

CHARACTERISTICS OF SOME *PENICILLIUM* STRAINS ISOLATED FROM THE RHIZOSPHERE SOIL OF *Nanhaia speciosa* (Champ. ex Benth.) NORTHERN VIETNAM

Ong Xuan Phong¹, Nguyen Thi Kim Loan¹, Pham Thi Thi¹, Nguyen Thi Minh Nguyet¹,
Duong Tien Vien¹, Nguyen Van Thiep¹, Chu Duc Ha², Cao Phi Bang³, La Viet Hong^{1*}

¹Hanoi Pedagogical University 2, ²University of Engineering and Technology

³Hung Vuong University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 17/3/2024	<i>Nanhaia speciosa</i> (Champ. ex Benth.) is an important herb in traditional Asian medicine, known for its ability to boost the immune system and body's resistance, reduce fatigue, and improve memory and cognitive function. Research on the microbiome of <i>N. speciosa</i> in Northern Vietnam has isolated several strains of microorganisms capable of decomposing organic and mineral compounds. Among them, the fungal component <i>Penicillium</i> isolated from <i>N. speciosa</i> root pools is quite abundant. Isolation and molecular identification have identified 9 strains of <i>Penicillium</i> fungi: <i>P. janthinellum</i> Pj-LHOP1; <i>P. janthinellum</i> Pj-LHOP2; <i>P. janthinellum</i> Pj-LHOP3; <i>P. subrubescens</i> Ps-LHOP2; <i>Penicillium</i> sp. Psp-LHOP1; <i>P. simplicissimum</i> Ps-LHOP3; <i>Penicillium</i> sp. Psp-LHOP2; <i>P. simplicissimum</i> Ps-LHOP1; <i>P. simplicissimum</i> Ps-LHOP4. All isolated strains exhibit strong cellulose and xylan decomposition capabilities. The strain <i>Penicillium subrubescens</i> Ps-LHOP2 shows the highest cellulose degradation, with a clearing zone diameter of 7.95 cm; strains belonging to the species <i>P. janthinellum</i> have clear zone diameters ranging from 6.92 to 7.68 cm. The most efficient xylan degradation is exhibited by the strain <i>Penicillium subrubescens</i> Ps-LHOP2, with a clearing zone diameter of 5.56 cm; strains belonging to the species <i>P. janthinellum</i> exhibit xylan clearing zone diameters ranging from 5.27 to 5.28 cm.
Revised: 20/6/2024	
Published: 20/6/2024	
KEYWORDS	
<i>N. speciosa</i> Champ.	
Cellulose	
<i>Penicillium</i>	
Xylan	
Rhizosphere	

ĐẶC ĐIỂM CỦA MỘT SỐ CHỦNG *PENICILLIUM* PHÂN LẬP TỪ ĐẤT TRỒNG CÁT SÂM *Nanhaia speciosa* (Champ. ex Benth.) Ở PHÍA BẮC VIỆT NAM

Ong Xuân Phong¹, Nguyễn Thị Kim Loan¹, Phạm Thị Thi¹, Nguyễn Thị Minh Nguyệt¹,
Dương Tiến Viện¹, Nguyễn Văn Thiệp¹, Chu Đức Hà², Cao Phi Bằng³, La Việt Hồng^{1*}

¹Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2, ²Trường Đại học Công nghệ - ĐHQG Hà Nội

³Trường Đại học Hùng Vương

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 17/3/2024	Cây cát sâm là một loại thảo dược quan trọng trong y học cổ truyền châu Á, chúng có khả năng tăng cường miễn dịch và sức đề kháng của cơ thể, giảm mệt mỏi, cải thiện trí nhớ và chức năng tư duy. Nghiên cứu hệ vi sinh vật trong vườn cát sâm ở phía Bắc Việt Nam đã phân lập được nhiều chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy chất hữu cơ và chất khoáng khó tiêu. Trong đó, nấm <i>Penicillium</i> phân lập từ vùng rễ cây cát sâm khá phong phú. Chín chủng nấm <i>Penicillium</i> : <i>P. janthinellum</i> Pj-LHOP1; <i>P. janthinellum</i> Pj-LHOP2; <i>P. janthinellum</i> Pj-LHOP3; <i>P. subrubescens</i> Ps-LHOP2; <i>Penicillium</i> sp. Psp-LHOP1; <i>P. simplicissimum</i> Ps-LHOP3; <i>Penicillium</i> sp. Psp-LHOP2; <i>P. simplicissimum</i> Ps-LHOP1; <i>P. simplicissimum</i> Ps-LHOP4 đã được phân lập và định danh bằng trình tự vùng ITS. Các chủng phân lập được đều có khả năng phân hủy cellulose và xylan rất mạnh. Chủng <i>P. subrubescens</i> Ps-LHOP2 phân hủy cellulose mạnh nhất, đường kính vòng phân giải 7,95 cm; các chủng thuộc loài <i>P. janthinellum</i> có đường kính vòng phân giải từ 6,92 đến 7,68 cm. Phân hủy xylan mạnh nhất có chủng <i>P. subrubescens</i> Ps-LHOP2, vòng phân giải đạt 5,56 cm; các chủng thuộc loài <i>P. janthinellum</i> , đường kính vòng phân giải xylan từ 5,27 - 5,28 cm.
Ngày hoàn thiện: 20/6/2024	
Ngày đăng: 20/6/2024	
TỪ KHÓA	
Cát sâm	
Cellulose	
<i>Penicillium</i>	
Xylan	
Vùng rễ	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.9898>

* Corresponding author. Email: laviethong@hpu2.edu.vn

1. Giới thiệu

Cây cát sâm (*Nanhaia speciosa* (Champ. ex Benth.) J. Compton & Schrire (2019)) là một loại cây thân gỗ leo lâu năm thuộc họ Đậu và phân bố chủ yếu ở Nam Trung Quốc và Việt Nam [1], [2]. Cát sâm trước đây có tên khoa học *Millettia speciosa*, sau chuyển thành *Callerya speciosa*, hiện nay thường gọi là *Nanhaia speciosa*. Cây cát sâm được dùng để điều trị nhiều loại bệnh, bao gồm viêm gan, viêm khớp, ho, tê ở cổ tay hoặc đầu gối, lưu lượng máu thấp, thiếu máu, bệnh lao, viêm phế quản mãn tính và viêm gan mãn tính [3].

Hệ vi sinh vật vùng rễ trong vườn cát sâm rất quan trọng, có nhiều vi khuẩn và nấm đóng vai trò như là phân bón sinh học, có khả năng phân hủy các chất hữu cơ và vô cơ thành chất dễ tiêu để cây hấp thụ, giải phóng các enzyme, thúc đẩy sinh trưởng, tăng cường tính chống chịu cho cây. Vi sinh vật vùng rễ có quan hệ cộng sinh giúp rễ cây hút nước và dinh dưỡng hiệu quả hơn, ngược lại rễ cây cung cấp cho vi sinh vật nguồn thức ăn cần thiết [4]-[6]. Trong số đó, các loài nấm cộng sinh vùng rễ, điển hình như nhóm *Penicillium* được chứng minh là nhóm vi sinh vật phổ biến, có khả năng phân hủy phế phẩm giàu cellulose, hemicellulose có ích cho trồng trọt nói chung và cây cát sâm nói riêng.

Nghiên cứu của Võ Thị Ngọc Cẩm và cộng sự (2024) [7] cho biết chủng nấm *Penicillium janthinellum* (PH-L3) phân hủy mụn dừa và xác mía mạnh hơn nấm *Trichoderma* sp. Chủng *P. janthinellum* NCIM1366 được chứng minh có khả năng sinh tổng hợp cellulase mạnh, mạnh hơn chủng *Trichoderma reesei* RUT-C30 thường dùng để thủy phân cellulose trong sản xuất ethanol [8]. Nghiên cứu của Soeka và Ilyas (2020) về đặc tính và hoạt động của enzyme, cho biết hoạt tính cellulase tối ưu đạt được sau thời gian ủ hai ngày, nhiệt độ 40°C, pH 5 và nồng độ cơ chất CMC ở mức 2%; chỉ số phân giải cellulose là 3,3 [9]. Nấm *Penicillium* còn có tiềm năng đầy hứa hẹn trong việc xử lý nước thải có chứa kim loại nặng, làm sạch môi trường, và loài *P. janthinellum* P1 có khả năng chịu crom cao, đang được nghiên cứu cho mục đích này [10]. Nấm *P. simplicissimum* có thể đóng vai trò là giải pháp cho vấn đề do polyetylen gây ra trong tự nhiên. Sowmya và cộng sự (2015) đã nghiên cứu khả năng phân hủy polyetylen của loài *P. simplicissimum* cho tỉ lệ phân hủy polyetylen đã qua xử lý được 38%. Các enzyme phân hủy polyetylen đã được sàng lọc từ loài *P. simplicissimum* được xác định là laccase và mangan peroxidase [11]. Nguyễn Văn Thiệp và cộng sự (2019) đã phân lập, tuyển chọn các chủng nấm có khả năng phân hủy chất hữu cơ để sản xuất chế phẩm vi sinh hoặc tạo phân bón sinh học hữu cơ (BFP) có hiệu quả cao cho cây chè và cây cà phê chè. Nhóm đã lựa chọn các chủng *Chaetomium* PT2, *Trichoderma* DB, *Mucor* PT1, *Cunninghamella* SL2, *Penicillium* TN1, *Aspergillus* PT để tạo ra phân bón sinh học hữu cơ [12].

Trong phạm vi bài viết này, chúng tôi trình bày đặc điểm hoạt tính cellulose và hemicellulose của một số chủng *Penicillium* phân lập từ đất trồng cát sâm ở một số tỉnh phía Bắc của Việt Nam.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu là các mẫu đất thu thập ở các vườn trồng cát sâm ở Lạng Sơn, Bắc Giang và Vĩnh Phúc.

Các chủng nấm *Penicillium* mới được phân lập từ đất quanh rễ của cây cát sâm. Các hóa chất dùng trong sinh học phân tử; primers, Master Mix 2X (Công ty Cổ phần Phù Sa Genomics, Việt Nam).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật

Phân lập theo phương pháp pha loãng mẫu của Soyong và Quimio (1989) [13]: Cân 1g đất nghiền nhỏ, hòa với 9 ml nước cất đã khử trùng trong ống nghiệm, lắc trên máy vortex cho tan đều. Lấy 0,5 ml dung dịch pha loãng 10^{-5} cho vào petri có môi trường PDA (Potato Dextrose Agar: 20 g dextrose, 20 g agar, nước luộc từ 200 g khoai tây cho 1 lít môi trường), trang đều trên bề mặt môi trường và đặt ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Khi nấm phát triển trên môi trường PDA, làm thuần

bằng phương pháp cấy đơn bào tử (đặt đĩa dưới kính lúp soi nổi, dùng que cấy cắt từng bào tử đã nảy mầm và cấy lên đĩa petri chứa môi trường PDA, khi nấm phát triển thấy tản nấm đồng nhất là nấm đã thuần chủng).

2.2.2. Định danh vi sinh vật bằng chỉ thị phân tử vùng ITS

Tách chiết DNA từ nấm:

Cho 100 mg nấm vào ống eppendorf 1,5 ml, 1 viên bi sắt đường kính 3 mm, làm lạnh trong nitơ lỏng và nghiền bằng thiết bị nghiền bi. Bổ sung 700 μ L dung dịch lysis buffer (50 mM Tris HCl, 50 mM EDTA, 3% SDS, 1% β -mercaptoethanol) và ủ qua đêm ở nhiệt độ 65°C. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút. Thu phần dung dịch phía trên vào trong ống eppendorf 1,5 ml mới và loại bỏ cặn. Thêm 700 μ L hỗn hợp phenol:chloroform:isoamyl alcohol tỉ lệ 25:24:1, lắc đều ống và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch nổi thu được tiếp tục rửa bằng chloroform theo tỉ lệ 1:1 và ly tâm. Tủa DNA bằng isopropanol ở -20°C trong 2 giờ và ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 20 phút. Loại bỏ dung dịch phía trên và rửa kết tủa bằng ethanol 70%, ly tâm mẫu ở tốc độ 15.000 vòng/phút trong 10 phút, loại bỏ dung dịch phía trên, làm khô cặn và hòa tan DNA bằng 100 μ L TE buffer. DNA tổng số của các mẫu nấm được chạy điện di kiểm tra trước khi thực hiện phản ứng PCR.

Khuếch đại trình tự vùng ITS bằng phản ứng PCR:

Phản ứng PCR sử dụng các mồi ITS1F/ITS4R [14] có trình tự của ITS1F: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4R: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'.

Phản ứng PCR có thể tích 20 μ L gồm: 10 μ L Master Mix; 0,5 μ L ITS1F, 0,5 μ L ITS4R; 3 μ L DNA tổng số; 5 μ L nước đệm ion khử. Chu trình phản ứng PCR như sau: 94°C trong 1 phút; 35 chu kỳ 94°C trong 30 giây, 51°C trong 20 giây, 72°C trong 1 phút; kéo dài ở 72°C trong 8 phút và giữ mẫu ở 10°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1,5% và được tinh sạch bằng Kit GeneJET Gel Extraction Kit (Cat#K0691, Thermo).

Giải trình tự và phân tích trình tự:

Sản phẩm PCR tinh sạch được giải trình tự tại Công ty Trách nhiệm hữu hạn DNA sequencing (Việt Nam); trình tự được so sánh với các trình tự đã công bố trên GenBank bằng công cụ tìm kiếm BLAST trên NCBI. Dùng phần mềm MEGA version 11.0.13 xây dựng cây phả hệ của các chủng nấm bằng thuật toán maximum likelihood với giá trị bootstrap 1000 lần lặp lại, từ đó xác định quan hệ gần gũi giữa chủng nấm đã phân lập được với chủng đã công bố trên GenBank.

2.2.3. Đánh giá hoạt tính vi sinh vật

Xác định khả năng phân hủy cellulose theo Tolan và Foody (1999) [15]:

Chủng nấm nghiên cứu được lên môi trường PYG (1,23 g peptone, 1,25 g yeast extract, 3 g glucose, 18 g agar cho 1 lít môi trường), khi nấm phát triển khoảng 1/2 đĩa petri, chuyển sang môi trường CBM (0,1 g ammonium dihydrogen phosphate, 0,2 g potassium chloride, 0,2 g magnesium sulfate heptahydrate, 0,2 g calcium chloride, 250 ml carboxymethyl cellulose 4%, 12 g agar cho 1 lít môi trường). Nấm phát triển trên môi trường CBM được khoảng 50-60%, dùng thuốc thử Red congo (2%) đổ ngập nấm và để trong 15 phút. Sau đó đổ bỏ Red congo và rửa bằng nước cất vô trùng. Sau khi đã rửa sạch bằng nước cất thì ngâm đĩa trong dung dịch NaCl (tỉ lệ NaCl và nước là 1:1). Quan sát trên đĩa, nếu thấy môi trường có khoảng trong (vàng đục) là dấu hiệu của cellulose bị phân giải, nên đó là CMC không bị phân hủy. Quan sát sự đổi màu và đo đường kính vòng phân giải sau 15 phút tới 24 giờ.

Xác định khả năng phân hủy xylan của các chủng nấm theo Pointing (1999) [16]:

Nuôi cấy nấm trên môi trường xylan, khi nấm phát triển được khoảng 50-60% thì đổ dung dịch thuốc thử iodine 1% lên trên, sau 15 phút đổ bỏ iodine và rửa sạch bằng nước cất. Quan sát sự chuyển màu của tản nấm từ sau 15 phút tới 24 giờ và đo đường kính (ĐK) vòng phân giải theo [15], [17].

Hoạt tính enzyme mạnh yếu được tính theo kích thước vòng phân giải [18]:

Quy ước như sau:

Hoạt tính enzyme rất mạnh $D-d \geq 25$ mm: ++++
 Hoạt tính enzyme mạnh $20 \text{ mm} \leq D-d < 25$ mm: +++
 Hoạt tính enzyme trung bình $10 \text{ mm} \leq D-d < 20$ mm: ++
 Hoạt tính enzyme yếu $D-d < 10$ mm: +
 Trong đó D là đường kính vòng phân giải, d là đường kính lỗ thạch.

3. Kết quả và bàn luận

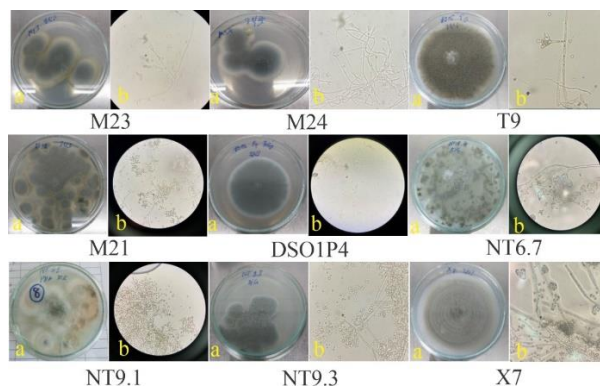
3.1. Phân lập nấm *Penicillium* ở vùng rễ cát sâm

Tổng số chín chủng nấm có hình thái khuẩn lạc của chi *Penicillium* được lựa chọn để xác định tên khoa học gồm ba chủng M23, M24 và T9 thu thập từ các vườn cát sâm ở Tân Yên, Bắc Giang; hai chủng M21 và DS01P4 phân lập từ mẫu đất cát sâm ở Sơn Động, Bắc Giang; ba chủng NT6.7, NT9.1 và NT9.3 từ các vườn cát sâm ở Ngọc Thanh, Vĩnh Phúc; tại Lộc Bình, Lạng Sơn có 1 chủng X7 (Bảng 1).

Bảng 1. Các chủng nấm *Penicillium* thu thập từ đất trồng cát sâm

STT	Chủng phân lập	Địa phương
1	M23	Tân Yên, Bắc Giang
2	M24	Tân Yên, Bắc Giang
3	T9	Tân Yên, Bắc Giang
4	M21	Sơn Động, Bắc Giang
5	DS01P4	Sơn Động, Bắc Giang
6	NT6.7	Ngọc Thanh, Vĩnh Phúc
7	NT9.1	Ngọc Thanh, Vĩnh Phúc
8	NT9.3	Ngọc Thanh, Vĩnh Phúc
9	X7	Lộc Bình, Lạng Sơn

Các chủng nấm thuần có các đặc điểm hình thái điển hình của chi nấm *Penicillium*. Đặc điểm chung của các chủng thu thập có khuẩn lạc định hình (chủng T9; DS01P4; X7) hoặc không định hình (chủng M23; M24; M21; NT6.7; NT9.1; NT9.3), màu xanh xám và xám, sợi nấm không màu, có vách ngăn, cành bào tử phân sinh chia nhánh, trên mỗi đầu nhánh phân chia tiếp thành dạng rẽ quạt (Hình 1).



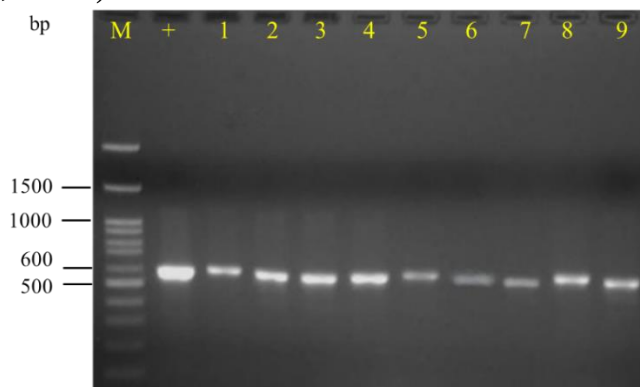
Hình 1. Hình thái một số chủng *Penicillium* phân lập từ đất trồng cát sâm;

a. hình chủng nấm trên đĩa petri; b. hình ảnh sợi nấm dưới kính hiển vi độ phóng đại của vật kính 40X.

Các chủng này được định danh phân tử bằng chỉ thị vùng ITS, kết quả sản phẩm điện di thể hiện ở Hình 2.

Kết quả giải trình tự vùng ITS của các chủng nấm thuộc chi *Penicillium*, so sánh dữ liệu trên GenBank và xây dựng cây phát sinh loài cho thấy chủng M23, M24 và T9 tương đồng và cùng nhánh với các chủng *Penicillium janthinellum* có mã số trên GenBank là MW113422.1, AF033434.1, EF200089.1; chủng M21 cùng nhánh với chủng *Penicillium subrubescens* có mã số OM372688.1; các chủng DS01P4 và NT9.1 cùng nhánh với các chủng có mã số MH137631.1 và OM106672.1 là *Penicillium* sp.; các chủng NT6.7, NT9.3 và X7 tương đồng và cùng nhánh với

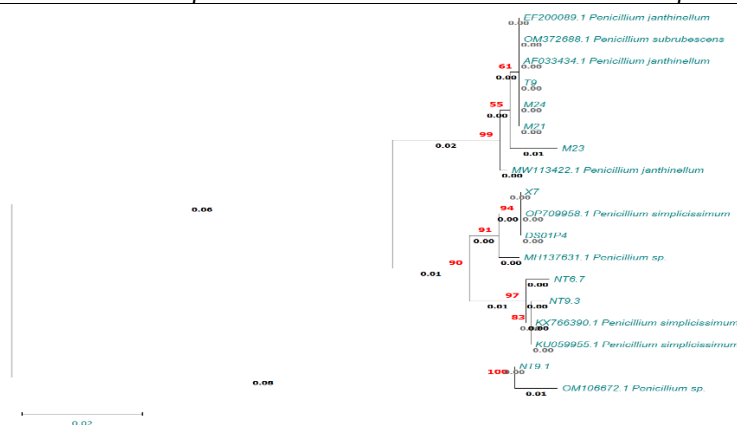
các chủng *Penicillium simplicissimum* có mã số định danh là KX766390.1, KU059955.1 và OP709958.1 (Bảng 2, Hình 3).



Hình 2. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% với điện thế 50V trong 40 phút
M: marker (Bio-Helix) 100-3,000 bp, (+) đối chứng dương, 1-9: tương ứng số thứ tự các chủng *Penicillium* (theo Bảng 1)

Bảng 2. Kết quả định danh chủng *Penicillium* phân lập từ đất trồng cát sâm dựa trên trình tự ITS

TT	Chủng thu thập	Chủng nấm trên GenBank	Chủng nấm định danh
		Chủng nấm ID	
1	M23	<i>Penicillium janthinellum</i> MW113422.1	<i>P. janthinellum</i> Pj-LHOP1
2	M24	<i>Penicillium janthinellum</i> AF033434.1	<i>P. janthinellum</i> Pj-LHOP2
3	T9	<i>Penicillium janthinellum</i> EF200089.1	<i>P. janthinellum</i> Pj-LHOP3
4	M21	<i>Penicillium subrubescens</i> OM372688.1	<i>P. subrubescens</i> Ps-LHOP2
5	DS01P4	<i>Penicillium</i> sp. MH137631.1	<i>Penicillium</i> sp. Psp-LHOP1
6	NT6.7	<i>Penicillium simplicissimum</i> KX766390.1	<i>P. simplicissimum</i> Ps-LHOP3
7	NT9.1	<i>Penicillium</i> sp. OM106672.1	<i>Penicillium</i> sp. Psp-LHOP2
8	NT9.3	<i>Penicillium simplicissimum</i> KU059955.1	<i>P. simplicissimum</i> Ps-LHOP1
9	X7	<i>Penicillium simplicissimum</i> OP709958.1	<i>P. simplicissimum</i> Ps-LHOP4

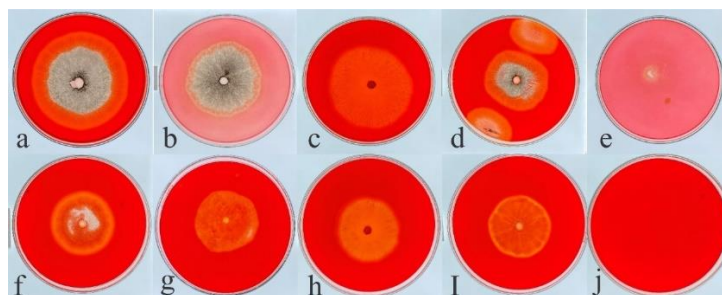


Hình 3. Cây phát sinh loài của chín chủng *Penicillium* dựa trên trình tự ITS
Trên mỗi nhánh, giá trị (màu đỏ) là giá trị bootstrap 1000 lần lặp lại; giá trị (màu đen) là tỉ lệ nucleotide khác biệt giữa các mẫu.

Các loài *Penicillium* ở bảng 2 thuộc ngành Ascomycota lớp Eurotiomycetes bộ Eurotiales họ Aspergillaceae giống *Penicillium*.

3.2. Đánh giá hoạt tính phân hủy Cellulose

Cellulose là thành phần chính trong các chất hữu cơ cần phân hủy trong sản xuất nông nghiệp. Các chủng nấm *Penicillium* ở bảng 2 đã được đánh giá hoạt tính enzyme phân hủy cellulose, kết quả trình bày bằng hình ảnh ở hình 4.



Hình 4. Hoạt tính cellulase của một số chủng *Penicillium* trên môi trường CMC;

(a) *P. subrubescens* Ps-LHOP2, (b) *P. janthinellum* Pj-LHOP1, (c) *P. janthinellum* Pj-LHOP2, (d) *P. janthinellum* Pj-LHOP3, (e) *Penicillium* sp. Psp-LHOP2, (f) *P. simplicissimum* Ps-LHOP1, (g) *P. simplicissimum* Ps-LHOP3, (h) *P. simplicissimum* Ps-LHOP4, (i) *Penicillium* sp. Psp-LHOP1, (j) đối chứng

Các chủng nấm được cấy trên môi trường có chứa cellulose (CMC), sau 3 ngày đánh giá thấy tất cả các chủng nấm đều có phản ứng dương tính (+) với CMC, nghĩa là các chủng nấm nghiên cứu đều sản sinh enzyme phân hủy cellulose. Kết quả trong hình 2, thấy rõ ràng sau khi nhuộm Red Congo nấm phân hủy CMC tạo thành vùng sáng, trong khi vùng chưa bị phân hủy có màu đỏ của Red Congo. Vùng sáng của các chủng nấm có kích thước lớn nhỏ khác nhau, đó là do mức độ phân hủy mạnh yếu thông qua sự khuếch tán của cellulase trong môi trường (bảng 3).

Bảng 3. Hoạt tính phân hủy cellulose của một số chủng *Penicillium*

TT	Chủng nấm	ĐK vòng phân giải (cm)	Mức độ mạnh yếu
1	<i>P. janthinellum</i> Pj-LHOP1	7,68 ab	++++
2	<i>P. janthinellum</i> Pj-LHOP2	6,95 b	++++
3	<i>P. janthinellum</i> Pj-LHOP3	6,92 b	++++
4	<i>P. subrubescens</i> Ps-LHOP2	7,95 a	++++
5	<i>Penicillium</i> sp. Psp-LHOP1	4,95 c	++++
6	<i>P. simplicissimum</i> Ps-LHOP3	4,65 c	++++
7	<i>Penicillium</i> sp. Psp-LHOP2	4,73 c	++++
8	<i>P. simplicissimum</i> Ps-LHOP1	4,88 c	++++
9	<i>P. simplicissimum</i> Ps-LHOP4	4,70 c	++++
	CV (%)	9,99	
	LSD ₀₅	0,91	

Chú thích: CV: hệ số biến thiên, LSD: sai biệt nhỏ nhất có ý nghĩa

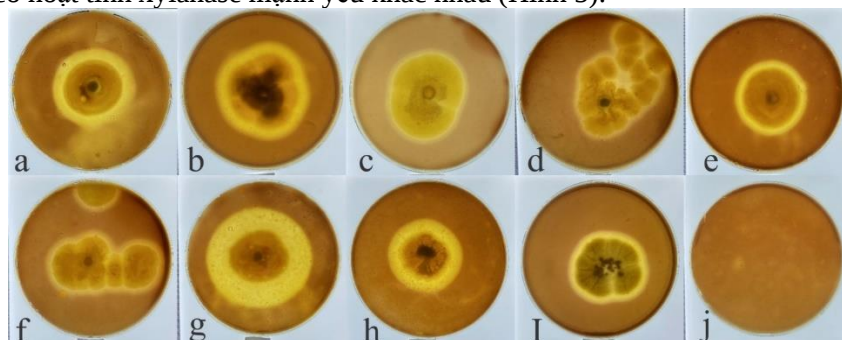
Tất cả các chủng nấm nghiên cứu đều có hoạt tính phân giải cellulose rất mạnh, đường kính vòng phân hủy từ 4,70 đến 7,95 cm và đều lớn hơn 25 mm, theo quy ước của Đặng Quang Hải và Trần Thị Thanh Thủy (2022) [18], xếp loại mức độ rất mạnh (++++). Trong các chủng nghiên cứu, hoạt tính phân giải cellulose mạnh nhất là chủng *P. subrubescens* Ps-LHOP2, có đường kính vòng phân giải đạt 7,95 cm; chủng *P. janthinellum* Pj-LHOP1 có đường kính vòng phân giải cellulose là 7,68 cm, các chủng *P. janthinellum* Pj-LHOP2 và *P. janthinellum* Pj-LHOP3 có đường kính vòng phân hủy 6,92-6,95 cm, tương đương nhau và yếu hơn chủng *P. subrubescens* Ps-LHOP2, tiếp theo là nhóm các chủng *Penicillium* sp. Psp-LHOP1, *P. simplicissimum* Ps-LHOP3, *Penicillium* sp. Psp-LHOP2, *P. simplicissimum* Ps-LHOP1 và *P. simplicissimum* Ps-LHOP4 (đường kính vòng phân giải từ 4,70-4,95 cm), có hoạt tính phân hủy cellulose tương đương nhau và yếu hơn nhóm các chủng của loài *P. janthinellum*.

Các chủng *Penicillium* nghiên cứu thành 3 nhóm theo thứ tự hoạt tính cellulase giảm dần như sau: nhóm (1) *P. subrubescens* Ps-LHOP2 (a); nhóm (2) *P. janthinellum* Pj-LHOP1 (ab), *Penicillium janthinellum* Pj-LHOP2 (b), *P. janthinellum* Pj-LHOP3 (b); nhóm (3) *Penicillium* sp. Psp-LHOP1 (c), *P. simplicissimum* Ps-LHOP1 (c), *Penicillium* sp. Psp-LHOP2 (c), *P. simplicissimum* Ps-LHOP4 (c), *P. simplicissimum* Ps-LHOP3 (c).

3.3. Đánh giá hoạt tính phân giải Xylan

Xylan là loại hemicellulose phổ biến nhất trong tự nhiên sau cellulose. Xylan là thành phần chính của hemicellulose thành tế bào thực vật. Trong tự nhiên, có rất nhiều vi sinh vật có khả năng phân hủy xylan một cách hiệu quả. Đặc biệt, nấm sợi đã chứng tỏ khả năng tiết ra nhiều loại xylanase, các loài thuộc chi *Penicillium* tiết các enzym phân giải xylan và việc sử dụng xylanase từ các loài này ngày càng trở nên quan trọng trong các ứng dụng công nghệ sinh học [19].

Các chủng nấm *Penicillium* ssp. phân lập từ các vườn cát sâm đã được nuôi cấy trên môi trường xylan. Sau khi rửa thuốc thử thấy xuất hiện quang sáng màu vàng chanh ở tất cả các đĩa thí nghiệm. Sự mất màu ở một số đĩa còn lan rộng ra cả những khu vực nấm chưa phát triển tới. Kết quả này khẳng định rằng tất cả các chủng nấm khảo sát đều có hoạt tính phân hủy xylan. Quan sát sự chuyển màu ở các chủng thấy có sự khác nhau, kích thước các quang sáng cũng khác nhau, đó là do các chủng nấm có hoạt tính xylanase mạnh yếu khác nhau (Hình 5).



Hình 5. Hoạt tính phân hủy xylan của một số chủng *Penicillium*

(a) *P. subrubescens* Ps-LHOP2, (b) *P. janthinellum* Pj-LHOP1, (c) *P. janthinellum* Pj-LHOP2, (d) *P. janthinellum* Pj-LHOP3, (e) *Penicillium* sp. Psp-LHOP2, (f) *P. simplicissimum* Ps-LHOP1, (g) *P. simplicissimum* Ps-LHOP3, (h) *P. simplicissimum* Ps-LHOP4, (I) *Penicillium* sp. Psp-LHOP1, (j) đối chứng

Kích thước vòng phân giải xylan của các chủng nấm *Penicillium* thí nghiệm đã được đánh giá, kết quả ở bảng 4.

Bảng 4. Hoạt tính phân hủy xylan của một số chủng nấm *Penicillium*

TT	Chủng nấm	ĐK vòng phân giải (cm)	Mức độ mạnh yếu
1	<i>P. janthinellum</i> Pj-LHOP1	5,27 ab	++++
2	<i>P. janthinellum</i> Pj-LHOP2	5,27 ab	++++
3	<i>P. janthinellum</i> Pj-LHOP3	5,28 ab	++++
4	<i>P. subrubescens</i> Ps-LHOP2	5,56 a	++++
5	<i>Penicillium</i> sp. Psp-LHOP1	4,00 e	++++
6	<i>P. simplicissimum</i> Ps-LHOP3	4,28 de	++++
7	<i>Penicillium</i> sp. Psp-LHOP2	5,07 b	++++
8	<i>P. simplicissimum</i> Ps-LHOP1	4,65 c	++++
9	<i>P. simplicissimum</i> Ps-LHOP4	4,42 cd	++++
	CV (%)	4,59	
	LSD 05	0,34	

Kích thước vòng phân giải xylan của tất cả chín chủng *Penicillium* nghiên cứu đều khá lớn, lớn hơn 25 mm theo quy ước của Đặng Quang Hải và Trần Thị Thanh Thủy (2022) [18]. Như vậy hoạt tính enzyme phân hủy xylan rất mạnh (++++).

Tuy nhiên, các chủng *Penicillium* khác nhau có hoạt tính phân hủy xylan mạnh yếu khác nhau. Chủng *P. subrubescens* Ps-LHOP2 có hoạt tính enzyme mạnh nhất, biểu hiện qua đường kính vòng phân giải xylan lớn nhất (5,56cm); các chủng *P. janthinellum* Pj-LHOP1, *P. janthinellum* Pj-LHOP2, *P. janthinellum* Pj-LHOP3 và *Penicillium* sp. Psp-LHOP1 có hoạt tính enzyme tương đương nhau, do kích thước vòng phân hủy từ 5,07 - 5,28 cm, sai khác không có ý nghĩa ở mức xác

suất 95%; chủng *P. simplicissimum* Ps-LHOP1 có hoạt tính yếu hơn chủng *Penicillium* sp. Psp-LHOP2; chủng *P. simplicissimum* Ps-LHOP3 và chủng *P. simplicissimum* Ps-LHOP4 có hoạt tính tương đương nhau; hoạt tính enzyme thấp nhất là chủng *Penicillium* sp. Psp-LHOP1.

Mặc dù các chủng *Penicillium* nghiên cứu có hoạt tính phân hủy cellulose và xylan khác nhau, nhưng hoạt tính của các chủng này là rất mạnh, biểu hiện qua kích thước vòng phân hủy đều lớn hơn 25 mm. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với các kết luận về khả năng phân hủy cellulose của các chủng *Penicillium* và ứng dụng chúng trong sản xuất nhiên liệu sinh học, sản xuất cellulase công nghiệp và nhiều ứng dụng khác [8], [9], [19], [20].

4. Kết luận

Quá trình thu thập và phân lập vi sinh vật vùng rễ cây cát sâm ở một số tỉnh phía Bắc, đã xác định 9 chủng nấm *Penicillium* thuộc các loài *P. janthinellum*, *P. subrubescens*, *P. simplicissimum* và hai chủng xác định tên khoa học đến chi là *Penicillium* sp. Psp-LHOP1 và *Penicillium* sp. Psp-LHOP2. Các chủng *Penicillium* phân lập có khả năng phân hủy cellulose và xylan mạnh với đường kính vòng phân giải cơ chất ≥ 4 cm. Các chủng này có tiềm năng ứng dụng sản xuất phân bón vi sinh trong nông nghiệp.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Giáo dục và Đào tạo qua đề tài “Phân lập, tuyển chọn các nhóm vi sinh vật hữu ích phục vụ sản xuất chế phẩm sinh học nhằm cải tạo đất và thúc đẩy sinh trưởng của cây cát sâm (*Millettia speciosa* Champ.)”, mã số B.2023-SP2-02.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] J. A. Compton *et al.*, "The Callerya Group redefined and Tribe Wisterieae (Fabaceae) emended based on morphology and data from nuclear and chloroplast DNA sequences," *PhytoKeys*, vol. 125, p. 1, 2019.
- [2] Z. Wei, L. Pedley, C. Wu, and P. Raven, "Millettia Wight & Arnott," *Flora of China*, vol. 10, pp. 176-181, 2010.
- [3] S. Yao *et al.*, "Hormonal and transcriptional analyses provides new insights into the molecular mechanisms underlying root thickening and isoflavonoid biosynthesis in Callerya speciosa (Champ. ex Benth.) Schot," *Scientific Reports*, vol. 11, no. 1, p. 9, 2021.
- [4] B. J. Enagbonma, A. E. Fadiji, A. S. Ayangbenro, and O. O. Babalola, "Communication between plants and rhizosphere microbiome: exploring the root microbiome for sustainable agriculture," *Microorganisms*, vol. 11, no. 8, p. 2003, 2023.
- [5] R. Chandnani and L. V. Kochian, "The Role of the Root Microbiome in the Utilization of Functional Traits for Increasing Plant Productivity," in *Plant Microbiome for Plant Productivity and Sustainable Agriculture*. Springer, 2023, pp. 55-80.
- [6] S. M. Fleishman, M. Centinari, T. H. Bell, and D. M. Eissenstat, "Assessing microbial communities across the fine root landscape," *Journal of experimental botany*, vol. 74, no. 6, pp. 1751-1757, 2023.
- [7] T. N. C. Vo, T. K. O. Nguyen, T. T. Q. Nguyen, M. V. Duong, T. X. Do, K. N. Nguyen, and H. S. Do, "Isolation and identification of some native organic agricultural waste decomposing fungi from intensive rice cultivation soil at Phong Hoa village, Lai Vung district, Dong Thap Province," *CTU Journal of Innovation and Sustainable Development*, vol. 36, p. 1-11, 2015.
- [8] A. Sreeja-Raju *et al.*, "Penicillium janthinellum NCIM1366 shows improved biomass hydrolysis and a larger number of CAZymes with higher induction levels over Trichoderma reesei RUT-C30," *Biotechnology for biofuels*, vol. 13, pp. 1-15, 2020.
- [9] Y. Soeka and M. Ilyas, "Production and characterization of cellulases derived from saprophytic fungi Penicillium bilaiae InaCC F16," in *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, vol. 591, no. 1. IOP Publishing, 2020, p. 012015.
- [10] B.-B. Chi and Y.-N. Lu, "Sequencing and comparative genomic analysis of a highly metal-tolerant Penicillium janthinellum P1 provide insights into its metal tolerance," *Frontiers in microbiology*, vol. 12, p. 663217, 2021.

-
- [11] H. Sowmya, Ramalingappa, M. Krishnappa, and B. Thippeswamy, "Degradation of polyethylene by *Penicillium simplicissimum* isolated from local dumpsite of Shivamogga district," *Environment, development and sustainability*, vol. 17, pp. 731-745, 2015.
- [12] V. T. Nguyen, K. Soyong, T. K. O. Nguyen, H. Q. Pham, and H.Y. Pham, "Research and development of enzymatic producing fungi as biofertilizer for tea and Arabica coffee production in northern Vietnam," *International Journal of Agricultural Technology*, vol. 15, no. 5, pp. 797-806, 2019.
- [13] K. Soyong and T. Quimio, "A taxonomic study on the Philippine species of *Chaetomium*," *The Philippine Agriculturist*, vol. 72, no. 1, pp. 59-72, 1989.
- [14] T. White *et al.*, "Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics," *PCR protocols: a guide to methods and applications*, vol. 31, pp. 315-322, 1990.
- [15] J. S. Tolan and B. Foody, "Cellulase from submerged fermentation," *Recent progress in bioconversion of lignocellulosics*, vol. 65, pp. 41-67, 1999.
- [16] S. B. Pointing, "Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi," *Fungal diversity*, vol. 2, pp. 17-33, 1999.
- [17] P. T. N. Lan, *Practical Microbiology Curriculum*. Hue University Publishing House, 2012.
- [18] Q. H. Đang and T. T. T. Tran, "Isolation, screening and identification of effective microbial strains to make bio-organic fertilizer from organic solid waste," *The University of Danang - Journal of Science and Technology*, vol. 20, no. 5, pp. 56-61, 2022.
- [19] R. Chávez, P. Bull, and J. Eyzaguirre, "The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*," *Journal of biotechnology*, vol. 123, no. 4, pp. 413-433, 2006.
- [20] M. M. Mukesh Meshram, A. K. Abhijit Kulkarni, V. Jayaraman, B. Kulkarni, and S. Lele, "Optimal xylanase production using *Penicilium janthinellum* NCIM 1169: a model based approach," *Biochemical engineering journal*, vol. 40, no. 2, pp. 348-356, 2008.