải (D - d, mm): D - d ≥ 25 mm: Hoạt tính mạnh; D - d ≥ 20 mm: Hoạt tính khá mạnh; D - d ≥ 15 mm: Hoạt tính trung bình; D - d < 15 mm: Hoạt tính yếu. Trong đó: D là đường kính vòng phân giải, d là đường kính khuẩn lạc [13].

2.6 Phương pháp khảo sát khả năng chịu mặn của nấm *Trichoderma* spp.

Nuôi cấy nấm *Trichoderma* spp. trên môi trường PDA có bổ sung nồng độ muối NaCl là 0‰, 5‰ và 10‰. Dựa vào đường kính khuẩn lạc, thời gian hình thành bào tử, mật số bào tử và hoạt

tính enzyme cellulase để đánh giá ảnh hưởng của độ mặn lên khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm sợi.

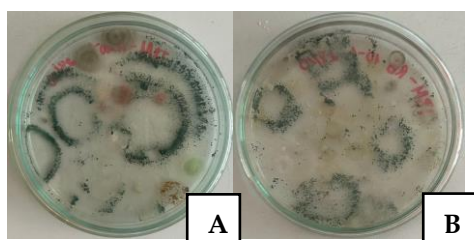
2.7 Phương pháp định danh nấm *Trichoderma* spp.

Chủng nấm được nuôi trong môi trường PD (không có agar) ở $28 \pm 2^\circ\text{C}$, lắc 200 vòng/phút trong 3 ngày. Sau đó, tiến hành chiết tách DNA tổng số. Thực hiện phản ứng PCR khuếch đại DNA vùng ITS của nấm. Cặp mồi có khả năng khuếch đại DNA vùng ITS ở nhiều loài nấm khác nhau gồm:

ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)

ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC).

Sản phẩm PCR được tinh sạch và được giải trình tự DNA bởi Công ty Phù Sa Genomics. Trình tự DNA thu được sau giải trình tự sẽ được phân tích bằng phần mềm BioEdit 7.2, MEGA-X và so sánh với dữ liệu trong Ngân hàng gen Quốc tế (GenBank) sử dụng chương trình BLAST.



2.8 Phương pháp xử lý số liệu

Phần mềm Microsoft Excel 2013 được sử dụng để tính toán, ghi nhận số liệu. Phần mềm SPSS được dùng để phân tích phương sai ANOVA, kiểm tra mức độ khác biệt ý nghĩa của các nghiệm thức thông qua LSD (Least Significant Difference - Khác biệt có ý nghĩa nhỏ nhất) với mức độ tin cậy 95% ($p = 0,05$)

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Kết quả phân lập nấm *Trichoderma* spp. vùng đất rẫy cây lúa hoang ở tỉnh Đồng Tháp

Mẫu đất từ vùng rẫy cây lúa hoang thu từ các xã: Tân Hòa, Tân Điền, Gia Thuận, Tân Đông, Tân Thới, Gò Công Đông, Tân Phú Đông, tỉnh Đồng Tháp được phân lập trên môi trường TSM có bổ sung kháng sinh chloramphenicol. Sau khi ủ ở $28 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 96 giờ thấy xuất hiện nhiều khuẩn lạc với kích thước, hình dạng, màu sắc khác nhau nhưng chủ yếu là những khuẩn lạc có sợi trắng, bào tử màu xanh hoặc xanh vàng.



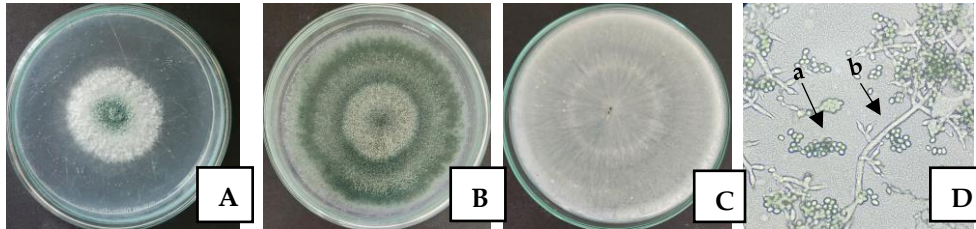
Hình 1. *Trichoderma* spp. phân lập từ vùng rẫy cây lúa hoang tại tỉnh Đồng Tháp và *Trichoderma* spp. phân lập từ chế phẩm sinh học Tricô - ĐHCT trên môi trường TSM (Hình A, B. Mẫu cấy trang từ vùng rẫy cây lúa hoang tại Đồng Tháp. Hình C. Mẫu cấy trang từ chế phẩm Tricô - ĐHCT.)

Kết quả đã phân lập được 110 dòng nấm từ vùng rẫy cây lúa hoang và 1 dòng nấm *Trichoderma* sp. đối chứng được phân lập từ chế phẩm sinh học Tricô - ĐHCT. Kết quả quan sát hình thái cho thấy đa số khuẩn lạc màu trắng, tơ nấm phát triển nhanh sau 24 giờ nuôi cấy. Tiếp tục theo dõi thêm thì sau 48 - 72 giờ nhận thấy chúng chuyển sang xanh lục cho đến xanh đen đậm. Khuẩn lạc có

dạng hình tròn đến gần tròn, một số dòng tạo thành các vòng đồng tâm, mặt sau thường có màu xám trắng, vàng hay xanh đen. Khi quan sát khuẩn ty và bào tử của 110 dòng nấm cho thấy tất cả đều mang đặc trưng của loài *Trichoderma* spp.: Sợi nấm trong suốt có vách ngăn, giá sinh bào tử trần, không có đỉnh phồng to, cuống bào tử có cấu trúc phân nhánh và có hình chai, bào tử đính có

dạng hình trứng, hình oval, trong quá trình phát triển một số dòng nấm tiết sắc tố vàng vào môi trường và có mùi dứa đặc trưng. Kết quả cũng

phù hợp với mô tả đặc điểm hình thái khuẩn lạc cũng như tế bào của một số dòng nấm *Trichoderma* spp. của Shafiquzzaman Siddiquee (2017) [12].



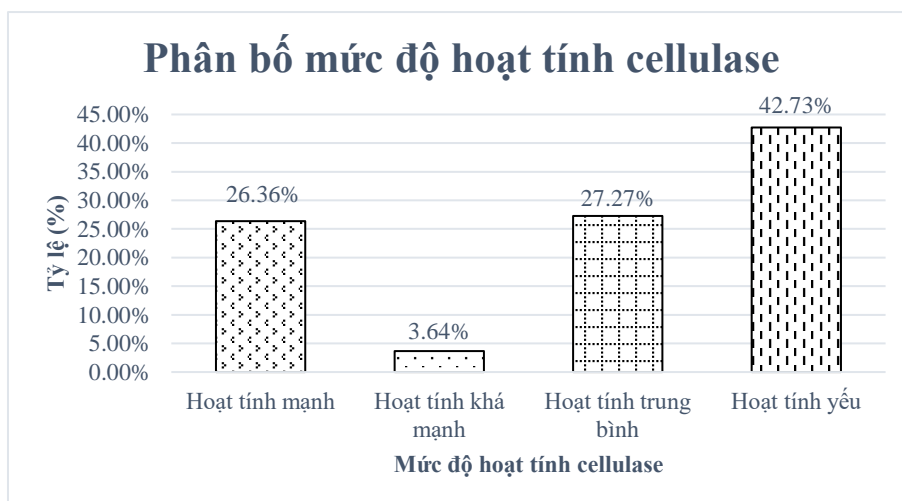
Hình 2. Hình dạng khuẩn lạc và hình dạng tế bào của dòng TP107 được phân lập từ rễ cây lúa hoang (Hình A. Khuẩn lạc sau 24 giờ; Hình B. Mặt trước khuẩn lạc sau 72 giờ; Hình C. Mặt sau khuẩn lạc sau 72 giờ; Hình D. Hình dạng tế bào dưới kính hiển vi 100 X; Hình a. Bào tử; Hình b. Thể bình)

Kết quả cũng tương tự nghiên cứu về các dòng *Trichoderma* spp. được thu thập trên đất vườn tỉnh Bình Dương và đất rừng Langbiang tỉnh Lâm Đồng. Bào tử thường hình thành dày đặc, tạo lớp màu xanh rêu đậm. Bào tử hình thành có mật độ dày đặc, tạo những vòng tròn đồng tâm hướng ra ngoài mép đĩa [14].

Theo nghiên cứu gần đây của Đỗ Việt Phương [15], sự phát triển của nấm *Trichoderma* spp. bắt đầu bằng sự phát triển của các tơ nấm trắng trong 24 giờ đầu, sau 48 giờ thì có màu xanh lục đến 72 giờ thì có màu xanh đậm.

3.2 Kết quả khảo sát hoạt tính cellulase của nấm *Trichoderma* spp. từ các mẫu phân lập được

110 dòng nấm *Trichoderma* spp. đã phân lập được đánh giá khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulase ngoại bào dựa trên khả năng phân giải cellulose trên đĩa thạch với nguồn cơ chất CMC. Trong cùng điều kiện nuôi cấy hoàn toàn giống nhau, dựa trên đường kính vòng phân giải CMC bước đầu phân nhóm nấm sợi có hoạt tính cellulase khác nhau (Hình 3 và hình 4).



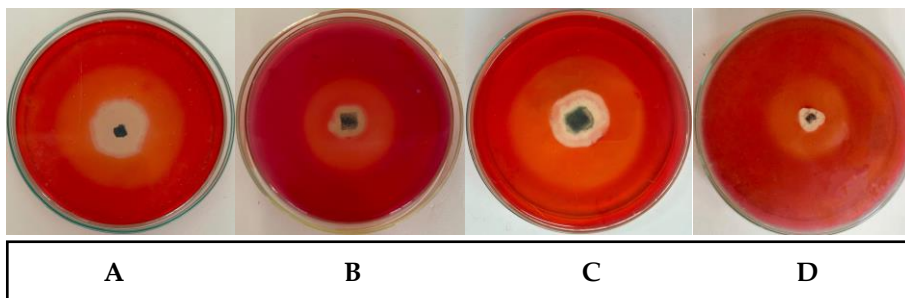
Hình 3. Biểu đồ phân bố mức độ hoạt tính cellulase của 110 dòng nấm *Trichoderma* spp. phân lập được

Hình 3 cho thấy, các dòng nấm *Trichoderma* spp. phân lập và mẫu đối chứng có khả năng phân giải cellulose nhưng ở các mức độ khác

nhau. Kết quả có 84/110 dòng nấm có khả năng sinh enzyme cellulase ngoại bào có khả năng phân giải CMC và tạo thành vòng sáng quanh

khuẩn lạc với đường kính khác nhau dao động từ 0,00 mm đến 33,33 mm. Có 29/110 dòng mạnh (đường kính vòng sáng quanh khuẩn lạc dao động từ 25,00 mm đến 33,00 mm) chiếm 26,36%, 4/110 dòng khá mạnh (đường kính vòng sáng quanh khuẩn lạc dao động từ 20,00 mm đến 25,00 mm) chiếm 3,63%, 30/110 dòng ở mức trung bình

(đường kính vòng sáng quanh khuẩn lạc dao động từ 15,00 mm đến 20,00 mm) chiếm 27,27%, 47/110 dòng nấm có khả năng sinh enzyme cellulase ngoại bào có hoạt tính phân giải CMC ở mức yếu (đường kính vòng sáng quanh khuẩn lạc nhỏ hơn 15 mm) chiếm 42,73%.



Hình 4. Vòng phân giải CMC của các dòng nấm *Trichoderma* spp (Ảnh A: TP1; Ảnh B: TP31; Ảnh C: TP107; Ảnh D: Đối chứng)

Kết quả nghiên cứu về hoạt tính cellulase của 110 dòng nấm *Trichoderma* spp. phân lập được có phần thấp hơn so kết quả nghiên cứu của Phạm Thị Kim Thảo và cs [16], khi *Trichoderma* spp. phân lập từ mẫu ủ rom và bã thải nấm có đường kính vòng phân giải CMC lần lượt là 60 mm và 100 mm. Khả năng sinh cellulase cao của nấm *Trichoderma* spp. là do lượng cellulose có trong mẫu rom và bã thải nấm rất lớn. Kết quả nghiên cứu lại cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Đỗ Viết Phương [15] khi phân lập *Trichoderma* spp. từ quả cà phê mốc có đường kính vòng phân giải CMC trong khoảng 11,7 - 19,8 mm, thân cành cây cà phê mục có đường kính vòng phân giải CMC trong khoảng 12,1 - 17,1 mm. Cellulose có trong quả cà phê chiếm khoảng 25% và trong thân cây chiếm 45%. Các kết quả nghiên cứu đều góp phần khẳng định tác động của nguồn phân lập đến khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulase. Do đó, sự chi phối của thành phần cơ chất cellulose ảnh hưởng đến hoạt động của cellulase.

Nhiều nghiên cứu đã phân lập vi sinh vật để thử khả năng sinh enzyme cellulase từ nhiều nguồn nguyên liệu khác nhau. Theo nghiên cứu của Nguyễn Ngọc Trúc Ngân và Phạm Thị Ngọc

Lan [17] khả năng phân giải cellulose của vi sinh vật phân lập từ vỏ gỗ của nhà máy sản xuất tinh bột sắn cho thấy, mức độ phân giải cellulose khác nhau giữa các dòng vi sinh vật như sau: Nấm mốc có đường kính vòng phân giải 27,00 mm - 28,50 mm, xạ khuẩn có đường kính vòng phân giải 21,00 mm - 24,00 mm, vi khuẩn có đường kính vòng phân giải 23,00 mm - 24,50 mm. Nguyễn Thị Thu Thủy và cs [18] phân lập vi sinh vật phân giải cellulose từ bãi rác, xường mùn cưa và một số vùng đất canh tác ở tỉnh Thừa Thiên Huế có mức độ phân giải cellulose khác nhau giữa các dòng vi sinh vật như sau: Nấm mốc có đường kính vòng phân giải 21,00 mm - 24,00 mm, xạ khuẩn có đường kính vòng phân giải 22,60 mm - 24,30 mm, vi khuẩn có đường kính vòng phân giải 22,80 mm. Theo nghiên cứu của Võ Thị Thu Ngân [19] phân lập vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose từ con mối (*Coptotermes formosanus*) và vỏ sấu riêng cho thấy, 28/33 dòng vi khuẩn sinh enzyme cellulase ngoại bào có khả năng phân giải CMC và tạo thành vòng sáng quanh giếng thạch với đường kính khác nhau dao động từ 11,73 mm đến 35,77 mm. Khi so sánh hoạt tính sinh enzyme cellulase của nấm *Trichoderma* spp. trong nghiên

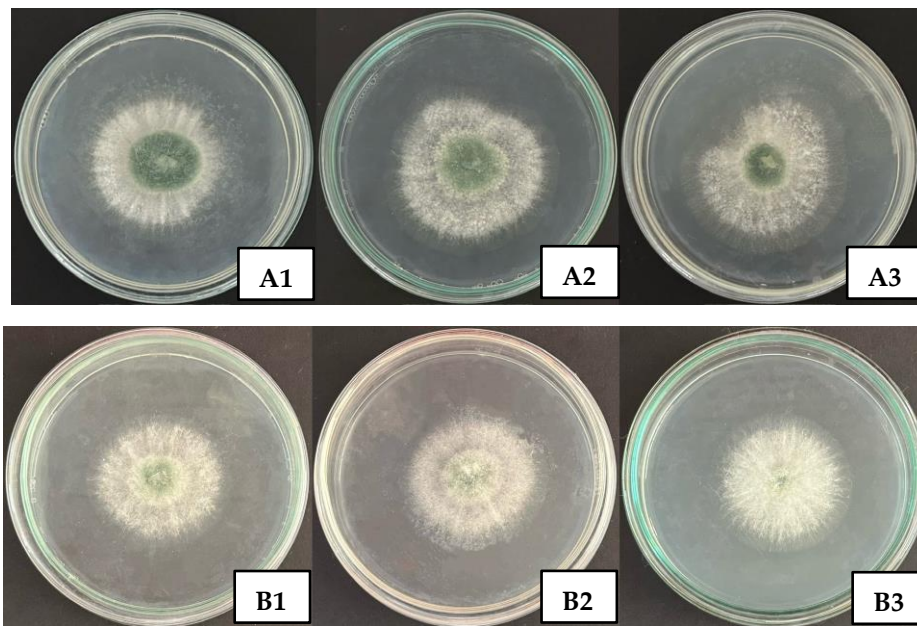
cứu với một số vi sinh vật phân lập từ các nguồn nguyên liệu khác nhau cho thấy, khả năng sinh enzyme cellulase của mẫu nấm phân lập từ vùng đất rẫy cây lúa hoang khá cao. Các dòng nấm *Trichoderma* spp. phân lập từ vùng đất rẫy cây lúa hoang có khả năng phân giải cellulose rất mạnh với đường kính vòng phân giải CMC cao 33,33 mm. Trong khi đó, các nghiên cứu phân lập nấm mốc phân giải cellulose ở các nghiên cứu khác cho đường kính vòng phân giải cao nhất chỉ từ 24,00 mm hoặc 28,50 mm.

Dựa vào đường kính vòng phân giải CMC, 29 dòng nấm có khả năng sinh enzyme ngoại bào phân giải CMC cao đã được lựa chọn để thực hiện thí nghiệm đánh giá khả năng chịu mặn tại các

nồng độ muối khác nhau.

3.3 Kết quả khảo sát và tuyển chọn dòng nấm *Trichoderma* spp. có khả năng chịu mặn

Kết quả khảo sát khả năng chịu mặn của 29 dòng nấm *Trichoderma* spp. thông qua đường kính khuẩn lạc sau 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ nuôi cấy; mật số bào tử sau 72 giờ nuôi cấy và đường kính vòng phân giải cellulase trên môi trường PDA (2% CMC) bổ sung muối NaCl ở 3 nồng độ 0‰, 5‰ và 10‰. Trong đó, chỉ tiêu đường kính vòng phân giải là chỉ tiêu quan trọng nhất, *Trichoderma* spp. có khả năng chịu mặn là dòng nấm có hoạt tính enzyme ngoại bào ổn định trong điều kiện mặn và điều kiện bình thường (Hình 5 và bảng 1).



Hình 5. Đường kính khuẩn lạc của nấm *Trichoderma* spp. sau 48 giờ nuôi cấy trong môi trường bổ sung muối
A: Dòng nấm TP107 ở điều kiện bổ sung NaCl; B: Đối chứng ở điều kiện bổ sung NaCl; B1. Nồng độ 0‰;
B2. Nồng độ 5‰; B3. Nồng độ 10‰

Bảng 1. Đường kính vòng phân giải cellulase của các dòng *Trichoderma* spp. trong môi trường PDA 2% CMC có bổ sung muối

Dòng nấm	Đường kính vòng phân giải (mm)		
	0‰	5‰	10‰
TP1	30,0 ^{cde}	25,2 ^{bc}	21,6 ^{fg}
TP2	26,8 ^{ghi}	18,4 ^{gh}	16,6 ^{ijk}
TP5	24,8 ^{ij}	16,0 ^{jk}	15,2 ^{kl}

Dòng nấm	Đường kính vòng phân giải (mm)		
	0‰	5‰	10‰
TP7	31,8 ^{abc}	27,6 ^a	24,4 ^{cde}
TP14	29,8 ^{de}	26,8 ^{ab}	24,8 ^{bcd}
TP17	32,0^{ab}	28,6^a	25,8^{abc}
TP19	31,0 ^{bcd}	24,6 ^{cd}	23,4 ^{bc}
TP31	31,0 ^{bcd}	27,6 ^a	22,8 ^{efg}
TP33	28,2 ^{efg}	20,6 ^{ef}	17,2 ^{hij}
TP42	32,0^{ab}	28,4^a	26,8^{ab}
TP47	27,4 ^{fg}	22,4 ^{de}	17,8 ^{hi}
TP48	25,0 ^{ij}	14,2 ^{kl}	13,6 ^{lm}
TP59	25,2 ^{hij}	16,2 ^{ijk}	15,2 ^{jkl}
TP62	27,0 ^{gh}	14,4 ^{kl}	12,2 ^{mn}
TP76	24,6 ⁱ	16,4 ^{ijk}	12,2 ^{mn}
TP78	27,4 ^{fg}	16,2 ^{ijk}	13,6 ^{lm}
TP79	27,2 ^{fg}	14,4 ^{kl}	14,6 ^{kl}
TP83	25,0 ^{ij}	17,2 ^{hi}	16,0 ^{ijk}
TP85	27,2 ^{fg}	22,4 ^{de}	19,0 ^{hi}
TP88	25,0 ^{ij}	18,2 ^{gh}	14,0 ^{kl}
TP91	25,2 ^{hij}	16,4 ^{ijk}	14,8 ^{kl}
TP92	29,0 ^{ef}	23,6 ^{cd}	20,2 ^{gh}
TP98	29,0 ^{ef}	27,6 ^a	23,4 ^{def}
TP101	24,8 ^{ij}	13,6 ^l	10,4 ⁿ
TP102	24,8 ^{ij}	14,2 ^{kl}	13,6 ^{lm}
TP107	33,6^a	29,0^a	27,4^a
TP108	24,0 ^s	20,0 ^{fg}	20,8 ^{de}
TP109	25,0 ^{ij}	14,4 ^{kl}	12,2 ^{mn}
TP110	26,8 ^{ghi}	13,6 ^l	10,4 ⁿ
ĐC (Đối chứng)	27,4^{fg}	24,0^{cd}	20,4^{gh}
F	**	**	**
CV (%)	4,9%	8,0%	9,3%

Ghi chú: Means followed by the same letter within a column are not significantly different ($p < 0.01$).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, nồng độ muối NaCl càng cao thì hoạt tính sinh enzyme cellulase của nấm *Trichoderma* spp. phân lập càng giảm. Ba dòng nấm TP107, TP42, TP17 có khả năng phân

giải CMC trong môi trường bổ sung muối 10% cao nhất lần lượt là 27,4 mm; 26,8 mm; 25,8 mm và khác biệt có ý nghĩa 99% so với các dòng nấm còn lại. Khi so sánh đường kính vòng phân giải

CMC với ĐC (20,4 mm) chứng minh được các dòng nấm phân lập trong nghiên cứu vừa chịu được mặn, vừa sinh cellulase cao.

Ba nồng độ muối 0‰, 5‰, 10‰ thì đường kính vòng phân giải CMC của dòng nấm TP17 lần lượt là 32,0 mm, 28,6 mm, 25,8 mm; dòng nấm TP42 là 32,0 mm, 28,4 mm, 26,8 mm; dòng nấm TP107 là 33,6 mm, 29,0 mm, 27,4 mm. 3 dòng nấm TP17, TP42, TP107 là các dòng mạnh vì hoạt tính cellulase ở cả 3 nồng độ muối 0‰, 5‰, 10‰ gần như không khác biệt, đều có đường kính vòng phân giải CMC ở mức mạnh ($\Delta D \geq 25$ mm) và dù ở nồng độ 10‰ thì khả năng sinh cellulase vẫn tương đồng như ở nồng độ 0‰.

Qua kết quả hoạt tính sinh cellulase trong môi trường bổ sung nồng độ muối NaCl ở 3 nồng độ 0‰, 5‰, 10‰ đều thấy được, khi nồng độ muối càng cao thì sự sinh trưởng, phát triển, khả năng sinh cellulase của các dòng nấm *Trichoderma* spp. phân lập càng giảm. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Trần Thị Nguyệt [20] khi phân lập các dòng vi sinh vật chịu mặn có khả năng cố định đạm để sản xuất phân vi sinh cải tạo đất trồng rau. Kết quả đã cho thấy khi nồng độ muối càng tăng thì sự phát triển của vi khuẩn giảm hoặc ngừng phát triển và mật độ tế bào giảm rõ rệt khi nồng độ muối tăng từ 6 đến 10g/L. Điều này có thể được giải thích là do, khi tăng nồng độ NaCl quá cao sẽ tạo ra áp suất thẩm thấu cao trong môi trường, làm cho nước di chuyển ra khỏi tế bào vi sinh vật, gây hiện tượng co nguyên sinh làm giảm hoạt động sống và sự phát triển của vi sinh vật. Nồng độ muối cao tạo ra sự tích tụ ion Na^+ và Cl^- trong môi trường gây stress cho tế bào, các ion này có thể ảnh hưởng đến cân bằng ion nội bào và chức năng màng tế bào, làm gián đoạn quá trình trao đổi chất và truyền tín hiệu trong tế bào, ảnh hưởng đến sự sống còn của vi sinh vật. Nồng độ muối cao làm thay đổi cấu trúc màng tế bào và làm giảm tính thẩm thấu của màng, ảnh hưởng đến khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng và loại bỏ các chất thải, gây giảm hiệu suất trao đổi

chất và phát triển của tế bào. Ngoài ra, nồng độ muối cao có thể ức chế hoạt động của các enzyme trong tế bào vi sinh vật, làm gián đoạn quá trình chuyển hóa, sinh trưởng. Các enzyme có thể bị biến tính hoặc mất chức năng ở nồng độ muối cao.

Các khảo sát về đường kính khuẩn lạc, mật số bào tử nhằm mục đích đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển của các dòng nấm *Trichoderma* spp. trong các điều kiện có bổ sung muối NaCl với nồng độ khác nhau. Tuy nhiên, hoạt tính sinh enzyme cellulase là chỉ tiêu quan trọng để đánh giá khả năng chịu mặn của dòng nấm, dòng *Trichoderma* spp. được tuyển chọn là dòng mặc dù trong điều kiện nồng độ NaCl cao vẫn có khả năng sinh cellulase cao nhằm mục đích sử dụng enzyme cellulase để phân hủy chất nền trong điều kiện mặn. Vì vậy, kết quả tuyển chọn được 3 dòng sinh cellulase mạnh nhất trong điều kiện bổ sung muối NaCl ở cả 3 nồng độ là TP107, TP42 và TP17.

3.4 Kết quả định danh nấm

Dòng nấm TP107 có kết quả phân giải cellulase mạnh nhất trong điều kiện mặn được chọn để giải trình tự gene. Kết quả giải trình tự gene ITS1 và ITS4 dòng nấm có 601 nucleotide. Kết quả cho thấy dòng nấm TP107 có trình tự tương đồng với các trình tự gene của ngân hàng gene NCBI với độ tương đồng là khoảng 98,37% (Hình 6). Cụ thể, dòng nấm TP107 tương đồng với các trình tự gene dòng nấm sau *Trichoderma asperellum* KC993073.1. Kết quả này cũng tương ứng với đặc điểm hình thái (cuống bào tử phân nhánh và có đôi, với các thể bình sắp xếp tỏa tròn và bào tử có hình cầu đến gần cầu) đã được mô tả.

Theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Kim Loan và cs [21], đã phân lập và xác định chủng vi nấm từ đất khu vực chứa rác thải ở Chợ Xuân Hòa và Cao Minh, Phúc Yên, Vĩnh Phúc là dòng *Trichoderma asperellum* SP2.



Hình 6. Kết quả giải trình tự và tìm kiếm trình tự tương đồng ITS1 và ITS4 trên NCBI

4 Kết luận

Từ các mẫu đất từ vùng rễ cây lúa hoang đã phân lập được 110 dòng nấm *Trichoderma* spp. phong phú, đa dạng về hình dạng, màu sắc và đa số có các đặc điểm đặc trưng của loài như sợi nấm có vách ngăn, giá sinh bào tử trần, không có đỉnh phồng to, cuống bào tử có cấu trúc phân nhánh và có hình chai, bào tử đính có dạng hình trứng, hình oval.

Có 84/110 dòng nấm có khả năng sinh enzyme cellulase ngoại bào có khả năng phân giải CMC. Trong đó, 29 dòng nấm có khả năng sinh enzyme cellulase ngoại bào có hoạt tính phân giải

CMC rất mạnh với đường kính vòng phân giải CMC ≥ 25 mm dao động từ 25,00 mm đến 33,33 mm và các dòng nấm này được tuyển chọn để nghiên cứu đánh giá khả năng chịu mặn, chịu phèn tại các nồng độ khác nhau.

Kết quả khảo sát khả năng chịu mặn cho thấy trong môi trường bổ sung muối NaCl ở 3 nồng độ 0%, 5%, 10%, khi nồng độ muối càng cao thì sự sinh trưởng, phát triển, hoạt tính sinh cellulase của các dòng nấm *Trichoderma* spp. phân lập được càng giảm. Trong đó, tuyển chọn được 3 dòng nấm tiềm năng TP107, TP42 và TP17 có hoạt tính sinh enzyme cellulase mức mạnh ($\Delta D \geq 25$ mm) ở cả 3 nồng độ muối. Kết quả phân tích

BLAST trình tự ITS cho thấy dòng TP107 có độ tương đồng cao (98,37%) với các loài thuộc chi *Trichoderma*, đặc biệt là *T. asperellum*, với E-value bằng 0.0.

Tài liệu tham khảo

1. Sơn DH, Lương BH, Định NA, Phương TA. Nghiên cứu đánh giá tác động kép của biến đổi khí hậu và các phát triển thượng nguồn đến xâm nhập mặn vùng Đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khí tượng Thủy văn. 2024;763:13-23.
2. Anh TN, Bình NT, Tùng NB, Đức ĐĐ, Huy ND, Điền NH. Xây dựng công cụ đánh giá ảnh hưởng của xâm nhập mặn đến kinh tế - xã hội và áp dụng tính thử nghiệm cho Đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học Biến đổi khí hậu. 2021;17:20-29.
3. Định LX, Quân NM, Tuấn PA. Xâm nhập mặn tại Đồng bằng sông Cửu Long: Nguyên nhân, tác động và các giải pháp ứng phó. Cần Thơ: Cục Thông tin Khoa học và Công nghệ Quốc gia; 2016.
4. Heinze T, El Seoud OA, Koschella A. Production and Characteristics of Cellulose from Different Sources. In: Heinze T, El Seoud OA, Koschella A, editors. Cellulose Derivatives: Synthesis, Structure, and Properties. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 1-38.
5. Li H, Zhang M, Zhang Y, Xu X, Zhao Y, Jiang X, et al. Characterization of cellulose-degrading bacteria isolated from silkworm excrement and optimization of its cellulase production. Polymers. 2023;15(20):4142.
6. Duyên PTM. Khảo sát khả năng thủy phân bã mía và carboxymethyl cellulose của vi khuẩn được phân lập từ dạ cỏ cừu (*Ovis aries*) [Luận văn tốt nghiệp Đại học]. Cần Thơ: Trường Đại học Cần Thơ; 2012.
7. Alexander M. Microbial ecology. New York: John Wiley & Sons; 1971. P. 207-223.
8. Harman GE, Kubicek CP. *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. London (UK): Taylor and Francis; 1998.
9. Kredics L, Antal Z, Manczinger L, Szekeres A, Kevei F, Nagy E. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. Food Technol Biotechnol. 2003;41(1):37-42.
10. Amouri B, Gargouri A. Characterization of a novel β -glucosidase from a *Stachybotrys* strain. Biochem Eng J. 2006;32(3):191-197.
11. Kumar K, Amaresan N, Bhagat S, Madhuri K, Srivastava RC. Isolation and characterization of *Trichoderma* spp. for antagonistic activity against root rot and foliar pathogens. Indian J Microbiol. 2012;52(2):137-144.
12. Siddiquee S. Practical handbook of the biology and molecular diversity of *Trichoderma* species from tropical regions. Singapore: Springer; 2017.
13. Shin JY, Lee DY, Yoon JI, Song YS. Effect of CMC concentration on cell growth behavior of PVA/CMC hydrogel. Macromol Res. 2020;28:813-819.
14. Bình LM, Hải TN, Thanh MTNL. Đánh giá khả năng phân hủy hệ sợi lục bình *Eichhornia crassipes* bằng chủng nấm *Trichoderma* sp. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Thủ Dầu Một. 2016;2(27):25-31.
15. Phương ĐV. Thu nhận enzyme cellulase từ nấm mốc phân lập được từ một số nguồn cà phê trồng ở Việt Nam. Tạp chí Khoa học và Công nghệ. 2024;68:76-86.
16. Thảo PTK, Xuân NTM, Long ĐĐ. Nghiên cứu phân lập nấm *Trichoderma* và khảo sát khả năng sinh enzyme, ứng dụng trong xử lý bã thải nấm. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Đà Nẵng. 2014;1(74):127-130.
17. Ngân NNT, Lan PTN. Tìm hiểu khả năng phân giải cellulose của vi sinh vật phân lập từ chất thải rắn của nhà máy FOCOCEV Thừa Thiên Huế. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Trường Đại học Khoa học Huế. 2014;1(1):135-142.
18. Thủy NTT, Phương TTX, Duyên CT, Xuân LTH, Hải TTH. Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose và bước đầu ứng dụng trong xử lý phế phụ phẩm nông nghiệp làm phân hữu cơ vi sinh. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp. 2017;1(1):159-168.
19. Ngân VTT. Phân lập và định danh vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose từ con mối (*Coptotermes formosanus*) và vỏ quả sầu riêng [Khóa luận tốt nghiệp đại học]. Tiền Giang: Trường Đại học Tiền Giang; 2021.
20. Nguyệt TT. Phân lập, tuyển chọn và nghiên cứu ứng dụng các chủng vi sinh vật chịu mặn bản địa có khả năng cố định đạm để sản xuất phân vi sinh cải tạo đất trồng rau trên quần đảo Trường Sa [Luận văn thạc sĩ]. Hà Nội: Học viện Khoa học và Công nghệ; 2020.

21. Loan NTK, Hiếu LV, Nguyệt NTM, Huy TG, Hà CD, Phong ÔX. Phân lập và khảo sát môi trường nuôi sinh khối nấm *Trichoderma* ứng dụng trong xử lý rác thải sinh hoạt hữu cơ. In: Hội nghị khoa học toàn quốc về Công nghệ sinh học 2024; 2024. p. 873-878.