

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG XỬ LÝ CELLULOSE CỦA CHỦNG NẤM *TRICHODERMA*

Nguyễn Văn Tuấn*, Phan Trường Khanh**

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm mục tiêu đánh giá hiệu suất xử lý cellulose của Trichoderma. Thí nghiệm được bố trí trên 3 vật liệu nghiên cứu: Lõi ngô, vỏ trấu, lá cây ở 3 mức khối lượng 100g, 200g và 300g trong điều kiện hiếu khí, mỗi nghiệm thức được lặp lại ba lần và theo dõi 28 ngày. Kết quả cho thấy, hiệu suất xử lý cellulose của Trichoderma ở thí nghiệm 1 (100g vật liệu) đạt cao nhất, kế đến là thí nghiệm 2 (200g vật liệu) và cuối cùng là thí nghiệm 3 (300g vật liệu). Trong đó, hiệu suất xử lý cellulose ở lõi ngô đạt cao nhất, kế đến là lá cây và cuối cùng là vỏ trấu. Hiệu suất xử lý cellulose trên 100g vật liệu: Lõi ngô: 70,59%, lá cây: 64,46% và vỏ trấu: 48,82%. Hiệu suất xử lý cellulose trên 200g vật liệu: Lõi ngô: 62,36%, lá cây: 52,81% và vỏ trấu: 41,98%. Hiệu suất xử lý cellulose trên 300g vật liệu: Lõi ngô: 55,49%, lá cây: 46,80% và vỏ trấu: 35,45%.

Từ khóa: Cellulose; Trichoderma; Vỏ trấu; Lá cây; Lõi ngô.

ABSTRACT

The study was aimed at tracking Trichoderma's ability to process cellulose. The experiment was conducted on three research materials: on cob, rice husk and leaves at three levels of 100 g, 200 g and 300 g in aerobic conditions, each being repeated three times, was followed for 28 days. As results, performance of Trichoderma cellulose processing in Experiment 1 (100g material) has highest, next to the experiment 2 (200g material), finally the experiment 3 (300g material). In which, the cob got higher performance of cellulose treatment than leaves and husks. Performance of cellulose treatment over 100g materials: 70,59% on cob, 64,46% on leaves and 48,82% for rice husk. Performance of cellulose treatment over 200g materials: 62,36% on cob, 52,81% on leaves and for rice husk 41,98%. Performance of cellulose treatment over 300g materials: 55,49% on cob, 46,80% on leaves and for rice husk 35,45%.

Keywords: Cellulose; Trichoderma; rice husk; Cob; Leaves

1. Giới thiệu

* Thạc sĩ, Khoa Kỹ thuật - Công nghệ - Môi trường, Trường Đại học An Giang

** Tiến sĩ, Khoa Kỹ thuật - Công nghệ - Môi trường, Trường Đại học An Giang

Đồng bằng Sông Cửu Long là vùng sản xuất nông nghiệp, hàng năm phế phẩm nông nghiệp phát sinh hàng chục tỷ tấn như: vỏ trấu, rơm rạ, lá cây, lõi ngô và các phụ phẩm hữu cơ khác gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng nếu không có biện pháp xử lý thích hợp. Cellulose

là chất hữu cơ khó phân hủy trong điều kiện tự nhiên, có nhiều trong các phế phẩm nông nghiệp. Có rất nhiều biện pháp xử lý cellulose như phương pháp lý học, hóa học và sinh học, việc tìm kiếm và ứng dụng các chủng vi sinh vật xử lý chất thải trong môi trường được nhiều nhà khoa học sử dụng vì biện pháp này dễ sử dụng, chi phí thấp, sản phẩm sau khi xử lý ít gây ô nhiễm môi trường. Cụ thể là chủng nấm *Trichoderma*, loài có tính đa dạng cao và phân bố ở vùng địa lý rộng có khả năng tiết enzym *cellulase* phân giải cellulose tạo sinh khối mùn, góp phần làm giảm chất thải gây ô nhiễm môi trường từ phụ phẩm trong nông nghiệp.

Hiện nay, *Trichoderma* đã và đang được nhiều nhà khoa học trong và ngoài nước đang nghiên cứu và ứng dụng, nhiệt độ tăng trưởng thích hợp cho *Trichoderma sp.* trong khoảng 25-30°C, trong khi đó thì *Trichoderma harizianum*, *Trichoderma hamatum* thích hợp trong khoảng 8-24°C, còn *Trichoderma viride* ở khoảng 8-16°C. *Trichoderma sp.* tăng trưởng nhanh ở 25°C và có sự cạnh tranh lớn về không gian, vì vậy chúng được nuôi cấy nhiều trong điều kiện phòng thí nghiệm (Widden P. and Hsu D., 1987). *Trichoderma* nổi tiếng nhờ khả năng phân giải được polymesaccharides (Cellulose, hemicellulose) và polyme có liên quan đến chitin. Các enzym tham gia vào các quá trình phân giải này có tầm quan trọng về mặt thương mại (Danielson R. M. and Davey C. B., 1973). Theo Trần Thanh Phong và ctv năm 2007 của Viện sinh học Nhiệt đới đã “nghiên cứu thu nhận *cellulase Trichoderma reesei* VTT-D-80133 sinh trưởng trên môi trường bán rắn” với cơ chất bã mía kết hợp với cám mì, tỷ lệ BM:CM (7:3), 8 lần nồng độ dinh dưỡng, độ ẩm ban đầu 60%, thời gian nuôi cấy 7 ngày là tối ưu cho *Trichoderma reesei*

VTT-D-80133 sinh tổng hợp *cellulase* trên môi trường lên men bán rắn. Hoạt tính và hiệu suất sinh tổng hợp *cellulase* ở điều kiện trong bình tam giác là CMCase (Carboxymethyl cellulase) 280,64 IU/g và FPU (Filter Paper Unit) 5 IU/g; thấp hơn 3,2 và 37 lần so với chế phẩm Amano T (*cellulase* được sản xuất từ *Trichoderma reesei*) của hãng Amano. *Trichoderma* còn có khả năng hoạt động phòng trừ sinh học, phân giải cellulose của *Trichoderma* ở các thể tiềm sinh và sợi nấm được công bố không chỉ trong phòng thí nghiệm (Cook R.J. and Baker K.F., 1982; Askew D.J. and Laing M.D., 1993). Ở Việt Nam nấm *Trichoderma* đã được Bộ môn Bệnh cây, Viện Bảo vệ thực vật nghiên cứu từ năm 1989 đến nay, đây là loài nấm đất thường xuất hiện trên các loài đất giàu dinh dưỡng, có khả năng phân giải chất kitin, cellulose và điều tra phát hiện thấy nấm *Trichoderma* thường sinh sống và tồn tại trên những tàn dư thực vật (Phạm Thị Thuý, 2010).

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Sử dụng các vật liệu phế phẩm nông nghiệp phổ biến có thành phần cellulose cao: Vỏ trấu, lõi ngô, lá cây; Chủng nấm *Trichoderma* được phân lập từ đất nông nghiệp.

2.2. Bố trí thí nghiệm

Nghiên cứu được tiến hành với các nội dung sau: (1) Chuẩn bị vật liệu nghiên cứu và mẫu vi sinh vật (*Trichoderma*); (2) Bố trí 3 thí nghiệm với 33 ô mẫu; (3) Phân tích cellulose và mật số vi khuẩn; (4) Tổng hợp số liệu và viết báo cáo.

Nghiên cứu được tiến hành với 3 thí nghiệm, mỗi thí nghiệm gồm 3 nghiệm thức

(NT) và 3 lần được lặp lại cùng với 3NT đối chứng với 3 lần lặp lại, do đó tổng cộng có 33 ô thí nghiệm được bố trí cùng một thời điểm. Vật liệu thí nghiệm được cho vào học ủ bằng thùng xốp, được bố trí tại khu thực nghiệm, phân tích các chỉ tiêu được tiến hành tại trung tâm thí nghiệm của Trường Đại học An Giang.

Thí nghiệm 1: 100g vật liệu với 20ml mẫu chủng nấm với thời gian thí nghiệm là 28 ngày, 7 ngày phân tích mẫu; ta có các NT: ĐC1 (Đối chứng 1): vỏ trấu, không cho chủng nấm vào; ĐC2 (Đối chứng 2): lõi ngô, không cho chủng nấm vào; ĐC3 (Đối chứng 3): lá cây, không cho chủng nấm vào; NT1-1: 100g vỏ trấu, với 20ml mẫu chủng nấm; NT1-2: 100g lõi ngô, với 20ml mẫu chủng nấm; NT1-3: 100g lá cây, với 20ml mẫu chủng nấm.

Thí nghiệm 2: Cũng thực hiện tương tự thí nghiệm 1, nhưng tăng khối lượng vật liệu lên 200g ta có các NT: NT2-1: 200g vỏ trấu,

với 20ml mẫu chủng nấm; NT2-2: 200g lõi ngô, với 20ml mẫu chủng nấm và NT2-3: 200g lá cây, với 20ml mẫu chủng nấm.

Thí nghiệm 3: Cũng thực hiện tương tự thí nghiệm 1 và 2, nhưng tăng khối lượng vật liệu lên 300g ta có các NT: NT3-1: 300g vỏ trấu, với 20ml mẫu chủng nấm; NT3-2: 300g lõi ngô, với 20ml mẫu chủng nấm và NT3-3: 300g lá cây, với 20ml mẫu chủng nấm. Mô tả tiến trình thực hiện thí nghiệm: Vật liệu nghiên cứu được mua hay thu gom, phơi khô, cắt nhỏ, cân vật liệu theo số gam bố trí rồi cho vào các thùng xốp. Phân tích cellulose đầu vào (kể cả mẫu đối chứng), sau đó cho 20ml chủng nấm vào các ô thí nghiệm (trừ mẫu đối chứng), để đảm bảo độ ẩm cho chủng nấm *Trichoderma* sinh trưởng và phát triển, tưới nước mỗi ngày cho các mẫu thí nghiệm. Thí nghiệm được thực hiện trong 28 ngày, 7 ngày phân tích mật độ chủng nấm và cellulose (kể cả mẫu đối chứng) một lần.



Hình 1: Bố trí vật liệu thí nghiệm: (a) NT1-3 (100g lá cây của thí nghiệm 1 (TN 1)); (b) NT2-2 (200g lõi ngô của TN2); (c) NT3-1 (300g vỏ trấu của TN3).

2.3. Phương pháp phân tích cellulose

Cellulose là hợp chất bền không tan trong môi trường axit và kiềm. Bởi thế người ta xác định hàm lượng trọng lượng còn lại sau khi hòa tan mẫu bằng axit và kiềm.

✓ Hoá chất

Dung dịch H_2SO_4 8%; Dung dịch NaOH 30%

✓ Cách tiến hành

Cân 2,0g mẫu đã được sấy ở $105^\circ C$ từ

2 - 3 giờ vào cốc 250ml. Sau đó thêm 50ml dung dịch 8% H_2SO_4 và thêm 50ml nước cất đun sôi 10 phút. Phần còn lại được rửa gạn với nước nóng nhiều lần (5 lần). Thêm nước cất 100ml, thêm 9ml dung dịch 30% NaOH và đun sôi 10 phút, sau đó rửa gạn bằng nước nóng nhiều lần, chuyển cặn sang giấy lọc đã biết trọng lượng trước, rửa nhiều lần trên giấy lọc bằng nước nóng, sấy cặn và giấy lọc ở $105^{\circ}C$ trong vòng 5 - 6 giờ.

✓ Tính toán kết quả

$$X = \frac{A-B}{C} \times 100 \quad (CT1)$$

Trong đó: A là Khối lượng cặn + giấy lọc (g); B là Khối lượng giấy lọc (g); C là Khối lượng mẫu đem phân tích (g)

2.4. Phương pháp xác định mật độ số *Trichoderma*

Mật số chủng nấm được xác định bằng phương pháp đếm các tế bào sống trên môi trường rắn: Pha môi trường nuôi cấy nấm. Sau đó, đổ môi trường trên đĩa petri, mỗi đĩa petri chia làm 3 phần, mỗi phần chấm 5 điểm, lấy mẫu nước, pha loãng 10^5 lần, 10^6 lần và 10^7

lần, dùng micropipet lấy 10^{-3} ml mẫu nước của từng nồng độ pha loãng nhỏ vào 5 điểm chấm trên từng phần đĩa petri (tương ứng với 3 phần trên đĩa là 3 nồng độ pha loãng), đếm số khuẩn lạc trên đĩa, có thể đếm 1 trong 3 nồng độ được pha loãng.

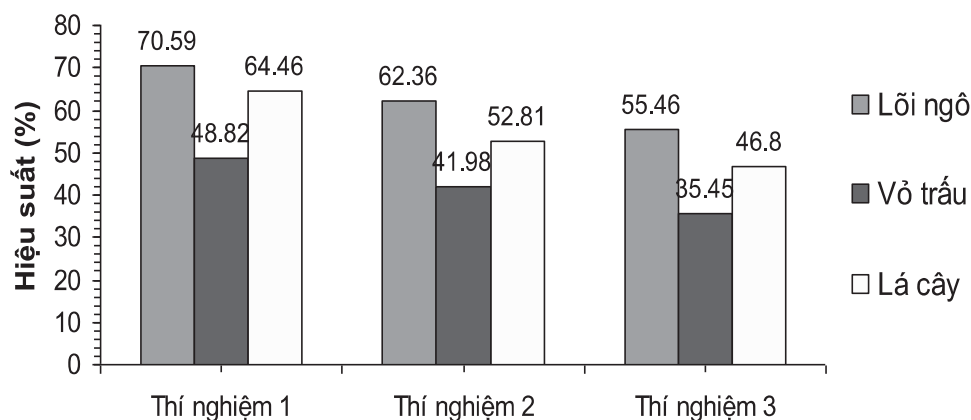
$$M = S \times f \quad (CT2)$$

Trong đó: M là Mật số nấm (cfu/ml); S là Số khuẩn lạc; f là hệ số pha loãng

3. Kết quả thảo luận

3.1. Kết quả xử lý cellulose

Trong 3 thí nghiệm, hiệu suất xử lý cellulose cao nhất là lõi ngô đạt 70,59%; kế đến là lá cây hiệu suất đạt 64,46%; cuối cùng là vỏ trấu đạt 48,82% ở thí nghiệm 1 vẫn cao hơn so với hiệu suất xử lý cellulose ở 2 thí nghiệm còn lại. Điều đó cũng có nghĩa, khi khối lượng vật liệu càng nhỏ, nhưng lượng chủng nấm cho vào thí nghiệm không đổi thì khả năng phân giải cellulose càng nhiều và thời gian phân giải cellulose sẽ xảy ra ngắn hơn so với các thí nghiệm có khối lượng vật liệu lớn hơn.



Hình 2: Hiệu suất xử lý cellulose

Tuy nhiên, nếu so sánh trên cùng vật liệu giữa các thí nghiệm ta nhận thấy có sự khác biệt rất có ý nghĩa giữa các nghiệm thức (khác biệt về khối lượng vật liệu) ở mức ý nghĩa 0,05. Nghĩa là, bước nhảy 100g vật liệu đủ lớn để tạo nên sự khác biệt này. Hay nói cách khác, trên

cùng một vật liệu thí nghiệm, nếu khối lượng vật liệu được thêm vào càng (thí nghiệm 2 và thí nghiệm 3) thì khả năng phân giải cellulose càng thấp và thời gian phân giải càng dài hơn so với thí nghiệm có khối lượng vật liệu ít hơn. Điều này được thể hiện qua bảng 1.

Bảng 1: Kết quả kiểm định Duncan giá trị trung bình cellulose của mỗi vật liệu (với khối lượng vật liệu khác nhau) qua 28 ngày thí nghiệm.

STT	Vỏ trấu		Lõi ngô		Lá cây	
	NT	Trị TB	NT	Trị TB	NT	Trị TB
1	ĐC1	45,66a	ĐC2	28,31a	ĐC3	33,75a
2	NT1-1	37,11b	NT1-2	18,52b	NT1-3	25,41b
3	NT2-1	38,45c	NT2-2	20,72c	NT2-3	26,85c
4	NT3-1	39,31d	NT3-2	22,14d	NT3-3	27,76d
CV%		11,1%		13,3%		10,93%

Ghi chú: Các chữ cái giống nhau không có sự khác biệt nhau (theo cột)

Bảng 2: Kết quả kiểm định Duncan giá trị trung bình cellulose còn lại theo thời gian trên lõi ngô.

Ngày	NT1-2 (100g lõi ngô)	NT2-2 (200g lõi ngô)	NT3-2 (300g lõi ngô)
Ngày 0	28,56a	28,56a	28,56a
Ngày 7	28,27a	28,56a	28,55a
Ngày 14	20,39b	22,43b	23,90b
Ngày 21	8,41c	14,70c	18,35c
Ngày 28	8,40c	10,75d	12,72d
CV%	10,63%	13,25%	13,40%

Ghi chú: - Các chữ cái giống nhau không có sự khác biệt nhau trên (theo cột)

- Giá trị trên bảng đã có tính đến nghiệm thức đối chứng.

Từ bảng 2 cho thấy, ở NT1-2 (100g lõi ngô) cho kết quả cellulose còn lại ở ngày thứ 21 là 8,41%, ngày thứ 28 là 8,40%. Do đó, chúng ta có thể dừng thí nghiệm giữa ngày

thứ 21. Ngược lại, ở NT2-2 và NT3-2 giữa các ngày thí nghiệm có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về giá trị trung bình cellulose còn lại theo thời gian. Do đó, nếu có điều kiện chúng ta sẽ kéo dài thời gian nghiên cứu lâu hơn để thấy rõ hiệu suất phân giải cellulose tối ưu ở 2 nghiệm thức này.

Bảng 3: Kết quả kiểm định Duncan giá trị cellulose trung bình còn lại theo thời gian trên vỏ trấu.

Ngày	NT1-1 (100g vỏ trấu)	NT2-1 (200g vỏ trấu)	NT3-1 (300g vỏ trấu)
Ngày 0	45,76a	45,76a	45,76a
Ngày 7	45,62a	45,64a	45,69a
Ngày 14	39,53b	40,49b	41,63b
Ngày 21	30,14c	32,34c	34,61c
Ngày 28	23,42d	26,55d	29,54d
CV%	11,82%	13,42%	10,37%

Ghi chú: - Các chữ cái giống nhau không có sự khác biệt nhau trên (theo cột).
 - Giá trị trên bảng đã có tính đến nghiệm thức đối chứng.

Bảng 4: Kết quả kiểm định Duncan giá trị cellulose trung bình còn lại trên lá cây theo thời gian.

Ngày	NT1-3 (100g lá cây)	NT2-3 (200g lá cây)	NT3-3 (300g lá cây)
Ngày 0	33,78a	33,78a	33,78a
Ngày 7	33,64a	33,67a	33,73a
Ngày 14	27,69b	28,81b	29,11b
Ngày 21	20,11c	22,21c	24,32c
Ngày 28	12,0 d	15,94d	18,03d
CV%	12,7%	9,89%	11,42%

Ghi chú: - Các chữ cái giống nhau không có sự khác biệt nhau trên (theo cột).
 - Giá trị trên bảng đã có tính đến nghiệm thức đối chứng.

Tương tự như vậy, ở bảng 3 và bảng 4 chúng ta cũng thấy rõ cần phải kéo dài thêm thời gian nghiên cứu để xác định thời gian tối ưu và hiệu suất phân giải cellulose tối ưu ở cả 2 vật liệu vỏ trấu và lá cây. Vì kết quả kiểm định vẫn còn thấy được sự khác biệt rõ

rệt giữa các ngày thí nghiệm về giá trị trung bình cellulose còn lại ở mức độ tin cậy 95%. Đối với định mức 20ml vi khuẩn thì phù hợp trên cả 3 vật liệu nghiên cứu (vỏ trấu, lõi ngô và lá cây) ở mức 100g và 21 ngày thí nghiệm.

3.2. Kết quả kiểm định mật số chủng nấm *Trichoderma*

Bảng 5: Kết quả kiểm định Duncan giá trị trung bình mật số ($\times 10^9$ cfu/ml) của mỗi vật liệu (với khối lượng vật liệu khác nhau) qua 28 ngày thí nghiệm.

STT	Vỏ trấu		Lõi ngô		Lá cây	
	NT	Trị TB	NT	Trị TB	NT	Trị TB
1	ĐC1	1,8 a	ĐC2	2,1a	ĐC3	3,1a
2	NT1-1	6,89b	NT1-2	6,68b	NT1-3	6,94b
3	NT2-1	6,81bc	NT2-2	6,86c	NT2-3	6,87bc
4	NT3-1	6,70c	NT3-2	6,78bc	NT3-3	6,81c
CV%		14,41%		11,60%		11,20%

Ghi chú: Các chữ cái giống nhau không có sự khác biệt nhau (theo cột).

Qua kết quả kiểm định Duncan ở bảng 5 cho thấy, giá trị trung bình mật số ở các nghiệm thức có sự khác biệt với nghiệm thức đối chứng ở cả 3 vật liệu thí nghiệm. Tuy nhiên, trên vật liệu lõi ngô ta thấy giữa NT2-2 và NT3-2 không khác biệt nhau, tương tự như vậy đối với NT2-1 và NT3-1 ở vật liệu vỏ trấu; NT2-3 và NT3-3 ở vật liệu lá cây, mật số chủng nấm không tăng ở thí nghiệm 300g vật liệu, hay nói cách khác chủng nấm *Trichoderma* đã bão hoà do bội thực thức ăn. Nghiên cứu có thể dừng thí nghiệm ở khối lượng vật liệu 200g.

5. Kết luận và kiến nghị

5.1. Kết luận

Kết quả nghiên cứu ứng dụng chủng nấm *Trichoderma* để phân giải cellulose lần lượt trên 3 thí nghiệm: 100g; 200g; 300g vật liệu với 3 đối tượng là lõi ngô, vỏ trấu và lá cây cho thấy hiệu suất xử lý cellulose cao nhất của lõi ngô là 70,59%, của lá cây là 64,46% và lá cây là 48,82%. Thời gian kết thúc thí nghiệm của lõi ngô 100g là ngày thứ 21 với hiệu suất tối ưu là 70,55%. Mật số tối ưu được chọn là

7,96.10⁹cfu/ml của thí nghiệm 200g ở vật liệu lõi ngô. Mật số tối ưu được chọn là 7,91.10⁹cfu/ml của thí nghiệm 200g ở vật liệu lá cây. Mật số tối ưu được chọn là 7,98.10⁹cfu/ml của thí nghiệm 200g ở vật liệu lá cây.

5.2. Kiến nghị

Do thời gian nghiên cứu còn hạn hẹp nên nghiên cứu chỉ thực hiện ở 3 thí nghiệm với thời gian 28 ngày, trong các ô thí nghiệm. Tác giả xin kiến nghị các nghiên cứu tiếp theo nên mở rộng thêm (thời gian nghiên cứu, thêm vật liệu nghiên cứu, thay đổi bước nhảy khối lượng vật liệu nghiên cứu, thay đổi mật số).

Khi có điều kiện, nên ứng dụng chủng nấm *Trichoderma* vào thực tế ở các hầm ủ phân hữu cơ, hay các nghiên cứu thu nhận enzym cellulase trên các vật liệu nghiên cứu để sản xuất ethanol và các sản phẩm sinh học khác với quy mô công nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Askew D.J. and Laing M.D. (1993), An adapted selective medium for the quantitative

- isolation of *Trichoderma species*. *Plant Path.* 42: pp 686 - 690.
2. Cook R.J. and Baker K.F. (1983), Production of xyloglucanolytic enzymes by *Trichoderma viride*, *Paecilomyces farinosus*, *Wardomyces inflatus*, and *Pleurotus ostreatus*. *Apd.* 419, E-18008 Granada, Spain.
3. Danielson R.M. and Davey C.B. (1973c), Carbon and nitrogen nutrition in *Trichoderma*. *Soil Biol. Biochem.* 5: pp506 - 515.
4. Phạm Thị Thuỳ (2010), *Giáo trình Công nghệ sinh học trong bảo vệ thực vật*, Hà Nội. NXB Đại học Quốc gia Hà Nội
5. Trần Thanh Phong và ctv (2007), *Thu nhận enzym cellulase của Trichoderma reesei trên môi trường bán rắn*, Viện sinh học Nhiệt đới - Viện khoa học và Công nghệ Việt Nam. Tạp chí phát triển KH&CN, Tập 10, Số 07 - 2007.
6. Widden P. and Hsu D. (1987), Competition between *Trichoderma species*: Effects of temperature and litter type. *Soil Biol. Biochem.* 19: pp89 - 94.

Ngày nhận bài: 9/11/2018

Ngày gửi phản biện: 15/11/2018