TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ
KHOA NÔNG NGHIỆP & SINH HỌC ỨNG DỤNG

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG TIẾT ENZYME CELLULASE CỦA CÁC CHỦNG NẤM *TRICHODERMA* SPP.

Luận văn tốt nghiệp
Ngành: NÔNG HỌC

Cần Thơ,
2021

TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ
KHOA NÔNG NGHIỆP & SINH HỌC ỨNG DỤNG

Luận văn tốt nghiệp
Ngành: NÔNG HỌC

Tên đề tài:

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG TIẾT ENZYME CELLULASE CỦA CÁC CHỦNG NẤM *TRICHODERMA* SPP.

Giáo viên hướng dẫn: *Sinh viên thực hiện*:

Cần Thơ,
2021

TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ

KHOA NÔNG NGHIỆP VÀ SINH HỌC ỨNG DỤNG

BỘ MÔN BẢO VỆ THỰC VẬT

Chứng nhận đã chấp thuận luận văn với đề tài:

"KHẢO SÁT KHẢ NĂNG TIẾT ENZYME CELLULASE CỦA CÁC CHỦNG NẤM *TRICHODERMA* SPP."

Do sinh viên thực hiện và đề nạp. Kính trình hội đồng chấm luận văn tốt nghiệp xem xét.

Cần Thơ, ngày ….. tháng năm

Cán bộ hướng dẫn

TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ

KHOA NÔNG NGHIỆP VÀ SINH HỌC ỨNG DỤNG

BỘ MÔN BẢO VỆ THƯC VÂT

Hội đồng chấm luận văn tốt nghiệp đã chấp thuận luận văn với đề tài:

"KHẢO SÁT KHẢ NĂNG TIẾT ENZYME CELLULASE CỦA CÁC CHỦNG NẤM *TRICHODERMA* SPP."

Do sinh viên: thực hiện và bảo vệ trước hội đồng ngày….. tháng….. năm.

Luận văn đã được hội đồng chấp thuận và đánh giá ở mức:……

Ý kiến hội đồng: ……..

……...

……..

Cần Thơ, ngày ….. tháng năm

DUYỆT KHOA

Chủ tịch hội đồng

Trưởng khoa Nông Nghiệp và Sinh Học Ứng Dụng

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của bản thân. Các số liệu, kết quả trình bày trong luận văn là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kì luận văn nào trước đây.

Tác giả luận văn

LÝ LỊCH CÁ NHÂN

Sinh viên:

LỜI CẢM TẠ

Kính dâng ba mẹ những người suốt đời tận tụy vì con, xin cảm ơn những người thân đã giúp đỡ, động viên con trong suốt thời gian qua.

Thành thật biết ơn thầy, KS., KS. đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ và động viên em trong suốt thời gian làm và hoàn thành luận văn tốt nghiệp.

Chân thành cảm tạ thầy cố vấn học tập và, cùng toàn thể quý thầy cô khoa Nông Nghiệp và Sinh học ứng dụng vì những kiến thức mà quý thầy cô đã truyền dạy cho em trong suốt thời gian học tập tại trường. Đây sẽ là hành trang vững chắc giúp em bước vào đời.

Gởi lời cảm ơn đến các anh chị và các bạn sinh viên làm đề tài ở Bộ môn Bảo vệ Thực vật, cùng các bạn đã đóng góp, động viên và giúp đỡ tôi trong suốt thời gian học tập và thực hiện đề tài.

MỤC LỤC

	Trang
Lý lịch cá nhân	iv
Lời cảm tạ	v
Mục lục	vi
Danh sách bảng	vii
Danh sách hình	vii
Tóm lược	viii
MỞ ĐẦU	1
Chương 1: LƯỢC KHẢO TÀI LIỆU	2
1.1 Khái quát về đặc điểm chung của nấm *Trichoderma*	2
1.1.1. Đặc điểm phân loại	2
1.1.2. Đặc điểm sinh thái	2
1.2. Khả năng tiết enzyme và tác dụng đối kháng của nấm *Trichoderma*	3
1.3. Khả năng phân hủy chất hữu cơ của nấm *Trichoderma*	4
1.4. Những yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển và hoạt động đối kháng của nấm *Trichoderma*	5
1.4.1. Nhiệt độ	5
1.4.2. Ẩm độ	6
1.4.3. Ảnh hưởng của pH môi trường	6
1.4.4 Ảnh hưởng của nguồn carbon và đạm	6
1.4.5. Các yếu tố ảnh hưởngkhác	7
1.5. Khả năng kích thích sự phát triển cây trồng của *Trichoderma*	7
1.6. Phân loại Enzyme cellulase	8
Chương 2: PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP	9
2.1 Phương tiện	9
2.2 Phương pháp thí nghiệm	11
2.2.1 Ước lượng hàm lượng protein trong mẫu dịch trích	11
2.2.2 Khảo sát hoạt tính của enzyme cellulase	12
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	14
3.1 Ghi nhận tổng quát	14
3.1.2 Kết quả thí nghiệm	14
3.1.2.1 Sinh khối của các chủng nấm *Trichoderma*	14
3.1.2.3 Ước lượng protein trong dịch trích của các chủng nấm *Trichoderma*	15
3.1.2.4 Khả năng tiết enzyme cellulase của các chủng nấm *Trichoderma*	16
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	19

DANH SÁCH BẢNG

Bảng	Tên bảng	Trang
3.1	Sinh khối khô (g/lít môi trường) của các chủng nấm T*richoderma* khác nhau sau 10 ngày nuôi lắc (Bộ môn Bảo Vệ Thực Vật, 2008 - 2009)	15
3.2	Độ hấp thu (OD_{abs}) của protein trong các dịch trích của các chủng nấm *Trichoderma* khác nhau trong môi trường TSM lỏng sau 7 ngày và 10 ngày nuôi lắc (Bộ môn Bảo Vệ Thực Vật, 2008 - 2009)	15
3.3	Độ hấp thu (OD_{abs}) của enzyme cellulase trong các dịch trích của các chủng nấm *Trichoderma* khác nhau trong môi trường TSM lỏng sau 7 ngày và 10 ngày nuôi lắc (Bộ môn Bảo Vệ Thực Vật, 2008 - 2009)	17

DANH SÁCH HÌNH

Hình	Tên hình	Trang
1	Bố trí thí nghiệm trên máy lắc ngang	18
2	Máy đo độ hấp thu quang phổ Spectromerter	18
3	Chuẩn bị mẫu đo độ hấp thu (OD_{abs}) của protein và enzyme cellulase bằng Spectrophotometer	18

Tô Huỳnh Như, 2009. "Khảo sát khả năng tiết enzyme cellulase của các chủng nấm *Trichoderma* spp.". Luận văn tốt nghiệp kỹ sư Nông Học, khoa Nông Nghiệp & Sinh Học Ứng Dụng, trường Đại học Cần Thơ.

TÓM LƯỢC

Đề tài "**Khảo sát khả năng tiết enzyme cellulase của các chủng nấm *Trichoderma* spp.**" được thực hiện từ tháng 11/2008 đến tháng 5/2009 nhằm chọn lọc các chủng nấm *Trichoderma* spp. có khả năng tiết nhiều enzyme cellulase cao trong điều kiện phòng thí nghiệm. Kết quả đạt được sẽ góp phần hữu ích trong việc phân hủy rơm rạ trên đồng ruộng, giúp hạn chế ngộ độc hữu cơ cho cây lúa theo hướng sinh học.

Thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm tại bộ môn Bảo vệ Thực vật, khoa Nông nghiệp & Sinh học ứng dụng, đại học Cần Thơ từ tháng 11/2008 đến tháng 5/2009, được bố trí theo thể thức khối hoàn toàn ngẫu nhiên, 4 lần lặp lại.

Thí nghiệm được thực hiện trên bình tam giác (250 ml) trên môi trường TSM được thực hiện trong môi trường TSM lỏng với 8 chủng nấm *Trichoderma* T- TB4a, T-BM2a, T-CB1b, T-LV1a, T-CB8c, T-OM2a, T-CTTG2e, T-TTAG3b.
Các chủng nấm *Trichoderma* spp. được nuôi trên môi trường với mật số 10^6 bào tử/ml, lắc trong 7 ngày và 10 ngày với tốc độ 140 vòng/phút (rpm).

Dịch trích các mẫu thí nghiệm được lọc qua giấy Whatman N°5, trữ ở 4^0C, xác định hoạt tính của các enzyme cellulase theo phương pháp Ghose (1987) và hàm lượng protein theo phương pháp Bradford (1976).

Kết quả thí nghiệm cho thấy:

- Sinh khối khô của các chủng nấm *Trichoderma* T-CB1b (0,61 g/lít), T-LV1a (0,365 g/lít) đạt cao nhất khi nuôi trong môi trường TSM lỏng sau 10 ngày lắc, kế đến là chủng T-TTAG3b (0,350 g/lít).
- Hai chủng nấm T-TTAG3b và T-CB8c cho hàm lượng protein và hoạt tính enzyme cellulase cao nhất sau 7 ngày và 10 ngày nuôi lắc.
- Hàm lượng protein trong dịch trích và hoạt tính enzyme cellulase ở thời điểm 7 ngày thấp hơn 10 ngày sau khi nuôi lắc.

Hai chủng nấm được chọn là T-TTAG3b và T-CB8c tiết ra nhiều enzyme cellulase sẽ tiếp tục được thử nghiệm trong các điều kiện thực tế để đánh giá khả năng phân hủy cellulose và chọn lọc ra những chủng nấm có hiệu quả nhất phục vụ việc phân hủy chất hữu cơ.

MỞ ĐẦU

Thực vật chứa hàm lương cellulose rất lớn (khoảng 60 - 70%). Hằng năm trên trái đất có khoảng 10^{11} tấn cellulose được cây trồng tổng hợp, đó chính là nguồn nguyên liệu vô tận phục vụ cho sự phát triển của xã hội (Nguyễn Đức Lượng và Nguyễn Hữu Phước, 1996).

Việt Nam là một nước nông nghiệp có sản lượng lúa đứng thứ hai thế giới. Bên cạnh sản phẩm chính là lúa gạo, lượng rơm rạ còn lại sau thu hoạch cũng rất lớn. Ngoài ra, nhu cầu thâm canh tăng vụ của người dân ngày càng tăng nên vấn đề xử lý rơm rạ sau thu hoạch cũng rất cần thiết. Rơm rạ chứa thành phần cellulose 35 - 36% nên rất khó phân huỷ trong điều kiện thường hay thời gian ngắn (Bùi Huy Đáp, 1980). Nếu xử lý các dư thừa thực vật này một cách hiệu quả chúng ta vừa tận dụng được nguồn phế phẩm, vừa cung cấp chất hữu cơ cho đất làm gia tăng năng suất cây trồng, vừa hạn chế ngộ độc hữu cơ cho cây lúa.

Xu hướng hiện nay là phát triển nông nghiệp theo hướng bền vững, việc ứng dụng các biện pháp sinh học đã được áp dụng rộng rãi và hiệu quả cao trong quản lý bênh hại cây trồng như nấm *Trichoderma* spp. có khả năng đối kháng với nhiều loại nấm bệnh như *Fusarium, Phytophthora*, *Rhizoctonia*,…(Wells, 1993, trích từ Nguyễn Thị Ngân, 2007, Nguyễn Thế Quyết và ctv., 2003). Nấm có nhiều cơ chế kiểm soát bệnh hại thực vật như là cạnh tranh dinh dưỡng, ký sinh, tạo chất kháng sinh hay tiết enzyme thủy phân vách tế bào ký chủ như: glucanases, chitinases, cellulases,… là loại nấm hoại sinh đóng vai trò quan trọng trong việc phân hủy hữu cơ trong đất (Alexander, 1961; Harman, 1996; Kredics và ctv., 2003).

Trên cơ sở đó đề tài "Khảo sát khả năng tiết enzyme cellulase của các chủng nấm *Trichoderma* spp." nhằm chọn lọc các chủng nấm *Trichoderma* spp. có khả năng tiết nhiều cellulase cao và có khả năng cho sinh khối cao để làm nền tảng cho các nghiên cứu về phân hủy các dư thừa thực vật theo hướng sinh học.

Kết quả đạt được sẽ góp phần để chọn các chủng nấm có khả năng phân hủy các dư thừa thực vật có chứa cellulose cao như rơm rạ, góp phần vào việc phục vụ sản xuất nông nghiệp ở đồng bằng sông Cửu Long.

Luanvan24

Chương 1: LƯỢC KHẢO TÀI LIỆU

1.1 KHÁI QUÁT VỀ ĐẶC ĐIỂM CHUNG CỦA NẤM *TRICHODERMA*

1.1.1 Đặc điểm phân loại

Về phân loại nấm, nấm *Trichoderma* thuộc nghành nấm Mycota, lớp nấm Bất Toàn (Deuteromyces), bộ nấm Bông (Moniliales), họ Moniliaceace và chi Trichoderma (Vũ Triệu Mân và Lê Lương Tề, 1998). Theo Agrios (1997) thì giai đoạn sinh sản hữu tính của *Trichoderma* thuộc lớp Ascomycetes, bộ Hyporcaelos, chi Hypocrea.

Có nhiều *Trichoderma* spp. trong chi nấm *Trichoderma*, Kubicek và Harman (1998) đã mô tả chi tiết 33 loài *Trichoderma* spp. với đặc điểm riêng biệt của một số loài:

- *T. harzianum*, Rifai khuẩn lạc phát triển nhanh, bào tử dạng cầu méo đến trứng ngược, vách nhăn, hơi trong suốt đến màu xanh nhạt, kích thước (2,5 - 3,50 x (2,1 - 3) µm (Gams và Meyer, 1998).
- *T. reesei*, Simmos khuẩn lạc phát triển nhanh, bào tử có màu xanh nhạt, dạng bầu dục, kích thước (3,0 - 4,5) x (2,3 - 3,0) µm, nấm có giai đoạn sinh sản hữu tính là *Hypocrea jecorina* (Kuhls và ctv.,1997).
- *T. hamatum* (Bon) bào tử màu xanh, trơn, dạng elip - cầu, kích thước (4,0 - 5,0) x (2,5 - 3,0) µm (Cook và Baker, 1989).
- *T. attroviride* có khuẩn lạc phát triển nhanh, bào tử có màu xanh, vách dày, trơn láng, bào tử có dạng bán hình cầu, kích thước (2,6 - 3,8) x (2,2 - 3,4) µm. khi nấm già thì mất màu do có màu vàng nhạt hoặc xám, bào tử già có phát ra mùi hương dừa (Kubicek và Harman, 1998).

1.1.2 Đặc điểm sinh thái

Nấm *Trichoderma* phân bố khắp thế giới và thường chiếm ưu thế trong thành phần vi sinh vật đất. Chúng có thể sống trong đất, trên xác bã thực vật, …(Gams và Bissett, 1998).

Sự phân bố và điều kiện môi trường sống của các loài *Trichoderma* có liên hệ mật thiết với nhau. Turner và ctv. (1997) đã ghi nhận loài *Trichoderma longibrachiatum* thường hiện diện ở Châu Phi và Ấn Độ, cũng như loài *Trichoderma citrinoviride* ở Đông Nam Á và loài *Trichoderma pseudokoningi* ở New Zealand và miền đông nước Úc.

Nấm có mặt phổ biến ở những vùng đất canh tác nông nghiệp, đồng cỏ, rừng nhiệt đới, đất hoang,…(Danielson và Davey, 1973; Roiger và ctv., 1991), tùy theo từng loài mà thích nghi ở điều kiện khí hậu khác nhau và sống thích hợp ở tầng đất hữu cơ (như gỗ mục) hay tầng đất mặt, điều này cũng phù hợp với Harman (1996).

Cook và Baker (1989) ghi nhận rằng nấm *Trichoderma* thường sống trong đất có ẩm độ cao. Tuy nhiên, chúng cũng thường sống trong đất khô ráo. *Trichoderma*

Luanvan24

phân bố ở khắp nơi, đặc trưng của nấm là sống hoại sinh. Ngoài ra, chúng còn có khả năng ký sinh trên nấm gây hại cho cây trồng, cho nên cây trồng sẽ ít bệnh nếu có sự tập trung nhiều loài của *Trichoderma* (Gams và Bissett, 1998).

1.2 KHẢ NĂNG TIẾT ENZYME TRONG QUÁ TRÌNH ĐỐI KHÁNG CỦA NẤM *TRICHODERMA*

Theo Mehrotra (2000), trong quá trình đối kháng bên cạnh việc tiết enzyme thì khả năng tạo sinh khối, tốc độ phát triển của nấm *Trichoderma* spp. có ý nghĩa quan trọng đối với nấm gây bệnh cây trồng.

Cơ chế quá trình đối kháng của nấm *Trichoderma* gồm hai giai đoạn: Giai đoạn thứ nhất là bao quanh và cuộn tròn sợi nấm gây bệnh, giai đoạn thứ hai là cơ chế hóa học, nấm *Trichoderma* tiết ra các loại enzyme thủy phân (Kredics và ctv., 2003) phân hủy chất nguyên sinh của sợi nấm gây bệnh làm cho sợi nấm chết. *Trichoderma* spp. có khả năng đối kháng với vi khuẩn nhờ hoạt động của những enzyme như protease, NAGase, muramidase có khả năng phân hủy tế bào vi khuẩn (Kredics và ctv., 2003).

Theo Gayal và Khandeparkar (1998), cơ chế quan trọng giúp *Trichoderma* đối kháng có hiệu quả với nhiều nấm bệnh gây hại trên cây trồng là nhờ vào đặc tính có khả năng tiết ra nhiều chất tiết của nấm *Trichoderma* .

Trong quá trình tác động lên nấm gây bệnh, ngoài tác dụng ký sinh, cạnh tranh thức ăn với nấm gây bệnh tiết ra các chất kháng sinh (Trần Thị thuần và ctv., 2000),. *Trichoderma* còn tiết enzyme ngăn cản sự xâm nhập và gây bệnh của nấm gây hại cây trồng (Cao Cường và ctv., 2003; Trần Thị Thuần và ctv., 2000).

Nghiên cứu của Cruz và ctv. (1995) cho biết enzyme cellulases do nấm *Trichoderma* tiết ra cũng có thể làm mềm vách tế bào của nấm gây bệnh.

Trichoderma spp. ký sinh trên sợi nấm bệnh *Rhizoctonia solani* gây chết nấm *R. solani* do tác dụng của enzyme ngoại bào làm tiêu hủy màng tế bào của nấm bệnh (Phạm Văn Kim, 2000).

Theo Yedidia và ctv. (2001), sau khi ký sinh lên rễ cây trồng *Trichoderma* sẽ xâm nhập vào mô cây, kích thích một chuỗi thay đổi về hình thái và sinh hóa trong cây như sự thay đổi cấu trúc polymer của lignin và hydroxyproline làm gia tăng nồng độ chất hữu cơ trong vách tế bào cây chủ, gia tăng khả năng sản xuất hormone, tăng khả năng tiết ra các phytoalecxin của cây tại nơi bị tổn thương để tiêu diệt các tế bào nấm gây bệnh hoặc tạo ra các enzyme để phân hủy các tế bào nấm bệnh làm gia tăng sức đề kháng và tăng khả năng đối kháng của cây đối với nấm bệnh.

Gronona và ctv. (1997) trích dẫn rằng hoạt động đối kháng và sản xuất các chất kháng sinh trong quá trình đối kháng của *Trichoderma* đã được chứng minh bởi Weindling vào năm 1932, và ông cho biết hoạt động gây chết nấm bệnh của *Trichoderma virride* là do quá trình tiết kháng sinh gliotoxin.

Luanvan24

Enzyme thủy phân cellulose được tiết ra do nấm *Trichoderma* có tầm quan trọng trong việc làm mềm vách tế bào của nấm bệnh, chẳng hạn *Trichoderma reesei*, *T. lignorum* và *T. koningi* tiết ra khá nhiều enzyme C1 và Cx phân hủy hoàn toàn tế bào chứa cellulose (Nguyễn Lân Dũng, 1983; Gayal và Khanderparkar, 1998).

Trichoderma viride tiết cellulose làm tăng phản ứng phòng vệ (phản ứng siêu nhạy cảm) trên cây nho (Calderon và ctv., 1993). Yedidia và ctv. (2001) đã tiến hành thí nghiệm trên cây dưa leo con và nhận thấy khi chủng *Trichoderma harzianum* lên rễ cây sẽ tạo hiện tượng kích kháng nhờ hoạt động của peroxidase và chitinase trong cây.

Theo Clark và ctv. (1955), *T.reesei* cũng sản xuất số lượng lớn enzyme glucanase và cellulase tạo thuận lợi cho biểu hiện của endochitinase.

1.3 KHẢ NĂNG PHÂN HỦY CHẤT HỮU CƠ CỦA NẤM *TRICHODERMA.*

Theo Lynch và Harper (1985) thì *Trichoderma* có khả năng phân hủy xác bã thực vật còn sót lại sau mùa vụ và chuyển chúng thành đường, đồng thời chúng còn có khả năng ký sinh và diệt một số loài nấm bệnh gây bệnh cho cây trồng.

Trichoderma là nấm hoại sinh nên trong hệ sinh thái vi sinh vật đất *Trichoderma* đóng vai trò quan trọng trong việc phân hủy dư thừa thực vật cả trong đất, nhiều loài *Trichoderma* spp.phân hủy tốt nguồn cellulose (Alexander, 1961; Harman, 1996; Kredics và ctv., 2003). Theo Gayal và Khandeparkar (1998), thì *Trichoderma reesei*, *Trichoderma lignorum* và *Trichoderma koningi* tiết ra khá nhiều enzyme cellulase C1 và Cx phân hủy hoàn toàn tế bào chứa cellulose.

Nấm *Trichoderma* có 3 enzyme chủ yếu phân hủy cellulose là endoglucanase (carboxylmethyl cellulose - CMCase), exoglucanase và β-glucoside (Srinivas và Panda, 1998).

Kết quả thí nghiệm của Dương Minh (2003) sau 9 tuần xử lý 7 loại xác bã thực vật như: lục bình, thân đậu nành, thân và lá bắp, thân chuối, rơm, vỏ trấu, bằng nấm *Trichoderma* spp. thì các thực vật đều bị phân hủy cao tới 25,9%.

Khi nuôi *Trichoderma* trên các vật liệu hữu cơ như rơm, lục bình, thân lá bắp, thân chuối, thân đậu nành cho thấy làm tăng quá trình hoai mục vật liệu hữu cơ (Nguyễn Văn Bạc, 2002). Bowen và Harper (1990) đã thử nghiệm thấy rằng *Trichoderma viride* có thể phân hủy 20% cellulose của cọng rơm nguyên sau 84 ngày xử lý.

Theo Alexander (1961) khả năng phân hủy cellulose của nấm *Trichoderma* bị ảnh hưởng bởi các nhân tố môi trường như nhiệt độ, ẩm độ, độ thoáng khí, pH, hàm lượng Nitrogen,…Bên cạnh đó hiệu quả của sự phân hủy này còn phụ thuộc vào vật chất sử dụng và sự tăng trưởng của nấm.

Theo Nguyễn Văn Tuất và Lê Văn Thuyết (2000) nấm *Trichoderma* có tác động trực tiếp lên sự phát triển cây trồng do hoạt động sống nấm sản sinh ra men

Luanvan24

phân hủy glucose, cellulose. Nhờ các men này mà chất hữu cơ trong đất được phân hủy nhanh hơn tăng chất dinh dưỡng dưới dạng dễ hấp thu cho cây trồng, tạo điều kiện cho cây trồng sinh trưởng và phát triển tốt.

1.4 NHỮNG YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN SỰ PHÁT TRIỂN VÀ HOẠT ĐỘNG ĐỐI KHÁNG CỦA NẤM *TRICHODERMA.*

Các yếu tố môi trường có liên quan đến hoạt động của nấm *Trichoderma* như ảnh hưởng của nhiệt độ, ẩm độ, ánh sáng, pH, thuốc trừ sâu, kim loại nặng, vi khuẩn đối kháng, hàm lượng O_2, CO_2 (Kredics và ctv., 2003; Mehrotra, 2000), nguồn năng lượng, dinh dưỡng, (Cook và Baker, 1989), thêm vào đó khả năng sản xuất enzyme còn chịu ảnh hưởng của độ yếm khí cũng như oxy hòa tan, tốc độ lắc,… (Yaoyu Feng và ctv., 2003; Marco và ctv., 2002).

1.4.1 Nhiệt độ

Nhiệt độ tối hảo cho sự phát triển của hầu hết các loài nấm *Trichoderma* là 25 - 30^{0}C (Klein và Evenleigh, 1998; Lại Văn Ê, 2003).

Nhiệt độ là yếu tố quan trọng đối với nấm *Trichoderma*, nhiệt độ còn ảnh hưởng lên sự mọc mầm của của bào tử, sự tăng dài của ống mầm, sự phát triển của sợi nấm, khả năng phân hủy và cạnh tranh, ảnh hưởng đến sản sinh và chuyển hóa các hợp chất bay hơi và không bay hơi (Kredics và ctv., 2003).

Nghiên cứu của Kattany và ctv. (2000) về *Trichoderm*a cho thấy nhiệt độ nuôi ủ thích hợp nhất cho quá trình tiết enzyme chitinase là 40^{0}C; và enzyme β-1,3-glucanase tiết nhiều ở 35^{0}C.

Khả năng tiết enzyme của *Trichoderma* cũng liên quan nhiều đến nhiệt độ, Srinivas và Panda (1998) cho biết *T. reesei* tiết nhiều enzyme nhất ở nhiệt độ 38,2^{0}C nhưng chủng đột biến của chúng M14 và M62 lại có khoảng nhiệt độ thích hợp lên đến 43^{0}C, những nghiên cứu của ông còn cho biết thêm là quá trình tiết enzyme có liên quan chặt chẽ giữa pH và nhiệt độ.

Nhiệt độ còn ảnh hưởng đến hoạt tính của các chất kháng sinh gliotoxin và viridiol do *Trichoderma* và *Gliocladium* tiết ra trong các quá trình trao đổi chất của chúng, gliotoxin sẽ giảm hoạt tính ở nhiệt độ 3 - 18^{0}C và gia tăng hoạt tính ở 21 - 32,5^{0}C, ở nhiệt độ này chúng kháng lại *R. solani* rất tốt (Howell, 1998).

Theo Kubicek-Pranz (1998), những loài *Trichoderma* có nguồn gốc từ các vùng nhiệt đới (như *T. citrinoviride*) sẽ có khoảng nhiệt độ tối hảo cao hơn những loài có nguồn gốc ôn đới (như *T. Polysporum* và *T.viride*).

Luanvan24

1.4.2 Ẩm độ

Ẩm độ là nhân tố chính ảnh hưởng lên sự phân bố tự nhiên của nấm *Trichoderma*. Ngoài ra, nó còn ảnh hưởng lên sự phát triển sinh lý, hàm lượng dưỡng chất hữu dụng của nấm và sự nẩy mầm của bào tử (Hjeljord và Tronsmo, 1998).

1.4.3 Ảnh hưởng của pH môi trường

pH có ảnh hưởng lớn đến sự phát triển và khả năng ký sinh lên nấm gây bệnh cũng như hiệu quả của *Trichoderma* trong việc phòng trừ sinh học bệnh cây (Zaldívar và Velásquez, 2001).

pH môi trường được quyết định bởi nồng độ ion H^+, chính nồng độ ion H^+ có ảnh hưởng đến hệ thống enzyme của tế bào và ảnh hưởng việc hấp thu khoáng, acid hữu cơ của tế bào nấm cho quá trình phát triển cũng như hình thành bào tử (Dasrupta, 1994).

Nấm *Trichoderma* có thể phát triển và tiết enzyme tốt với mức môi trường phù hợp khá rộng từ 2 - 6 nhưng tốt nhất là 4 (Kredics và ctv., 2003). Nhìn chung, khoảng pH thích hợp cho quá trình sinh bào tử ít biến động hơn so với sự phát triển, pH thích hợp cho hình thành bào tử của hầu hết các loại nấm là từ 5 - 5,8 và tùy mức pH khác nhau mà nấm có thể tạo ra các dạng bào tử, cấu trúc của bào tử cũng khác (Dasrupta, 1994).

Theo Cook và Baker (1989) thì Dennis và Webster (1971) cho rằng một số chủng *Trichoderma* tạo ra chất kháng sinh (antibiotics) đặc biệt là ở pH thấp, chẳng hạn *T. harzianum* nhìn chung hoạt động mạnh nhất ở điều kiện acid (Green, 1996). Nhưng các chủng *Trichoderma* khác nhau mà có khoảng pH thích hợp khác nhau (Srinivas và Panda, 1998).

Hiệu quả của quá trình đối kháng phụ thuộc vào hoạt động của enzyme và chịu ảnh hưởng trự tiếp của pH môi trường, theo Cook và Baker (1989) thì Chet và Baker (1980) cho biết *T. harzianum* và *T. hamatum* ký sinh lên *Rhizoctonia solani* và *Sclerotium rolfsii* sản sinh ra β-1,3 glucanase ở pH thích hợp là 4,5 và chitinase ở pH thích hợp là 5,3. Nhưng theo Macro và ctv. (2002) mẻ nuôi cấy là pH = 5,5 sẽ thích hợp hơn cho nấm phát triển và tiết nhiều enzyme nhất.

1.4.4 Ảnh hưởng của nguồn carbon và đạm

Trichoderma là loài nấm có khả năng phân hủy polysaccharide cellulose và những cấu trúc polymer như chitin. Theo Manczinger và Poller (1985) nguồn carbon rất cần thiết để nấm *Trichoderma* mọc thành cụm (phát triển tốt) nguồn carbon được sử dụng hầu hết của các loài nấm được nghiên cứu là: D- glucose, D-galactose, D-fructose, D-mannose. Tổng quát hơn, nguồn carbon tốt nhất cho *Trichoderma* spp. sử dụng là: glucose, galactose, mannose, fructose,

Luanvan24

xylose, cellobiose, (Danielson và Davey, 1973). Trái lại, nguồn carbon mà *Trichoderma* spp. không thể sử dụng được là α-methyl-D-xyloside, α-methyl-mannoside, methanol, ethanol.

Nguồn carbon có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng tạo enzyme của nấm *Trichoderma viride*, việc sử dụng chitin như là nguồn carbon nhằm kích thích tăng khả năng tiết enzyme chitinases (Zaldívar và Velásquez, 2001).

Kết quả nghiên cứu của Lynch và ctv. (1985) về sự cố định đạm của vi khuẩn *Clostridium butyricum* và phân hủy cellulose bởi *T. harzianum* cho thấy hàm lượng cellulose và hemicellulose trong xác bã thực vật rất cao, làm cho tỉ lệ C/N cao, điều này sẽ làm cho sự phân hủy xác bã thực vật chậm lại bởi sự giới hạn của hàm lượng đạm.

Ngoài ra O_2 và CO_2 cũng ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của *Trichoderma*. Mặc dù là những sinh vật hiếu khí nhưng *Trichoderma* spp. có khả năng tồn tại ở những nơi có hàm lượng oxy rất thấp, nguồn oxy và các hoạt động của khuẩn ty là các yếu tố quan trọng trong điều tiết enzyme cellulase (Kubicek-Pranz, 1998 trích dẫn từ Neto và ctv., 1995). Nguồn oxy cung cấp và hoạt động của ti thể là những yếu tố giúp điều hòa hoạt động của enzyme cellulase trên nấm *Trichoderma viride* (Neto và ctv., 1995)

1.4.5 Các yếu tố ảnh hưởng khác

Tốc độ lắc khi nuôi cấy trong môi trường lỏng có ảnh hưởng đến hoạt động của *Trichoderma*. Theo Marco và ctv. (2002) nuôi cấy nấm *Trichoderma* trong môi trường lỏng cần nuôi lắc ở tốc độ 120 vòng/phút để sản xuất ra các loại enzyme. Nhưng theo Srinivas và Panda, (1998) nuôi cấy nấm *Trichoderma reesei* để sản xuất enzyme nên lắc ở tốc độ 160 vòng/phút. Kattany và ctv. (2000) nghiên cứu sản xuất enzyme từ *T. harzianum* đã nhận thấy rằng enzyme chitinase và β-1,3 glucanase được sản sinh ra nhiều nhất khi lắc với tốc độ 150 vòng/phút. Cũng theo Kattany và ctv. (2003) nuôi cấy nấm *Trichoderma* spp. trong môi trường MSM tiết ra nhiều enzyme chitinase và β-1,3 glucanase khi nuôi lắc ở tốc độ 125 vòng/phút (rpm) ở 30^0C trong 7 ngày.

1.5 KHẢ NĂNG KÍCH THÍCH SỰ PHÁT TRIỂN CÂY TRỒNG CỦA *TRICHODERMA*

Bên cạnh tác động của đối kháng với nấm bệnh hại cây trồng, nấm *Trichoderma* còn biểu hiện tác động kích thích đối với sự sinh trưởng và phát triển của cây trồng. Điều này được chứng minh bởi Mattner (2001), khả năng kích thích sự phát triển của cây trồng và ức chế nấm gây bệnh của *Trichoderma* là nhờ vào khả năng tiết ra allelochemical.

Luanvan24

Bailey và Lumsden (1998) cho biết khi dùng huyền phù *T. harzianum* vào trong đất làm tăng sự nẩy mầm, tăng khả năng ra hoa, tăng trọng lượng tươi và chiều cao của ớt, hoa cúc, bắp, cà chua, thuốc lá.

Nòi T 1290-22 của nấm *T. harzianum* còn làm gia tăng số chồi và rễ bắp ngọt trong nhà lưới 66% so với đối chứng (Harman, 2000).

1.6. PHÂN LOẠI ENZYME CELLULASE

Enzyme cellulase thuộc lớp Hydrolases (phản ứng thủy phân), tổ Glycosidases (thủy phân liên kết glucoside), nhóm hydrolyzing O-glycosyl compounds (Phạm Thị Trân Châu và Phan Tuấn Nghĩa, 2007).

Cellulase là enzyme thủy phân cellulose, là hệ enzyme phức hợp bao gồm cellulase C1, cellulase Cx và glucosidase. Trong đó, cellulase C1 và Cx thủy phân celluose thành cellobiose, còn glucosidase tiếp tục thủy phân cellobiose thành glucose (Trần Minh Tâm, 2000). Theo Trần Minh Tâm, 2000 thì Wood và Mc.Cral (1979) cho rằng hệ enzyme phân hủy cellulose gồm 3 loại:

- Exocellulase hay exobiohydrolase: hay còn gọi là EC1 hay hoạt tính C1(C1-activity).
- Endocellulase hay endoglucanase: hay còn gọi là endohafact hay hoạt tính Cx (Cx-activity).
- β-glucosidase.

Luanvan24

Chương 2: PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 PHƯƠNG TIỆN

2.1.1 Thời gian và địa điểm

- Địa điểm: bộ môn Bảo Vệ Thực Vật, khoa Nông Nghiệp & Sinh Học Ứng Dụng, trường Đại Học Cần Thơ.
- Thời gian: thí nghiệm được thực hiện từ tháng 11- 2008 đến tháng 4 - 2009.

2.1.2 Vật liệu thí nghiệm

2.1.2.1 Thiết bị

- Nồi thanh trùng ướt hiệu Sibata (Nhật), model KL300.
- Tủ cấy hiệu Dalton (Nhật), model FAP1300AN.
- Cân điện tử: Hiệu Sibata (Nhật), model JPN-200W và hiệu Sartorius (Đức), model BL1500.
- Máy đo pH hiệu Oaklon.
- Máy ly tâm lạnh hiệu Hermle Z323K.
- Máy đo quang phổ (Safas UV mC^2 spectrometry).
- Máy lắc hiệu Vortex Stuart SA6, Uk.

2.1.2.2 Dụng cụ

- Bình tam giác 250 ml.
- Đĩa petri đường kính đáy 9,5 cm, nắp 10 cm.
- Lamme đếm hồng cầu (haemocytometer) hiệu Malassez (Đức).
- Thùng giữ lạnh và nước đá.

2.1.2.3 Hóa chất

- Bovine serum albumin (Sigma).
- Coomassie Brilliant Blue G250 (Sigma).
- Các hóa chất dùng xác định hoạt tính của enzyme: cellobiose (Merck), K- Natartarate (Merck), 3,5-dinitrosalicylic acid (Sigma), Na metabisufite, citric acid monohydrate...
- Các hóa chất cần thiết khác: Ethanol, phosphoric acid, NaOH, phenol, nước cất.

Luanvan24

2.1.2.4*Nguồn nấm:* được nhận từ bộ môn Bảo Vệ Thực Vật, khoa Nông Nghiệp & Sinh Học Ứng Dụng, trường Đại Học Cần Thơ

Chủng nấm *Trichoderma*	Địa điểm thu thập
T - BM 2a;	Huyện Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long
T - LV 1a	Huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp
T - OM 2a	Quận Ô Môn, thành phố Cần Thơ
T - CB 1b	Huyện Cái Bè, tỉnh Tiền Giang
T - CB 8c	Huyện Cái Bè, tỉnh Tiền Giang
T - TB 4a	Huyện Tam Bình, tỉnh Vĩnh Long
T - CTTG 2e	Huyện Châu Thành, tỉnh Tiền Giang
T TTAG 3b	Huyện Tri Tôn, tỉnh An Giang

2.1.2.5 Môi trường nuôi cấy

Môi trường PDA (Potato Dextrose Agar) (Shurfleff and Averre III, 1997).

Khoai tây	200 g
Dextrose	20 g
Agar	20 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	6,5 - 6,8

Môi trường TSM lỏng (*Trichoderma* Selective Medium Broth) (Elad & Chet, 1983).

$MgSO_4.7H_2O$	0,2 g
K_2HPO_4	0,9 g
KCl	0,15 g
NH_4NO_3	1 g
Glucose	1 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	6,5
CMC (Carboxyl Methyl Cellulose)	5 g

*** Chuẩn bị hoá chất**

- Chất nền: 15 mM cellobiose trong 0,05M citrate buffer, pH 4,8.
- Citrate buffer 1M

Citric Acid Monohydrate	210 g
Nước cất	750 ml
Thêm NaOH cho đến pH = 4,3	

Luanvan24

Luanvan24

- Thuốc thử Dinitrosalicylic Acid (DNS)

Hỗn hợp	
Nước cất	1416 ml
3,5-Dinitrosalicylic acid	10,6 g
NaOH	19,8 g
Hòa tan tất cả, sau đó thêm:	
Rochelle salts (Na-K tartarate)	306 g
Na metabisufite	8,3 g

2.2 PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

* **Thí nghiệm**: Thí nghiệm được bố trí theo thể thức khối hoàn toàn ngẫu nhiên với tám chủng nấm và bốn lần lặp lại, mỗi lần lặp lại trên một bình tam giác. Tổng cộng 8 chủng nấm x 4 lặp lại = 32 bình thí nghiệm.

*** Bố trí thí nghiệm**

Cho 100 ml môi trường TSM lỏng vào bình tam giác (loại 250 ml) và thanh trùng ở 121^0C trong 25 phút. Sau khi để nguội hoàn toàn, tiến hành chủng nấm *Trichoderma* spp. vào môi trường nuôi cấy trên với mật số 10^6 bào tử/ml môi trường khi để nguội hoàn toàn. Tất cả các nghiệm thức được đặt trên máy lắc, lắc với tốc độ 140 vòng/phút (rpm).

Các nghiệm thức được bố trí như sau:

Sau 7 và 10 ngày nuôi lắc thu dịch trích môi trường được lọc qua phễu bằng giấy lọc Whatman $N^0$5 và thu lấy:

- Phần dịch trích đã lọc cho vào ống nghiệm đem dự trữ ngay ở nhiệt độ 4^0C để ước lượng hàm lượng protein trong mẫu dịch trích và khảo sát hoạt tính của enzyme cellulase bằng Spectrophotometer.
- Phần sinh khối được thu lấy toàn bộ, sấy ở 105^0C trong 8 giờ và cân trọng lượng khô của sinh khối.

2.2.1 Chỉ tiêu theo dõi

2.2.1.1 Ước lượng hàm lượng protein trong mẫu dịch trích

Theo Bradford (1976), protein chuẩn là Bovine Serum Albumin, chất nhuộm màu protein là Coomassie Brilliant Blue G250.

Luanvan24

Thành phần tham gia phản ứng:

● Bradford reagent	2 ml
● Buffer thích hợp	0 µl
● Dịch trích	1000 µl

* Cách pha Bradford reagent: Theo Bradford (1976).

* Cách pha Buffer

Pha dung dịch đệm:

- Dung dịch A: đong 11,55 ml CH_3COOH 0,2 M, sau đó thêm nước cất cho đủ 1000 ml.
- Dung dịch B: cân 27,2g CH_3COONa pha vào 1 lít nước cất với nồng độ 0,2M.
- Buffer = 105 ml A + 395 ml B + thêm nước cất cho đủ 1 lít (pH = 5,2).

* Cách đo mẫu

- Cuvette chuẩn: 2,5 ml Bradford reagent + 1000 µl buffer.
- Cuvette mẫu: 2,5 ml Bradford reagent + 1000 µl dịch trích.
- Lắc hỗn hợp mẫu bằng máy lắc (Vortex Stuart SA6, Uk), chờ đủ thời gian 15 phút, đo độ hấp thu (OD_{abs}) ở λ = 595 nm.
- Lặp lại 2 lần/mẫu, lấy trị số trung bình. So sánh chỉ số OD đo được với đường chuẩn, tính ra hàm lượng protein tổng số trong mẫu dịch trích.

2.2.1.2 Khảo sát hoạt tính cellulase

Các bước thực hiện:

- Thêm 1 ml enzyme vào ống nghiệm.
- Giữ ở nhiệt độ 50^0C bằng máy Waterbath.
- Thêm 1 ml chất nền hòa tan, lắc đều.
- Ủ ở nhiệt độ 50^0C đúng 30 phút.
- Ngâm ống nghiệm trong nước nóng đúng 5 phút.
- Làm nguội ống nghiệm trong nước lạnh.
- Thêm 1 ml DNS, lắc hỗn hợp bằng máy lắc (Vortex Stuart SA6, UK) trong 15 phút. Sau đó đo độ hấp thu (OD_{abs}) ở λ = 540 nm.

Luanvan24

Cellobiose blank: 1 ml chất nền cellobiose
1 ml enzyme citrate buffer
Để ở nhiệt độ 50^0C trong 30 phút
Để trong nước nóng 5 phút, làm nguội

Enzyme blank: 1 ml citrate buffer
1 ml enzyme đã pha loãng
Để ở nhiệt độ 50^0C trong 30 phút
Để trong nước nóng 5 phút, làm nguội

Autozero với cuvette chuẩn: Cellobiose blank

Phân tích: Cho vào ống nghiệm ước lượng sản phẩm khử hình thành do tác động của enzyme từ 1000 µl dịch trích thô theo phương pháp so màu ở $\lambda = 540$ nm.

Đo lặp lại 2 lần/mẫu.

2.3 XỬ LÝ THỐNG KÊ

Số liệu được phân tích thống kê theo phần mềm IRRISTAT for Dos . Phân tích diễn thế của OD_{abs} theo thời gian theo phương pháp thí nghiệm tổng hợp (Combined Experiments) với thời điểm là 1 nhân tố.

Luanvan24

Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 KHẢO SÁT KHẢ NĂNG TIẾT ENZYME CELLULASE CỦA CÁC CHỦNG NẤM *TRICHODERMA* SPP. TRONG ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM.

3.1.1 Ghi nhận tổng quát

Các chủng nấm *Trichoderma* được sử dụng nuôi lắc trong môi trường TSM lỏng, thu dịch trích, đo chỉ số OD của protein và hoạt tính enzyme cellulase các chủng nấm được chọn. Thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện phòng thí nghiệm với nhiệt độ trung bình là 27 - 30°C và ẩm độ không khí tương đối 69 - 85%. Kết quả cho thấy các chủng nấm *Trichoderma* thử nghiệm đều có khả năng tiết enzyme cellulase và chỉ số OD của protein cao. Trong đó, hai chủng T- TTAG3b và T-CB8c có trị số OD enzyme cellulase và protein cao hơn các chủng còn lại. Ngoài ra, các chủng nấm *Trichoderma* cho giá trị OD sau 10 ngày nuôi lắc cao hơn so với 7 ngày nuôi lắc. Về sinh khối, hai chủng nấm T-CB1b và T- LV1a có sinh khối cao nhất và chủng TTAG3b có sinh khối khá cao sau 10 ngày nuôi lắc.

3.1.2 Kết quả thí nghiệm

3.1.2.1 Sinh khối của các chủng nấm

Kết quả ghi nhận ở bảng 3.1

Bảng 3.1 cho thấy trong 8 chủng *Trichoderma* khảo sát thì có 2 chủng T-LV1a và T-CB1b cho sinh khối cao hơn với các chủng còn lại. Trong đó, các chủng nấm cho sinh khối cao nhất là T-CB1b (0,610 g/lít), T-LV1a (0,365 g/lít), kế đến là chủng T-TTAG3b (0,350 g/lít) phát triển tốt nhất khi nuôi ở môi trường TSM lỏng sau 10 ngày lắc. Các chủng còn lại đều có sinh khối cao hơn đối chứng (0,285 g/lít).

Luanvan24

Bảng 3.1 Sinh khối khô (g/lít môi trường) của các chủng nấm *Trichoderma* spp. trong môi trường TSM lỏng sau 10 ngày nuôi lắc (Bộ môn Bảo Vệ Thực Vật, 2008 - 2009).

Trichoderma (T)	Sinh khối khô nấm *Trichoderma*
ĐC	0.285 f
T-TB4a	0,308 e
T-BM2a	0,310 e
T-CB1b	0.610 a
T-LV1a	0,368 b
T-CB8c	0,3300 d
T-OM2a	0,303 e
T-CTTG2e	0,330 d
T-TTAG3b	0,350 c
CV(%)	3.2
F tính	**

Ghi chú: *(**) Trong cùng một cột và hàng, các số liệu mang cùng mẫu tự theo sau thì không khác biệt nhau ở độ ý nghĩa 1% qua phép thử Duncan*

3.1.2.2 Ước lượng protein trong dịch trích của các chủng nấm Trichoderma

Bảng 3.2 Độ hấp thu (OD_{abs}) của protein trong các dịch trích có chủng các chủng nấm *Trichoderma* khác nhau sau 7 ngày và 10 ngày nuôi lắc (Bộ môn Bảo Vệ Thực Vật, 2008 - 2009).

***Trichderma* (T)**	**Trị số OD của protein sau các ngày nuôi lắc**		**Độ khác biệt**
	7 ngày	**10 ngày**	
ĐC	0,0000 h	0,0000 f	ns
T-TB4a	0,0090 g	0,0260 e	**
T-BM2a	0,0125 e	0,0310 d	**
T-CB1b	0,0125 e	0,0260 e	**
T-LV1a	0,0113 f	0,0268 e	**
T-CB8c	0,0395 b	0,0493 b	**
T-OM2a	0,0290 d	0,0260 e	-**
T-CTTG2e	0,0345 c	0,0403 c	**
T-TTAG3b	0,0428 a	0,0555 a	**
Trung bình	0,0213 B	0,0313 A	**
CV (%)	3,1		

Ghi chú: *(**), (ns) Trong cùng một cột và hàng, các số liệu mang cùng mẫu tự theo sau thì không khác biệt nhau ở độ ý nghĩa 1% và không khác biệt qua phép thử Duncan.*

Kết quả bảng 3.2 độ hấp thu (OD_{abs}) protein đo được trong dịch trích các chủng nấm *Trichoderma* thu được sau 7 ngày nuôi lắc đều ghi nhận được hai chủng nấm T-TTAG3b và T-CB8c đạt cao nhất và có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với các chủng còn lại. Hai chủng T-CTTG2e và T-OM2a có chỉ số OD protein ở mức độ trung bình.

Luanvan24

Còn ở thời điểm 10 ngày sau khi chủng, chỉ số OD protein tương tự như 7 ngày sau khi chủng, chỉ có chủng T-OM2a ở thời điểm này lại có chỉ số OD protein thấp nhất (ở 7 ngày cho chỉ số OD protein ở mức trung bình). Ngược lại chủng T-BM2a từ chủng thấp ở 7 ngày nuôi lắc, nhưng ở 10 ngày nuôi lắc thì có chỉ số OD protein ở mức độ trung bình.

Hai chủng nấm T-CB8c và T-TTAG3b đạt giá trị OD cao ở cả hai thời điểm 7 ngày và 10 ngày nuôi lắc. Điều này chứng tỏ hai chủng T-CB8c và T- TTAG3b có chứa hàm lượng protein cao trong dịch trích thu được qua 7 ngày và 10 ngày nuôi lắc.

So sánh trị số OD protein của các chủng nấm ở 7 và 10 ngày nuôi cấy cho thấy hầu như đều có chỉ số OD sau 10 ngày cao hơn 7 ngày nuôi lắc. Tuy nhiên, chủng T-OM2a lại có trị số OD sau 7 ngày cao hơn 10 ngày.

Từ kết quả trên cho thấy hai chủng nấm T-TTAG3b và T-Cb8c này có lượng protein trong dịch trích cao và có thời gian sớm hơn các chủng khác đã khảo sát.

3.1.2.3 Khả năng tiết enzyme cellulase của các chủng nấm Trichoderma

Kết quả trình bày ở bảng 3.3 cho thấy:

Độ hấp thu (OD_{abs}) enzyme cellulase đo được trong dịch trích các chủng nấm *Trichoderma* thu được sau 7 ngày và 10 ngày nuôi lắc đều ghi nhận được hai chủng nấm T-TTAG3b, T-CB8c đạt cao nhất và có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với các chủng còn lại. Hai chủng nấm T-CTTG2e và T-OM2a có chỉ số OD enzyme cellulase khá cao so với các chủng còn lại.

Luanvan24

Bảng 3.3 Độ hấp thu (OD_{abs}) của enzyme cellulase trong các dịch trích có chủng các chủng nấm T*richoderma* khác nhau sau 7 ngày và 10 ngày nuôi lắc (Bộ môn Bảo Vệ Thực Vật, 2008 - 2009).

Trichoderma (**T**)	Trị số OD của enzyme cellulase sau các ngày nuôi lắc		Độ khác biệt
	7 ngày	10 ngày	
ĐC	0,0000 h	0,0000 g	ns
T-TB4a	0,0018 h	0,0048 f	**
T-BM2a	0,0030 g	0,0085 e	**
T-CB1b	0,0048 f	0,0058 f	ns
LV1a	0,0075 e	0,0123 d	**
T-CB8c	0,0140 b	0,0290 b	**
T-OM2a	0,0115 d	0,0220 c	**
T-CTTG2e	0,0128 c	0,0223 c	**
T-TTAG3b	0,0210 a	0,0518 a	**
Trung bình	0,0086 B	0,0175 A	**
CV (%)	6,3		

Ghi chú: *(**), (ns) Trong cùng một cột và hàng, các số liệu mang cùng mẫu tự theo sau thì không khác biệt nhau ở độ ý nghĩa 1% qua phép thử Duncan.*

Tương tự như protein thì chỉ số OD enzyme cellulase ở thời điểm 7 và 10 ngày nuôi lắc có các chủng T-TTAG3b và T-CB8c cao nhất, chủng T-CTTG2e và T- OM2a ở mức trung bình. Mặc khác, thời gian thể hiện hoạt tính của các chủng này cũng sớm hơn các chủng còn lại trong cùng điều kiện của thí nghiệm.

Các chủng nấm được chọn T-TTAG3b và T-CB8c có trị số OD cellulase cao hay nói cách khác là chúng có hoạt tính enzymes cellulase cao trong điều kiện nuôi lắc và thời gian thí nghiệm. Kết quả này phù hợp với khảo sát của Dương Phạm Minh Châu (2008) cho biết hai chủng nấm T-TTAG3b và T-CB8c có khả năng phân hủy được nhiều rơm nhất trong điều kiện của phòng thí nghiệm. Điều này khẳng định, hai chủng nấm này vừa tiết có hàm lượng protein cao và hoạt tính mạnh hơn các chủng khác đã khảo sát.

Thời gian nuôi lắc cũng ảnh hưởng đến việc tiết enzyme cellulase của các chủng nấm *Trichoderma* spp. Hầu hết các chủng nấm điều có hoạt tính enzyme cellulase ở thời điểm 10 ngày cao gấp 2 lần so với 7 ngày ngày nuôi lắc (trừ T-CB1b không khác biệt nhau giữa 2 thời điểm này).

Từ kết quả này hai chủng *Trichoderma* có triển vọng (T-TTAG3b và T-CB8c) sẽ được chọn tiếp tục được thí nghiệm trong điều kiện nhà lưới và ngoài đồng để đánh giá khả năng phân hủy cellulose đặc biệt là rơm rạ và chọn ra được chủng nấm có hiệu quả tốt nhất phục vụ cho sản xuất nông nghiệp theo hướng sinh học.

Luanvan24

Hình 1. Bố trí thí nghiệm trên máy lắc ngang

Hình 2: Máy đo độ hấp thu quang phổ Spectromerter

Hình 3. Chuẩn bị mẫu đo độ hấp thu (OD_{abs}) của enzyme cellulase

Luanvan24

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

KẾT LUẬN

- Hai chủng nấm T-CB1b và T-LV1a đạt sinh khối cao nhất, kế đến là chủng T-TTAG3b đạt sinh khối trung bình sau 10 ngày nuôi lắc.
- Hàm lượng protein trong dịch trích của hai chủng nấm T-TTAG3b và T-CB8c tốt nhất, và T-CTTG2e ở mức trung bình sau 7 ngày và 10 ngày nuôi lắc.
- Hoạt tính enzyme cellulase của hai chủng nấm T-TTAG3b và T-CB8c cao nhất, T-CTTG2e và T-OM2a ở mức trung bình.
- Hàm lượng protein và hoạt tính enzyme cellulase ở thời điểm nuôi lắc 10 ngày cao hơn 7 ngày nuôi lắc.
- Chủng nấm *Trichoderma* T-TTAG3b có khả năng tiết enzyme cao nhất và nhanh hơn so với các chủng khác khảo sát ở trên . Bên cạnh đó, T-TTAG3b còn cho sinh khối khô tương đối cao.

ĐỀ NGHỊ

Khảo sát các chủng nấm *Trichoderma* khác và để có thể chọn ra được thêm nhiều chủng nấm tiết được nhiều enzyme cellulase trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Thử nghiệm các chủng nấm *Trichoderma* đã khảo sát có khả năng tiết enzyme cellulase cao trong điều kiện phòng thí nghiệm đưa vào nhà lưới và ra ngoài đồng nhằm đánh giá và chọn lọc những chủng có hiệu quả cao phân hủy được nhiều xác bã thực vật như rơm rạ, lá cây, thân bắp, lục bình… nhằm phục vụ trong sản xuất nông nghiệp.

Luanvan24

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alexander, M., 1961. Microbial Ecology. Pages 207 – 223. Jonh Wiley and sons. New York and London.

Agrios, G.N., 1997. Plant pathology. Deparment of plant pathology, University of Florida. 4th edition. 635p.

Bailey, B .A and Lumsden, R. D., 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliodadium* volume: 185 – 201.

Bradford, M., 1976 "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" *Anal. Biochem*. **72:**248-254.

Bowen, R.M. and Harper, S.H.T., 1990. Decomposition of Wheat and Related compound by Fungi Isolated from Straw in Arable Soil. Soil biol and Biochemistry. 22: 3, 393 – 399.

Bùi Huy Đáp, 1980. Cây lúa Việt Nam. NXB Nông Nghiệp, trang 462 – 472.

Calderon, A.A., Zapata, J.M., Munoz, R., Pedreno, M.A., Rosbarcelo, A., 1993. Resveratrol production as a part of hypersensitive response of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viride*. New Phytol, pp: 124 - 463.

Cao Cường, Nguyễn Đức Lượng, 2003. Khảo sát quá trình cảm ứng enzyme chitinaza và celluloza của *Trichoderma harzianum* ảnh hưởng của hai enzyme này lên nấm bệnh *Sclerotium rolfsi.* Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc. nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật Hà Nội, trang 321 - 324.

Clark, M.E., Hayes, C.K., Harman, G.E., Penttila, M., 1995. Improved production of *Trichoderma harzianum* endochitinase by expression in *Trichoderma reesei*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 62, No.6, pp: 2145 - 2151.

Cook, R.J., Baker, K.F., 1989. The nature and practice of biological control of plant pathologens. The America Phytopathological society, St. paul, Minnesota. 539p.

Cruz, J.L., Toro, P.J.A., Beni'tez, Llobell, A., 1995a. Purification and characteriation of an Endo-β-1,6-Glucanase from *Trichoderma harzianum* that í related to its mycoparasitism. *In journal of bacteriology*. American Society for Microbiology. Vol. 177, No. 7, pp: 1864 - 1871.

Danielson, R.M. and Davey, C.B., 1973a. Carbon and nitrogen nutrition of Trichoderma. Soil Biol. Biochem. 5: 505 – 515.

Danielson, R.M. and Davey, C.B., 1973c. Carbon and nitrogen nutrition in *Trichoderma*. As quote by Kubicek-Pranz, E. M. 1998. Nutrition, cellular structure and basic metabolic pathways in Trichoderma and Gliocladium. Soil Biol. Biochem. 5: 506 - 515.

Dasgupta, M.K. 1994. Principles of plant pathology. Applied publishers limited, New Delhi Bombay Calcutta Madras Nagpur Ahmedabad Bangalore Hyderabad Lucknow.

Dương Minh, Đỗ Thị Trang Nhã, Lâm Thanh Liêm, Lê Lâm Cường, Phạm Văn Kim, 2003a. Đánh giá khả năng đối kháng của các chủng nấm *Trichoderma* spp. nội địa với bệnh thối rễ do nấm *Fusarium solani* trên cam quýt tại đồng bằng sông Cửu Long. Hội thảo Khoa học Cục Bảo Vệ Thực Vật (Vũng Tàu 24 - 25/6/2003), trang:

Luanvan24

82 - 85.

Luanvan24

Dương Phạm Minh Châu, 2008. Khảo sát khả năng đối kháng của các chủng *Trichoderma* spp. đối với các chủng *Fusarium Moliriforme* gây bệnh lúa von tại An Giang.Tiểu luận tốt nghiệp Kỹ sư Nông Học, khoa Nông Nghiệp và Sinh học Ứng dụng, trường Đại học Cần Thơ, 30 trang.

Feng, Zhimin He, Say Leong Ong, Jiang Yong Hu, Zhigang Zhang and Wun Jern. 2003. Optimization of agitation, aeration and temperature conditions for maximum - mannanase production Enzyme and Microbial Technology. (32: 282 – 289).Gams, W. and J. Bissetts, 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. In *Trichoderma* and *Gliodadium* volume 1 (Edited by Kubicek Christian, P and Harman Gary. E). Taylor and Francis Ltd, pp. 3 - 34.

Gams, W. and Meyer, W., 1998. What exactly is *Trichoderma harzianum* Rifai? Mycologia 90 (inpress).

Gayal, S.G. and Khandeparkar, V.G., 1998. Cellulase from penicilium funiculosum and its application. Fungi in Biotechnology.

Ghose, T. K., 1987. Measurement of cellulase activities. Biochemical Engineering Reseach Centre, Indian Institute of Technology, New Delhi-110016, Indian. *Pure & Appl. Chem*. 59 (2): 257 – 268.

Green, H., 1996. Ecology of *Trichoderma* spp. In relation to biocontrol of plant díeases caused by *Pythium ultimum*. Ph. D. thesis. Deparment of plant biology, Plant Pathology Section The Roya Veterinary and Argicultural University, Copenhagen, Denmark.

Grondona, I. R., Hermosa, M., Tejada, M.D., Gomis, P.F., Matros, P.P., Bridge, E. Monte and I. Garcia-Acha., 1997. Physiological and Biochemical Characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soil borne fungal plant pathogens. American society for Mycrobiologr. 63 (8): 3189 - 3198.

Harman, G.E., 1996. *Trichoderma* for biocontrol of plant pathogens: from basic research to comercialized production. Deparments of Horticultural Science and of Plant Pathology, Cornell University NYSASE. Cornell community cofenrence on biological control.

Hjeliod, L., Tronsmo, A., 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. (*In: Trichoderma and Gliocladium, Kubicek, C.P., Harman, G.E.*). Taylor and Francis Ltd, pp: 1331 - 145.

Howell, C.R., 1998. Chapter 8: The role of antibiosis. In *Trichoderma and Gliocladium.* 2: 173 - 179p.

Kattany, M.H., Somitsch, W. Robra., K.H., El-Katatny, M.S. and Gubitz, G.M.. 2000. Production of chitinase and β-1,3-Glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsiii.* Food Technol. Biotechnol. 38 (3): 173 - 180.

Klein, D., Eveleigh, D.E., 1998. Ecology of *Trichoderma*. (*In: Trichoderma and Gliocladium, Kubicek, C.P., Harman, G.E.*). Taylor and Francis Ltd, pp: 56 - 74.

Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekres, A., Kevei, F., Nagy, E., 2003. Influence of environmental parameter on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technol. Biotechnol*. 41(1): 37 - 41.

Luanvan24

Kubicek-Pranz, E.M., 1998. Nutrition, cellular stucture nad basic metabolc pathways in *Trichoderma* and *Gliocladium*. (*In: Trichoderma and Gliocladium, Kubicek, C.P., Harman, G.E.*). Taylor and Francis Ltd, pp: 95 - 119.

Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Meyer, W., Kubicek, C.P. and Borner, T., 1997. Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including relacted teleomorphs basedon analysis of ribosomal DNA internal trasncribed spacer sepuences. *Mycologia* 89: 442 - 460.

Lại Văn Ê, 2003. Nghiên cứu sử dụng vi sinh vật đối kháng trong phòng trừ sinh học nấm *Fusarium oxysporum* và *Rhizoctonia* Kuhn. gây bệnh chết cây con trên bông vải (*Gossypium hirsutum* L.). Luận án thạc sĩ khoa Nông Nghiệp. Khoa Nông Nghiệp, Trường đại học Cần Thơ, 124 trang.

Lynch, J.M and Harper, S.H.T., 1985. The Microbiol Upgrading of Straw for Agriculture Use.

Philosophycal Transactions of the Royal Society of London 310: 1144, 221 - 226.

Marco, J.L.D., Valadares-Inglis, M.C., Felix, C.R., 2002. Production of hydrolytic enzyme by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis perniciosa,* the causal agent of Witches' broom of cocoa. *Brazillian journal of Microbiology.* 34: 33 - 38.

Manczinger and Poller, 1985. Cluster analysis of carbon source utilization patterns of Trichoderma isolated. As quoted by Kubicek-Pranz, E. M. 1998. Nutrition, cellular structure and basic metabolic pathways in *Trichoderma* and *Gliocladium*. System. Appl. Microbiol. 9: 214 – 217.

Mattner, S. W., 2001. The role of allelopathy in the control of soil borne diseases. Agriculture Victoria, Institute for Horticultural Development Private Bag 15, scoresby Business centre VIC, 3176.

Mehrotra, R.S., 2000. Plant pathology. Mcraw Hill, New Delhi, 17th. Pp.57 - 58.; 232 - 258.

Meyer, R.J and Planskowitz, J.S., 1989. Scanning electronic mocroscopy of conidia and conidial matrix of *Trichoderma. Mycologia*. 81: 312 – 317.

Neto, A.J., Rossini, C.H., EL-Gogary, S., Henrique-Silva, F., Crivellaro O. and EL- Dorry, H., 1995. Mitochondrial funtions mediate cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. As quote by Kubicek-Pranz, E. M. 1998. Nutrition, cellular stucture and basic metabolic pathwaysin *Trichoderma* and *Gliocladium.* Biochemistry. 34: 10456 - 10462.

Nguyễn Thế Quyết, Nguyễn Thị Thanh Nga, Nguyễn Thanh Hà, Lê Thị Ánh Hồng, 2003. Một số kết quả bước đầu trong việc phân lập nhận dạng và thử các hoạt tính sinh học của một số chủng *Trichoderma*. Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, trang 364 – 368.

Nguyễn Thị Ngân, 2007. Khảo sát khả năng kích kháng và đối kháng của nấm *Trichoderma* spp. đối với nấm *Fusarium solani* gây bệnh thối rễ cam quýt. Luận văn tốt nghiệp Kỹ sư Nông Học, khoa Nông Nghiệp và Sinh học Ứng dụng, trường Đại học Cần Thơ, 60 trang.

Nguyễn Đức Lượng, Nguyễn Hữu Phước, 1996. Công nghệ vi sinh vật tập II; Vi sinh vật học công nghiệp. Trường Đại học Bách Khoa Thành phố Hồ Chí Minh

Luanvan24

Nguyễn Lân Dũng, 1983. Một số sản phẩm của vi nấm. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.

Luanvan24

Nguyễn Văn Bạc, 2002. Khảo sát sự phân hủy của nấm *Trichoderma* spp. trên một số dư thừa thực vật. Tiểu luận tốt nghiệp Kỹ sư Nông Học). Bộ môn Bảo Vệ Thực Vật, khoa Nông Nghiệp, trường Đại học Cần Thơ.

Nguyễn Văn Tuất, Lê Văn Thuyết, 2000. Sản xuất chế biến và sử dụng thuốc bảo vệ thực vật thảo mộc và sinh học. Nhà xuất bản Nông Nghiệp.

Phạm Thị Trân Châu, Phan Tuấn Nghĩa, 2007. Công nghệ sinh học tập 3: Enzyme và ứng dụng. Nhà xuất bản Giáo Dục.

Phạm Văn Kim, 2000. Giáo trình Vi Sinh Học Đại Cương. Tủ sách Đại Học Cần Thơ. 181 trang.

Roiger, D.J, Jeffers, S.N. and Caldwell, R.W., 1991. Occurrence of *Trichoderma* species in apples orchard and woodland soils, Soil Biol. Biochem. 23: 353 – 359.

Srinivas, R. and Panda, T., 1998. pH and thermal statility studies of carboxymethyl cellulose from intergeneric fusants of *Trichoderma reesei/ Saccharomyces cereviride*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology No.21,178-183.

Trần Minh Tâm, 2000. Công nghệ vi sinh ứng dụng. Nhà xuất bản Nông Nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh.

Trần Thị Thuần, Nguyễn Thị Ly, Nguyễn Văn Dũng, 2000. Kết quả sản xuất và sử dụng nấm đối kháng *Trichoderma* spp. phòng thừ bệnh hại cây trồng 1996 - 2000. Tuyển tập công trình nghiên cứu Bảo Vệ Thực Vật 1996 - 2000. Viện Bảo Vệ Thực Vật. Nhà xuất bản Nông Nghiệp Hà Nội, trang 221 - 227.

Turner, D., Kovas, W., Kuhls, K., Lieckfeltd, E., Peter, B., Arisan-Atac, I., Strauss, J., Samuels, G. J., Borner, T., Kubicek, C. P., 1997. Biogrography and Phenotypic Variation in *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* and associated *Hypocrea* species. Mycol. Res 101: 449b - 459.

Vũ Triệu Mân và Lê Lương Tề, 1998. Giáo trình bệnh cây nông nghiệp. Nhà xuất bản nông nghiệp Hà Nội

Webster. J and Lomas, N., 1994. Does *Trichoderma viride* produce gliotoxin and viridin? *Trans. Br. Mycol. Soc*. 47: 535 - 549.

Wells, H. D., 1993. *Trichoderma* as a biocontrol agent. *In* K. G. Mukerji, K. L, Garg (eds.). Biocontrol of plant diseases. CBS Publishers and Distributors (1: 71 - 79).

Yedidia, I., Srivastva, A.K., Kapulnik, Y., Chet, I., 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plant. Plant and soil. pp: 235 - 242.

Zaldívar, M. and Velásquez, J. C., 2001. *Trichoderma aureoviride*7-12, a mutant with enhanced production of lytic enzyme. Its potential use in waste cellulose degradation and or biocontrol. ẹB Electronic Journal of Biotechnology. Vol. 4 No. 3.

Luanvan24

PHỤ CHƯƠNG

1. Bảng phân tích phương sai sinh khối của các chủng nấm *Trichoderma* sau 10 ngày nuôi lắc trong môi trường TSM lỏng (Bộ môn Bảo Vệ Thực Vật, 2008 – 2009).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F
Lặp lại (R)	3	0,00000142	0,00000047	<1
Nghiệm thức (T)	8	0,00313572	0,00039197	295,51 **
Sai số	24	0,00003183	0,00000133	
Tổng	35	0,00316897		

2. Bảng phân tích phương sai độ hấp thu (OD_{abs}) protein của dịch trích các chủng nấm *Trichoderma* sau 7 và 10 ngày nuôi lắc trong môi trường TSM lỏng (Bộ môn Bảo Vệ Thực Vật, 2008 – 2009).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F
Lặp lại (R)	3	0,00000208	0,00000094	1,41 ns
Nghiệm thức	17	0,01721090	0,00101241	1521,72 **
Ngày (N)	1	0,00179001	0,00179001	2690,52 **
Trichoderma (T)	8	0,01450403	0,00181300	2725,07 **
(N)x(T)	8	0,00091686	0,00011461	172,26 **
Sai số	51	0,00003393	0,00000067	
Tổng	71	0,01724765		

3. Bảng phân tích phương sai độ hấp thu (OD_{abs}) của enzyme cellulase của dịch trích các chủng nấm *Trichoderma* sau 7 và 10 ngày nuôi lắc trong môi trường TSM lỏng (Bộ môn Bảo Vệ Thực Vật, 2008 – 2009).

Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	Giá trị F
Lặp lại (R)	3	0,00000050	0,00000017	<1
Nghiệm thức	17	0,01098294	0,00064606	955,04 **
Ngày (N)	1	0,00142222	0,00142222	2102,42 **
Trichoderma (T)	8	0,00811519	0,00101440	1499,55 **
(N)x(T)	8	0,00144553	0,00018069	267,11 **
Sai số	51	0,00003450	0,00000068	
Tổng	71	0,01101794		

Luanvan24