

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

---



**Trần Khánh Linh**

**NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG KHU HỆ NẤM GÂY HẠI TRÊN HÒM GỖ  
THU THẬP TẠI ĐỒNG NAI VÀ KHẢO SÁT HIỆU QUẢ ỨC CHẾ  
NẤM CỦA MỘT SỐ CHẾ PHẨM**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

*Hà Nội – 2024*

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

---



**Trần Khánh Linh**

**NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG KHU HỆ NẤM GÂY HẠI TRÊN HÒM GỖ  
THU THẬP TẠI ĐỒNG NAI VÀ KHẢO SÁT HIỆU QUẢ ỨC CHẾ  
NẤM CỦA MỘT SỐ CHẾ PHẨM**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**  
**Ngành: SINH HỌC THỰC NGHIỆM**  
**Mã số: 8420114**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. Ngô Cao Cường 
2. TS. Quách Ngọc Tùng 

**Hà Nội – 2024**

**LỜI CAM ĐOAN**

*Tôi xin cam đoan đề tài: “Nghiên cứu đa dạng khu hệ nấm gây hại trên hòm gổ thu thập tại Đồng Nai và khảo sát hiệu quả ức chế nấm của một số chế phẩm” là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên các tài liệu và số liệu do chính tôi tự tham khảo và nghiên cứu. Vì vậy, các kết quả trong nghiên cứu đảm bảo được tính trung thực và khách quan. Một phần của kết quả này đã được công bố trên các Tạp chí và Kỷ yếu Hội nghị khoa học chuyên ngành. Các số liệu và kết quả nêu trong luận văn đảm bảo tính trung thực, nếu sai tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.*

Hà Nội, ngày 07 tháng 11, năm 2024

**Tác giả luận văn**



**Trần Khánh Linh**

## LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới Ban Tổng giám đốc Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga, đặc biệt là TS. Ngô Cao Cường và tập thể cán bộ phòng Vi sinh, Phân viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga, đã tạo mọi điều kiện, hỗ trợ và giúp đỡ tôi hết lòng trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo cùng toàn thể các thầy, cô giảng viên tại Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Khoa học và Công nghệ, những người đã không ngừng truyền dạy những kiến thức quý báu, hun đúc niềm đam mê học tập trong tôi suốt thời gian qua.

Xin gửi lời cảm ơn chân thành tới TS. Quách Ngọc Tùng, Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, người đã tận tâm hướng dẫn, chỉ bảo và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận văn này.

Tôi cũng xin bày tỏ lòng cảm ơn sâu sắc tới đề tài “*Nghiên cứu chế tạo chế phẩm đặc chủng AM-QS chống nấm mốc cho vật liệu gốc xenlulo ứng dụng trong công tác bảo quản vũ khí trang bị. Đề tài cấp Bộ Quốc phòng, mã số 2022.11.41*”. Sự hỗ trợ về kinh phí và điều kiện nghiên cứu từ đề tài này đã đóng góp không nhỏ vào quá trình thực hiện và hoàn thiện luận văn của tôi.

Cuối cùng, không thể không nhắc tới gia đình và bạn bè thân yêu, những người luôn đồng hành, ủng hộ và động viên tôi vượt qua mọi khó khăn trong suốt hành trình học tập và nghiên cứu. Sự ủng hộ và tình cảm của mọi người chính là nguồn động lực to lớn giúp tôi hoàn thành luận văn này.

*Hà Nội, ngày 07 tháng 11, năm 2024*

**Tác giả luận văn**



**Trần Khánh Linh**



## MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT.....	v
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ.....	vii
MỞ ĐẦU.....	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	4
1.1. Nấm sợi phân hủy vật liệu gỗ.....	4
1.1.1. Đặc điểm của các vật liệu gỗ.....	4
1.1.2. Khái niệm và đặc điểm của nấm mốc.....	5
1.1.3. Quá trình phân hủy vật liệu gỗ của nấm.....	7
1.1.4. Hòm gỗ quân sự và sự phá hủy của nấm.....	8
1.2. Đánh giá đa dạng khu hệ nấm gây hại trên các vật liệu gỗ.....	10
1.2.1. Đánh giá đa dạng khu hệ nấm bằng phương pháp nuôi cấy.....	10
1.2.2. Kỹ thuật metagenome ứng dụng trong đánh giá khu hệ nấm.....	12
1.3. Các hoạt chất sử dụng trong bảo quản vật liệu gỗ.....	16
1.3.1. Preventol.....	16
1.3.2. Đồng sunphat.....	17
1.3.3. Alpha-bromocinamaldehyde.....	19
1.4. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam.....	23
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	26
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU.....	26
2.1.1. Vật liệu nghiên cứu.....	26
2.1.2. Hóa chất và thiết bị.....	26
2.1.3. Môi trường nuôi cấy.....	27
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	27
2.2.1. Phương pháp phân tích đa dạng khu hệ nấm sợi bằng kỹ thuật metagenomics [30].....	27
2.2.2. Phân lập nấm sợi.....	28
2.2.4. Phân loại nấm dựa trên giải và phân tích trình tự gen ITS.....	28
2.2.5. Khảo sát khả năng sinh enzym ngoại bào của các chủng nấm phân lập.....	29
2.2.6. Đánh giá khả năng kháng nấm của các hoạt chất thử nghiệm.....	29
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	31

3.1. Đánh giá đa dạng khu hệ nấm trên bề mặt hòm gỗ bằng kỹ thuật metagenomics.....	31
3.1.1. Phân tích đa dạng vi sinh vật phân huỷ hòm gỗ .....	31
3.1.2. Phân tích đa dạng khu hệ nấm trên hòm gỗ .....	32
3.2. Phân lập và đánh giá sự phân bố các chủng nấm trên bề mặt hòm gỗ bằng giải trình tự gen ITS. ....	34
3.2.1. Phân lập các chủng nấm trên bề mặt hòm gỗ.....	34
3.2.2. Định danh và đánh giá sự phân bố của các chủng nấm gây hại.....	43
3.3. Đánh giá các đặc tính gây hại của một số chủng nấm điển hình .....	45
3.4. Thử nghiệm khả năng ức chế nấm gây hại của một số chất diệt nấm .....	49
3.4.1. Khả năng ức chế nấm sợi của Preventol .....	49
3.4.2. Khả năng ức chế nấm sợi của $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde .....	52
3.4.3. Khả năng ức chế nấm sợi của đồng sunphat .....	54
3.4.4. Khả năng ức chế nấm sợi của chế phẩm AM-QS .....	56
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	60
DANH MỤC CÔNG TRÌNH TÁC GIẢ .....	61
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO .....	62
PHỤ LỤC.....	74
Phụ lục 1: Kết quả phân lập các mẫu nấm mốc .....	74
Phụ lục 2: Đặc điểm hình thái một số chủng nấm sợi phân lập từ bề mặt hòm gỗ tại Đồng Nai và phân loại theo cuống sinh bào tử .....	79
Phụ lục 3: Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng nấm phân lập .....	82
Phụ lục 4: Trình tự gen ITS của 13 chủng nấm phân lập.....	85

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

<b>Chữ viết tắt</b>	<b>Giải nghĩa Tiếng Anh</b>	<b>Giải nghĩa Tiếng Việt</b>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	Công cụ để so sánh các trình tự gen/ protein cơ bản
CFU	Colony Forming Unit	Đơn vị hình thành khuẩn lạc
MIC	Minimum Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
MBC	Minimal Bactericidal Concentration	Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu
SGI	Spore Germination Inhibitory	Khả năng ức chế nảy mầm của bào tử
CMC	Carboxymethyl Cellulose	
NCBI	National Center For Biotechnology Information	Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Hoa Kỳ
RDP Classifier	Ribosomal Database Project Classifier	Dự án cơ sở dữ liệu ribosome
ITS	Internal transcribed spacer	Vùng đệm trong đờng sao mã
MG-RAST	Metagenomics Rapid Annotation Using Subsystem Technology	Hệ thống phân tích tự động metagenome trực tuyến mã nguồn mở
HUMAnN	Hmp Unified Metabolic Analysis Network	Bộ phân tích chức năng metabolic trong các cộng đồng vi sinh vật
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes And Genomes	Cơ sở dữ liệu về gen và con đờng chuyển hóa giả định
PICRUSt	Phylogenetic Investigation of Communities By Reconstruction of Unobserved States	Nghiên cứu Nguồn gốc của Cộng đồng bằng cách Tái tạo các Trạng thái Chưa Quan sát
PCR	Polymerase chain reaction	Chuỗi phản ứng trùng hợp
TCVN		Tiêu chuẩn Việt Nam
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid	Axit ribonucleic ribosome
DNA	Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic

## DANH MỤC CÁC BẢNG

<b>Bảng 3.1.</b> Đặc điểm hình thái và phân loại các chủng nấm sợi phân lập từ mẫu gỗ thu thập tại Đồng Nai .....	37
<b>Bảng 3.2.</b> So sánh các chủng nấm sợi phân lập với các chủng đại diện trên Genbank .....	43
<b>Bảng 3.3.</b> Khả năng nảy mầm của bào tử tại các nồng độ ức chế của preventol .....	51
<b>Bảng 3.4.</b> Khả năng nảy mầm của bào tử tại các nồng độ ức chế của $\alpha$ -BCA.....	54
<b>Bảng 3.5.</b> Khả năng nảy mầm của bào tử tại các nồng độ ức chế của đồng sunphat .....	56
<b>Bảng 3.6.</b> Giá trị nồng độ của thành phần đơn chất trong chế phẩm AM-QS.....	56
<b>Bảng 3.7.</b> Khả năng nảy mầm của bào tử tại các nồng độ ức chế của AM-QS.....	57

## DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

<b>Hình 1.1.</b> Hình ảnh hòm gỗ không bị mốc .....	9
<b>Hình 1.2.</b> Bề mặt vật liệu gốc xenlulo, thùng gỗ và ống giấy bảo quản hoặc bì carton dùng để bảo quản vũ khí trang thiết bị. A, thùng gỗ; B, bì carton; C, giấy bảo quản .....	9
<b>Hình 2.1.</b> Hình ảnh hòm gỗ lưu kho trên 5 năm tại kho K752, Đồng Nai, Việt Nam .....	26
<b>Hình 2.2.</b> Các mẫu tằm bông sau quá trình thu hồi mẫu nấm trên bề mặt .....	26
<b>Hình 3.1.</b> Phân tích đa dạng của khu hệ vi sinh vật trên mẫu hòm bị phân huỷ .....	31
<b>Hình 3.2.</b> Sơ đồ phân loại của các nhóm ưu thế ở ngành Ascomycota (A); Lớp Dothideomycetes (B); Lớp Sordariomycetes (C). .....	34
<b>Hình 3.3.</b> Một số mẫu đĩa phân lập nấm mốc trên môi trường Czapek – Dox sau 5 ngày nuôi cấy .....	35
<b>Hình 3.4.</b> Thành phần (%) các chủng thuộc chi nấm mốc phân lập từ hòm gỗ tại Đồng Nai .....	36
<b>Hình 3.5.</b> Mối quan hệ phát sinh gen giữa các loài nấm phân lập từ bề mặt hòm gỗ. Số trong nhánh biểu thị giá trị Bootstrap 1000 với thanh tỷ lệ 0,02 .....	45
<b>Hình 3.6.</b> Các đĩa thử nghiệm hoạt động của enzyme. Các vị trí trên đĩa: 1) <i>Aspergillus awamori</i> TS1; 2) <i>Aspergillus niger</i> TS5; 3) <i>Penicillium chrysogenum</i> TĐ12.3; 4) <i>Curvularia eragrostidis</i> TĐ4.2; 5) <i>Aspergillus sydowii</i> TĐ5; 6) <i>Fusarium equiseti</i> TĐ6.2; 7) <i>Aspergillus austroafricanus</i> TĐ11.1. ....	47
<b>Hình 3.7.</b> So sánh hoạt tính enzyme ngoại bào giữa các chủng nấm phân lập. Biểu đồ phân tán biểu thị giá trị đường kính vùng phân giải. ANOVA hai chiều với mức ý nghĩa $p < 0,0001$ .....	48
<b>Hình 3.8.</b> Tác động của preventol lên sự nảy mầm của bào tử (A) và hiệu lực kháng nấm của preventol sau 48 giờ (B) .....	50
<b>Hình 3.9.</b> Tác động của $\alpha$ -BCA lên sự nảy mầm của bào tử (A) và hiệu lực kháng nấm của $\alpha$ -BCA sau 48 giờ (B).....	52
<b>Hình 3.10.</b> Tác động của $\text{CuSO}_4$ lên sự nảy mầm của bào tử (A) và hiệu lực kháng nấm của $\text{CuSO}_4$ sau 48 giờ (B).....	55
<b>Hình 3.11.</b> Tác động của AM-QS lên sự nảy mầm của bào tử (A) và hiệu lực kháng nấm của AM-QS sau 48 giờ (B).....	58

## MỞ ĐẦU

Việt Nam là đất nước nằm trong khí hậu nhiệt đới gió mùa, thời tiết nóng ẩm và có mùa đông lạnh ở miền Bắc, miền Trung. Với khu vực Miền Nam Việt Nam có khí hậu ôn hòa và chia làm mùa khô và mùa mưa. Đây là điều kiện khí hậu rất thuận lợi cho vi sinh vật nói chung và nấm sợi nói riêng phát triển, trong đó phải kể đến nhóm nấm sợi có khả năng gây hại lên vật liệu có nguồn gốc cellulose. Vật liệu gỗ được sử dụng trong đa lĩnh vực trong đời sống như xây dựng, trang trí nội thất, sản xuất giấy và nhiều sản phẩm khác. Song song với việc khai thác và sản xuất các sản phẩm gỗ, quan trọng không kém đó là việc nghiên cứu và ứng dụng các phương pháp bảo vệ vật liệu gỗ được lâu bền, hạn chế hư hại nhất có thể, đặc biệt là bảo vệ gỗ khỏi tác động phá hủy sinh học gây bởi vi nấm.

Với sự đa dạng và phong phú về thành phần loài cũng như đặc tính sinh học, vi sinh vật đã trở thành đối tượng nghiên cứu tiềm năng về khả năng phân hủy các chất hữu cơ, cụ thể là khả năng gây hại của nấm sợi lên nhóm vật liệu gỗ. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, khi nấm sợi phát triển trên một số vật liệu như gỗ, bìa carton hay giấy, chúng sẽ tổng hợp các enzyme ngoại bào tiết ra ngoài môi trường, phân hủy thành phần của vật liệu gỗ là các polymer phức tạp như tinh bột, cellulose và lignin thành dạng dinh dưỡng đơn giản và dễ hấp thụ như đường và acid amin để làm thức ăn [1]. Do đó gây ra hiện tượng nứt vỡ, mục rữa, dẫn tới làm thay đổi cấu trúc và đặc tính ban đầu của vật liệu [2].

Việc nghiên cứu sự phá hủy sinh học của nấm sợi tác động đến vật liệu gỗ và các sản phẩm từ gỗ ở điều kiện Việt Nam, cùng với việc tìm ra các phương pháp hạn chế tác động của nấm sợi đến độ bền vật liệu gỗ và các sản phẩm từ gỗ là hướng nghiên cứu quan trọng nhằm góp phần nâng cao độ bền của gỗ trong điều kiện nhiệt đới tại Việt Nam. Chính vì vậy, đề tài "***Nghiên cứu đa dạng khu hệ nấm gây hại trên hòm gỗ thu thập tại Đồng Nai và khảo sát hiệu quả ức chế nấm của một số chế phẩm***" được thực hiện.

### ***Mục tiêu của đề tài:***

- Đánh giá được khu hệ nấm gây hại trên hòm gỗ bằng kỹ thuật metagenomics và kỹ thuật nuôi cấy truyền thống.
- Đánh giá hiệu lực ức chế một số chủng nấm có đặc điểm gây hại điển hình của các chế phẩm.

***Phạm vi nghiên cứu:***

Được bắt đầu từ phân tích khu hệ nấm trên hòm gỗ bằng kỹ thuật metagenomics và phương pháp nuôi cấy truyền thống, đánh giá hiệu quả ức chế nấm của một số chế chất hóa học có sẵn trên thị trường.

***Nội dung nghiên cứu:***

- Nghiên cứu khu hệ nấm trên bề mặt hòm gỗ bị phá huỷ bằng kỹ thuật metagenomics.
- Phân lập các chủng nấm sợi trên bề mặt hòm gỗ và phân loại chúng bằng phương pháp giải trình tự ITS.
- Đặc điểm sinh học, khả năng sinh enzyme liên quan đến khả năng gây hại gỗ của một số chủng nấm điển hình.
- Thử nghiệm khả năng ức chế nấm gây hại điển hình của một số chất hóa học có sẵn trên thị trường.

***Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài:***

- *Cơ sở khoa học:* Đề tài cung cấp các dữ liệu khoa học về nấm sợi, khả năng gây hại của nấm lên vật liệu gỗ, khả năng ức chế nấm sợi của một số hợp chất hóa học. Các kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học để tiến tới các nghiên cứu sâu hơn về cơ chế gây hại và thử nghiệm tạo ra các chế phẩm chống nấm gây hại trên bề mặt vật liệu gỗ vừa hiệu quả cao vừa an toàn cho môi trường.
- *Tính thực tiễn:* Đề tài xác định được các chủng nấm trên bề mặt hòm gỗ bị mốc bằng kỹ thuật metagenomics, xác định được 13 chủng nấm bằng phương pháp phân lập truyền thống, đánh giá được chủng nấm sinh tổng hợp các enzyme liên quan đến quá trình phân huỷ gỗ tại 01 điểm khu vực Đồng Nai. Đã xác định được nồng độ ức chế tối thiểu của 03 chất hóa học (preventol,  $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde và đồng sunphat) từ đó xây dựng tổ hợp ba chất (AM-QS) có tác dụng ức chế nấm sợi tăng khoảng 50 lần so với đơn chất. Kết quả nghiên cứu là tài liệu tham khảo cho những nghiên cứu phát triển các chế phẩm chống nấm mới cho vật liệu gỗ, bìa cát tông, giấy, ... trong điều kiện Việt Nam.

***Những đóng góp của luận văn:***

- Cung cấp dữ liệu về bộ chủng nấm phân lập từ bề mặt hòm gỗ tại Đồng Nai và bộ dữ liệu về nấm sợi trên bề mặt hòm gỗ phân tích bằng kỹ thuật metagenomics.
- Đánh giá được khả năng sinh tổng hợp một số enzym liên quan đến phân huỷ gỗ của một số chủng nấm điển hình.

- Xác định được nồng độ ức chế nấm gây hại điển hình của một ba đơn chất hóa học (preventol,  $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde và đồng sunphat), xác định được nồng độ ức chế của chế phẩm AM-QS hình thành từ ba đơn chất trên.



## Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

### 1.1. Nấm sợi phân huỷ vật liệu gỗ

#### 1.1.1. Đặc điểm của các vật liệu gỗ

Gỗ là nguồn dinh dưỡng carbon cho nhiều loại sinh vật, đặc biệt là vi khuẩn, nấm và côn trùng, trong đó nấm gây ra khoảng 90% quá trình phân huỷ sinh học. Thành phần hóa học cơ bản của gỗ gồm C (carbon) chiếm 49,5%; O (oxygen) và N (nitrogen) chiếm 44%; H (hydrogen) 6,3% và Ca (calcium) 0,2-1,7% [3].

Gỗ là một trong những polyme tự nhiên phong phú và có giá trị nhất và đã được con người sử dụng từ thời kỳ đầu dưới dạng vật liệu tổng hợp sinh học. Vật liệu carbon tạo thành cơ sở của chất hữu cơ trong giới thực vật có nguồn gốc từ carbon dioxide trong không khí. Kết hợp với nước lấy từ lòng đất và năng lượng quang hợp ánh sáng, thực vật tổng hợp thành các thành phần chính của gỗ. Ngoài ra, gỗ còn là nguồn dinh dưỡng carbon cho nhiều loại sinh vật, đặc biệt là vi khuẩn, nấm và côn trùng [3].

Các chất cấu tạo nên gỗ chia làm 2 nhóm chính: nhóm thứ nhất là lignocellulose gồm cellulose, lignin và hemicellulose (là các thành phần cấu tạo nên vách tế bào); nhóm thứ hai gồm tinh bột, đường, tinh dầu, chất nhựa, tannin, chất béo, chất màu, dầu nhựa; thành phần này thay đổi tùy theo bộ phận cây, loại cây và môi trường sinh trưởng [4].

- *Lignocellulose*: là hợp chất hữu cơ tự nhiên, chiếm 50% trong sinh khối thực vật, được tạo nên bởi 3 loại polymer, cellulose, hemicellulose và lignin; trong đó các sợi cellulose được bao bọc trong các sợi vô định hình hemicellulose và lignin [5]. Các thành phần này gắn chặt với nhau bởi liên kết không cộng hóa trị và các cầu nối ngang cộng hóa trị và chiếm trên 90% trọng lượng khô của tế bào thực vật [5]. Số lượng mỗi loại polymer thay đổi tùy loài, tuổi và trên từng bộ phận khác nhau của cây, trong gỗ mềm thường có hàm lượng lignin cao hơn gỗ cứng và trong cỏ, hàm lượng hemicellulose cao nhất [6].

- *Cellulose*: được tạo thành từ nhiều phân tử glucose nối với nhau qua liên kết  $\beta$ -(1,4)-glucosidic, là hợp chất hữu cơ bền vững, có nhiều trong tế bào thực vật (chiếm khoảng 60 – 70%) [7]. Cellulose là một loại homocellulose cấu tạo dạng sợi, liên kết với nhau thành bó nhỏ có cấu trúc đồng nhất, làm cho cellulose dài và không tan trong nước. Giữa các sợi cellulose ngoài liên kết hydrogen còn có thành phần lignin liên kết những sợi này lại tạo cấu trúc bền vững [7]. Tùy theo từng loài cây mà các phân tử cellulose có trọng lượng phân tử khác nhau. Trong tự nhiên, cellulose thường có

mặt cùng hemicellulose và lignin mà ngăn cản sự tiếp xúc của enzyme với cellulose để phân cắt chúng [8].

- *Hemicellulose*: là một heteropolymer có trong vách tế bào thực vật cùng với cellulose, nó có cấu trúc vô định hình và ít bền vững, nên dễ bị phân hủy. Hemicellulose chứa nhiều đường đơn phân khác nhau như: glucose, xylose, mannose, galactose, rhamnose và arabinose. Phân tử polymer này có phân nhánh chứa đến 500 – 3000 đơn vị đường và là thành phần chính của gỗ bị tấn công và phá hủy bởi nấm [9, 10].

- *Lignin*: là một polymer gốc rượu, có cấu trúc 3 chiều rất phức tạp. Lignin thường là thành phần nhỏ nhất và phức tạp nhất, chiếm khoảng 10 - 25% khối lượng sinh khối. Nó là một polymer dị thể, chuỗi dài, chủ yếu bao gồm các đơn vị phenylpropane được liên kết chủ yếu bằng liên kết ete [6]. Thành phần các nguyên tố của lignin gồm 62-65% carbon, 5-6% hydro, nhiều nhóm metoxyl và hydroxyl tự do. Lignin được tìm thấy chủ yếu ở ba dạng là lignin gỗ cứng, lignin gỗ mềm và lignin cỏ. Lignin có nhiệm vụ nâng đỡ tế bào gỗ, là một polymer phong phú trong tự nhiên sau cellulose và được thực vật tổng hợp, chiếm phần lớn nguồn chất thơm trên trái đất. Lignin không chỉ giúp cho tế bào thực vật cứng rắn hơn mà còn hạn chế sự xâm nhiễm của vi sinh vật vào thực vật [4, 6].

## **1.1.2. Khái niệm và đặc điểm của nấm mốc**

### **1.1.2.1. Tổng quan về nấm**

Nấm là một giới riêng - giới nấm, là nhóm nhân thật (Eumycota) với ba đại diện tiêu biểu là nấm men, nấm mốc/sợi (mould hoặc filamentous) và nấm thể quả (nấm lớn).

Hầu hết các nấm đều có cấu trúc dạng sợi (hyphae) trừ tế bào nấm men, tạo nên hệ sợi (mycelium) và hình thành khuẩn lạc. Thành tế bào chứa chitin và polysaccharide, tế bào có chứa các bào quan như ty thể, bộ máy Golgi, lưới nội chất, lysosomes nhưng không có lục lạp. Chúng có thể đơn bào hoặc đa bào. Nấm là nhóm sinh vật hiếu khí nhờ có các ty thể. Nhân đậm đặc có màng nhân bao quanh. Chúng hình thành bào tử trên những cấu trúc đặc biệt hay thể quả. Về kích thước, nhóm nấm lớn có thể quan sát rõ bằng mắt thường như nấm hương, mộc nhĩ, ... Bên cạnh đó chiếm đa số là nhóm vi nấm, không thể quan sát được bằng mắt thường cần sử dụng kính hiển vi.

Nhóm nấm thật gồm 5 ngành [11]:

- Ngành Chytridiomycota: sống ở dưới nước, có khả năng di động, cơ thể đơn tế bào (thỉnh thoảng có cấu trúc dạng sợi), không có vách ngăn, cơ quan sinh sản là bào tử nhỏ.

- Ngành Glomeromycota: một ngành nấm bậc thấp, chưa có vách ngăn, bào tử có kích thước khá lớn (80-500  $\mu\text{m}$ ).

- Ngành Zygomycota: sống trên cạn, tế bào dạng sợi, không có vách ngăn, cơ quan sinh sản là bào tử tiếp hợp.

- Ngành Basidiomycota: đa số sống trên cạn, tế bào dạng sợi hoặc đơn bào, có vách ngăn, trên vách ngăn thường có các mấu liên kết là các lỗ truyền tế bào chất giữa các tế bào.

- Ngành Ascomycota: sống trên cạn, tế bào dạng sợi (nấm sợi) hoặc dạng đơn bào (nấm men), có vách ngăn, cơ quan sinh sản là thể quả (một số loại nấm ăn) hoặc bào tử vô tính.

- Ngành Microsporidia: dạng sinh sản vô tính của hai ngành Basidiomycota và Ascomycota, được xếp chung vào Microsporidia.

Nấm có vai trò quan trọng trong chu trình dinh dưỡng của hệ sinh thái nhờ khả năng phân hủy hầu hết các hợp chất hữu cơ trong tự nhiên để khép kín chu trình chuyển hóa vật chất. Nấm có nhiều ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau, nông nghiệp, công nghiệp, thực phẩm và y dược. Ngược lại, nấm cũng gây phá hủy các thiết bị, gây bệnh cho vật nuôi, cây trồng, làm hỏng thực phẩm, có thể sinh độc tố gây hại cho người và động vật.

#### **1.1.2.2. Đặc điểm của nấm mốc**

Nấm mốc hay còn gọi là nấm sợi, thuộc vi nấm, được biết dưới tên Hyphomycetes, là một nhóm con thuộc nhóm nấm Bất toàn, được phân bố rộng rãi trong tự nhiên. Khi lượng sợi nấm đủ lớn, có thể quan sát bằng mắt thường.

Theo tổng hợp các nghiên cứu của Crous và cộng sự (2015), kích thước nấm mốc rất nhỏ bé, sợi nấm thường có đường kính 3-10  $\mu\text{m}$ , là các hệ sợi phức tạp, đa bào, màu sắc phong phú. Nấm mốc có cấu tạo hình sợi phân nhánh, tạo thành một hệ sợi chằng chịt phát triển rất nhanh. Nấm sinh sản và di truyền nòi giống bằng những hình thức đơn giản. Một đám sợi nấm nếu gặp được môi trường thích hợp, cũng có thể phát triển thành một cá thể mới. Nhưng thường thì một số sợi nấm phân hóa một cách đặc biệt, trở thành cơ quan sinh sản, mang những bào tử vô tính hoặc hữu tính, mỗi bào tử này có khả năng trở thành một cơ thể mới - bào tử các loại nấm khác nhau có hình dáng và kích thước hết sức khác nhau [12].

Thông thường, nấm mốc có các hình dạng sau [13]:

- Dạng sợi có vách ngăn: đây là cấu trúc phổ biến ở đa số các loài nấm mốc (*Penicillium, Aspergillus,...*). Khuẩn ty của chúng có vách ngăn, chia thành các tế bào riêng biệt nối tiếp nhau. Tuy nhiên, các vách ngăn này không hoàn toàn kín mà có các lỗ nhỏ, cho phép sự trao đổi chất và di chuyển của các bào quan giữa các tế bào.
- Dạng sợi không có vách ngăn: là đặc trưng ở các loài nấm bậc thấp như *Mucor, Rhizopus...*, khuẩn ty của chúng là một sợi liên tục không bị chia cắt bởi vách ngăn. Bên trong sợi nấm này chứa nhiều nhân phân bố rải rác trong tế bào chất.

Theo Houbraeken, nấm có nhiều vai trò quan trọng trong y dược như sản xuất các loại thuốc kháng sinh như penicillin từ chi *Penicillium* hay thuốc hạ cholesterol (lovastatin) từ nhóm nấm *Aspergillus* [14]. Ngoài ra, nấm mốc còn giúp duy trì vòng tuần hoàn vật chất trong tự nhiên [13]. Do vậy chúng có đặc tính luôn sử dụng các cơ chất có trong tự nhiên như gỗ làm nguồn dinh dưỡng như gỗ để phát triển. Chính đặc tính này đã gây nên một số tác hại như làm hư hỏng nhiều loại thiết bị, hàng hóa, thực phẩm, đặc biệt là phá hủy tất cả các vật liệu gỗ, gây thiệt hại kinh tế. Ngoài ra chúng còn sản sinh độc tố, gây bệnh cho người và động thực vật.

### 1.1.3. Quá trình phân hủy vật liệu gỗ của nấm

Sự phân hủy sinh học là kết quả của sự hiện diện của vi sinh vật, làm thay đổi cấu trúc hay bề mặt của vật liệu một cách nghiêm trọng, được chia làm bốn nhóm [1]:

- Phá hủy sinh học vật lý hoặc cơ học: Vi sinh vật không tiêu thụ vật liệu, nhưng áp lực từ sự phát triển của chúng có thể làm vật liệu bị phá vỡ.
- Phá hủy sinh học ảnh hưởng đến tính thẩm mỹ của vật liệu: Mặc dù không gây hư hại trực tiếp đến vật liệu, sự phát triển của vi sinh vật hoặc các sản phẩm trao đổi chất của chúng có thể làm biến đổi màu sắc, tạo ra các vết bẩn, mảng bám hoặc mùi khó chịu, làm giảm tính thẩm mỹ của vật liệu.
- Phá hủy sinh học do đồng hóa hóa học: Vi sinh vật sử dụng vật liệu làm nguồn dinh dưỡng hay năng lượng.
- Phá hủy sinh học do cơ chế hòa tan: Vi sinh vật có thể tiết ra các chất làm biến dạng hoặc hủy hoại vật liệu, dẫn đến sự hỏng hóc của vật liệu.

Ba loại nấm có khả năng phân hủy lignocellulose là: nấm mục trắng, nấm mục nâu, nấm mục mềm [4]. Các loài nấm gây mục nâu (*Serpula lacrymans, Antrodia vaillantii, Coniophora puteana, Gloeophyllum trabeum, Schizophyllum commune, Lentinus lepideus,...*) và các loài gây mục trắng (*Trametes versicolor, Trametes hirsuta, ...*) thuộc ngành Basidiomycetes, cũng như các loài nấm mục mềm như ngành Ascomycetes (như *Chaetomium globosum, Monodictys putredinis,...*) phá hủy

các mạch polysaccharides như cellulose và hemicelluloses có trong thành tế bào của gỗ nhờ hệ enzyme cellulase mà chúng tổng hợp [2]. Trong đó, nhóm nấm Basidiomycetes bao gồm nấm mục trắng và nấm mục nâu là nhóm có khả năng phân hủy lignocellulose cao nhất trong tự nhiên [4].

Các loại nấm làm đổi màu (*Ceratocystis pilifera*, *Aureobasidium pullulans*, *Alternaria alternata*,...) tiết ra các sắc tố và gây ra sự thay đổi màu sắc ở phần bên trong của gỗ, đồng thời tăng cường tính thấm của gỗ do các sợi nấm xâm nhập qua thành tế bào gỗ và cũng do sự phá vỡ các lỗ khí khổng trên thành tế bào hoặc trong các mạch vân khác của gỗ. Một số dòng này cũng được biết đến có khả năng gây ra sự phá huỷ mềm trong các loại gỗ cứng dưới điều kiện lý tưởng, ví dụ như *Phialophora* spp.) [2].

Các loài nấm thuộc các chi *Trichoderma*, *Cladosporium* và *Penicillium* gây ra mốc xanh trên gỗ, trong khi các loài thuộc các chi *Aspergillus* và *Alternaria* lại tạo ra các đốm đen, ngoài ra cũng thấy xuất hiện cả các đốm màu vàng, cam và nâu [3]. Trong số các loài nấm, các loài thuộc các chi *Serpula*, *Coriolus*, *Fomitopsis* và *Chaetomium* gây ra tổn thương lớn nhất cho gỗ [3]. Các loài nấm mục trắng phân hủy được cả cellulose, hemicellulose và lignin, nhưng có một số loài lại chủ yếu phân hủy lignin của gỗ tạo thành carbon dioxide và nước nhờ tiết ra peroxidase và oxidase [3, 4]. Còn lại nấm mục nâu và nấm mục mềm chỉ chủ yếu phân giải cellulose để lại lignin và khối gỗ màu nâu [3, 4].

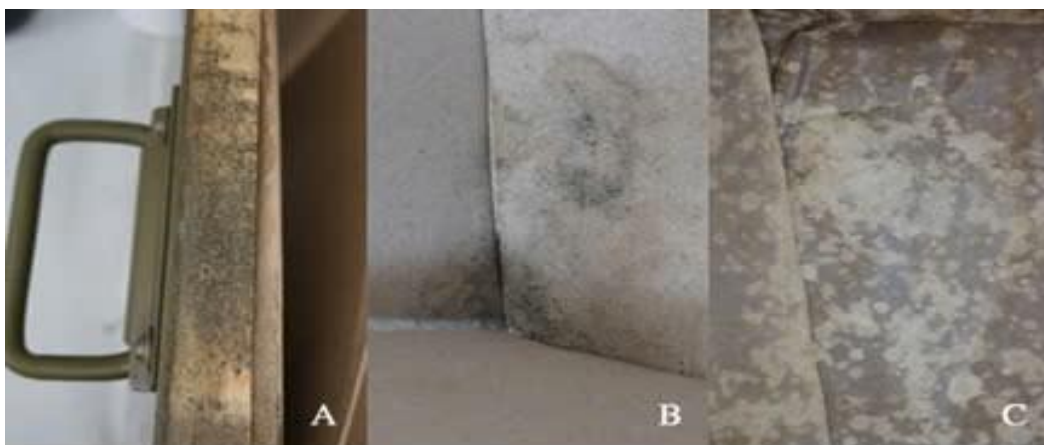
#### **1.1.4. Hòm gỗ quân sự và sự phá huỷ của nấm**

Trong quân đội, gỗ được gia công tạo ra nhiều thành phẩm, đặc biệt là hòm gỗ với công dụng chuyên bảo quản các trang thiết bị, vật tư, trang bị, các chi tiết cũng như ống giấy bảo quản. Hòm gỗ được đặc chế từ vật liệu gỗ thông, loại gỗ có thớ mịn, tương đối bền, dễ gia công chế biến, thuộc gỗ nhóm IV trong bảng phân loại nhóm gỗ theo tiêu chuẩn Việt Nam. Các tấm gỗ được chọn lọc để gia công đảm bảo chất lượng đầu vào bao gồm không bị mục ải, mối, mọt hay bị cong, vênh. Gỗ được ngâm tẩm qua hóa chất chống mối mọt với độ sâu thấm thuốc trên bề mặt cắt ngang của gỗ từ 2,5 ÷ 4,0 mm và độ ẩm không quá 20%. Các hòm gỗ được đặt trong nhà kín hoặc phòng kho với điều kiện thường.



**Hình 1.1.** Hình ảnh hòm gỗ không bị mốc

Với các mẫu hòm gỗ quan sát tại kho lưu khu vực Đồng Nai trên 5 năm, các bề mặt bên trong hòm gỗ đều xuất hiện hiện tượng mốc xâm nhiễm. Từ trực quan có thể thấy rõ các vị trí gỗ nhiễm nấm có đặc điểm khác nhau như chỗ nhiễm mốc mảng rộng lâm tâm chấm đen hay các vết kích thước lớn, nhỏ khác nhau với các màu sắc khác nhau như màu xanh đen, ghi xám, lục xám, ... Đa số nấm mốc mọc lan trên bề mặt gỗ, một vài vị trí nấm mốc nhiễm vào thớ gỗ với độ sâu không quá 1mm. Cấu trúc gỗ vẫn được giữ nguyên vẹn, không có hiện tượng bị mục rữa, bị ả hay cong vênh. Có thể nói, tại điều kiện môi trường ở phòng kho khu vực Đồng Nai, các hòm gỗ đều bị tác động bởi nấm mốc chủ yếu là trên phần bề mặt, không bị ăn sâu vào trong lớp gỗ, khối lượng gỗ hao hụt không đáng kể.



**Hình 1.2.** Bề mặt vật liệu gốc xenlulo, thùng gỗ và ống giấy bảo quản hoặc bia carton dùng để bảo quản vũ khí trang thiết bị. A, thùng gỗ; B, bia carton; C, giấy bảo quản

## 1.2. Đánh giá đa dạng khu hệ nấm gây hại trên các vật liệu gỗ

### 1.2.1. Đánh giá đa dạng khu hệ nấm bằng phương pháp nuôi cấy

Nuôi cấy vi sinh vật nói chung và nuôi cấy nấm sợi nói riêng được coi là tiêu chuẩn vàng của các kỹ thuật chẩn đoán đối với các loài vi sinh vật, được sử dụng rộng rãi trong các phòng thí nghiệm lâm sàng và được phát triển hơn 100 năm trước [15]. Quy trình nuôi cấy nấm gồm các bước [16]:

- Thu thập mẫu nấm từ môi trường tự nhiên khác nhau như mẫu đất, nước hoặc các vật liệu sinh học khác tại khu vực nghiên cứu. Các kỹ thuật thu thập mẫu khác nhau có thể được sử dụng, bao gồm thu thập trực tiếp, sử dụng bẫy nấm và thu thập bào tử không khí.

- Xử lý mẫu bằng các phương pháp vật lý như nghiền, xử lý nhiệt, lọc...

- Chuẩn bị môi trường dinh dưỡng.

- Tiến hành nuôi cấy với điều kiện nuôi cấy thích hợp, chẳng hạn như nhiệt độ, độ ẩm và ánh sáng.

- Quan sát sự phát triển của các khuẩn lạc nấm và phân lập các chủng tinh khiết.

- Định danh nấm: Xác định cấp chi bằng các phương pháp phân loại truyền thống (hình thái học) như quan sát tế bào dưới kính hiển vi quang học kết hợp phương pháp sinh học phân tử để xác định cấp loài.

- Việc xác định chính xác tác nhân gây bệnh, đặc biệt là đến cấp độ loài, thường cần thực hiện thêm các xét nghiệm sinh hóa chuyên sâu. Ngoài ra, để đánh giá khả năng kháng thuốc hoặc khả năng sản xuất các enzym ngoại bào của vi sinh vật, có thể cần phải nuôi cấy chúng trong môi trường đặc biệt và tiến hành các xét nghiệm bổ sung như kháng sinh đồ hay thử nghiệm sinh hóa chuyên biệt.

Phương pháp nuôi cấy truyền thống không chỉ cho phép nhà nghiên cứu phát hiện, phân lập, xác định và định lượng số lượng và loài nấm từ nhiều môi trường khác nhau mà còn xác định được nhu cầu dinh dưỡng, khả năng sinh sản, thành phần môi trường cho sự phát triển và chuyên hóa của chúng [16]. Nghiên cứu đa dạng nấm sợi từ 1067 mẫu gỗ mục từ 10 rừng được dọc bờ biển đã phát hiện được 78 loài thuộc 45 chi. Trong đó, *Savoryella paucispora*, *Lignincola laevis*, *Lulworthia grandispora*, *Periconia prolifica*, *Halocyphina villosa*, *Verruculina enalia* và *Zalerion maritimum* là những chi có tần xuất xuất hiện >10% [17]. Kết quả nghiên cứu về gỗ mục trong các môi trường nước khác nhau đã chứng minh sự hiện diện của 969 loài nấm phân hủy xác thực vật ưa nước, trong đó 782 loài phân lập được từ nước ngọt, 213 loài tồn

tại trong nước mặn và 26 loài vừa tồn tại trong nước mặn vừa tồn tại [18]. Với 22 mẫu lá rụng và bị phân huỷ, 122 loài đã được phân lập trong 16 năm nghiên cứu, trong đó các loài phổ biến là *Dactylaria fusiformis*, *Thozetella cristana*, *Dictyochaeta simplex* và *Pestalotiopsis glandicol* [19].

Ở nghiên cứu khác, *Penicillium commune*, *Penicillium granulatum* and *Penicillium chrysogenum* có khả năng sinh cellulase mạnh được phân lập tại di tích lịch sử bằng gỗ [20]. Thử nghiệm thời tiết tự nhiên tại hai vùng khí hậu châu Âu khác nhau đã được tiến hành để điều tra đồng thời cả quá trình xâm chiếm và phong hóa của nấm trên gỗ thông Scots (*Pinus sylvestris* L.). Kết quả cho thấy, số lượng loài nấm thu nhận bằng phương pháp truyền thống cao hơn được tìm thấy trên gỗ tiếp xúc với khí hậu ôn đới ẩm áp so với khí hậu cận Bắc Cực hoặc phương bắc. Các loài nấm chiếm ưu thế ở cả hai địa điểm đều thuộc chi *Cladosporium* và *Aureobasidium* [21]. Nghiên cứu của Fukasawa và cộng sự đã chứng minh rõ sự ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy tới việc phát hiện và đánh giá đa dạng thành phần loài nấm. Từ các mẫu khúc gỗ sồi Nhật Bản trong giai đoạn phân huỷ thực hiện phân lập trên 2 môi trường khác nhau là malt extract agar và môi trường kia có bổ sung thêm benomyl. Kết quả ở môi trường không bổ sung benomyl phân lập đa dạng các chủng nấm, trong khi môi trường có bổ sung benomyl chỉ phát hiện những nấm phát triển chậm và nhóm nấm Ascomycetes hầu như không có [22]. Phương pháp nuôi cấy thuần túy là nền tảng của nghiên cứu cơ bản và ứng dụng, cũng như khai thác thương mại nấm [16].

Bên cạnh đó vẫn tồn tại những mặt hạn chế của phương pháp này. Các phương pháp nuôi cấy vi sinh không cho phép xác định được hết sự có mặt của các vi sinh vật khó hoặc không thể nuôi cấy. Do sự ảnh hưởng bởi thành phần môi trường, điều kiện nuôi cấy như nhiệt độ, độ ẩm, pH, ... hay bởi sự ức chế nhau giữa các chủng loài vi sinh vật mà phương pháp này chỉ có thể xác nhận sự hiện diện của một số vi sinh vật nhất định có thể phát triển trên môi trường đã chọn. Vấn đề đó cũng gây ra thách thức cho các nhà nghiên cứu trong việc xác định khả năng chuyên hóa của các chủng loài vi sinh vật. Do đó, các kỹ thuật nuôi cấy có thể không hiệu quả trong việc xác định sự hiện diện của các tác nhân gây bệnh mới hoặc các tác nhân gây bệnh đã biết nhưng không thể nuôi cấy [15]. Mặt khác, vi sinh truyền thống cũng không thể xác định được mức độ giàu có của các vi sinh vật trong hệ sinh cảnh cùng với thời gian thử nghiệm kéo dài. Tuy nhiên, nuôi cấy vi sinh truyền thống vẫn là phương pháp chẩn đoán vẫn được áp dụng dựa trên đặc tính phù hợp với thí nghiệm lựa chọn cũng như hiệu quả về chi phí [23]. Bước tiến mới của ngành nghiên cứu khoa học ngày nay chính là sự kết hợp hỗ trợ nhau giữa phương pháp nuôi cấy truyền thống cùng với các phương pháp sinh học phân tử và giải trình tự gen thế hệ mới nhằm mở



rộng ra các hướng nghiên cứu mới, đẩy nhanh hiệu quả và tính chính xác, cũng như khai thác được nhiều dữ liệu sinh học [24, 25].

## **1.2.2. Kỹ thuật metagenome ứng dụng trong đánh giá khu hệ nấm**

### **1.2.2.1. Lịch sử phát triển của kỹ thuật metagenomics**

Kỹ thuật metagenomics đã trải qua một quá trình phát triển đáng kể, từ những bước khởi đầu đầy thử thách đến vị trí hiện tại như một công cụ mạnh mẽ trong nghiên cứu hệ vi sinh vật. Giai đoạn đầu, trước năm 1977, nghiên cứu về hệ vi sinh vật chủ yếu dựa trên phương pháp nuôi cấy truyền thống, giới hạn khả năng khám phá sự đa dạng thực sự của chúng. Đến năm 1977, phương pháp giải mã chuỗi DNA thế hệ đầu tiên ra đời mang tên phương pháp giải trình tự Sanger được phát triển bởi Frederick Sanger và cộng sự. Năm 1985, Norman Pace và cộng sự lần đầu tiên sử dụng kỹ thuật nhân dòng gen 16S rRNA để nghiên cứu trực tiếp các mẫu môi trường, chứng minh sự tồn tại của một hệ sinh vật phức tạp chưa từng được nghiên cứu đến, đặt nền móng cho metagenomics [26].

Vào cuối những năm 1990, sự phát triển của kỹ thuật Whole Shotgun Genome Sequencing đã tạo ra cột mốc quan trọng trong lĩnh vực giải trình tự gen. Cho đến nay, công nghệ đã đóng góp một cơ sở dữ liệu khổng lồ của các bộ gen nấm hoàn chỉnh, phản ánh những tiến bộ vượt bậc trong lĩnh vực metagenomics [27]. Jo Handelsman và cộng sự đặt tên cho công nghệ này là “Metagenomics” vào năm 1998 [28]. Các nghiên cứu metagenomics đầu tiên sử dụng phương pháp giải trình tự Sanger để khám phá sự đa dạng di truyền của vi sinh vật trong các môi trường khác nhau [29].

Bước vào đầu thế kỷ 21, dự án giải trình tự bộ gen người hoàn thành, thúc đẩy sự phát triển của công nghệ giải trình tự thế hệ mới [30], tạo ra một lượng lớn dữ liệu di truyền với chi phí thấp hơn. Từ năm 2005 trở lại đây, NGS được áp dụng vào metagenomics, cho phép nghiên cứu sâu hơn về sự đa dạng và chức năng của hệ vi sinh vật [31]. Ở giai đoạn này, NGS tiếp tục phát triển với tốc độ nhanh chóng, tạo ra các nền tảng giải trình tự mới với thông lượng cao hơn và chi phí thấp hơn.

Metagenomics được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực, từ y học, nông nghiệp đến môi trường. Các phương pháp phân tích dữ liệu metagenomics ngày càng tinh vi, cho phép khám phá sâu hơn về cấu trúc, chức năng và sự tương tác của hệ vi sinh vật. Đồng thời, sự kết hợp giữa metagenomics và các kỹ thuật khác như metatranscriptomics và metaproteomics đã mang lại cái nhìn toàn diện hơn về hệ vi sinh vật.

Kỹ thuật này có một số ưu điểm vượt trội như có thể xác định những vi sinh vật hay gen hoàn toàn mới mà phương pháp nuôi cấy truyền thống không phân lập được. Trong khi phương pháp truyền thống còn hạn chế trong việc khảo sát về đa dạng thành phần loài và chức năng chuyển hóa thì metagenomics đánh giá được tổng thể mức độ phức tạp về phân loài của cộng đồng vi sinh vật và phân tích được các con đường chuyển hóa của quần thể vi sinh vật và tương tác qua lại giữa các thành viên trong cộng đồng.

Trong metagenomics, việc nghiên cứu các hệ gen của các vi sinh vật trong một quần xã không chỉ cho biết về di truyền, sinh lý và hóa sinh của các vi sinh vật mà còn cung cấp thông tin chi tiết về vòng tuần hoàn dinh dưỡng và năng lượng trong quần xã, cấu trúc bộ gen, chức năng gen, di truyền quần thể và chuyển gen giữa các thành viên của một quần thể sinh vật không thể nuôi cấy. Có thể nói, kỹ thuật Metagenomics là một công cụ mạnh mẽ trong việc khám phá và đánh giá sự đa dạng sinh học của các khu hệ vi sinh vật, bao gồm cả nấm, cung cấp cho các nhà nghiên cứu một cái nhìn toàn diện và sâu sắc hơn về quần xã nấm trong các hệ sinh thái khác nhau.

#### **1.2.2.2. Nền tảng công nghệ của metagenomics**

Metagenomics là một lĩnh vực nghiên cứu về metagenome, một công cụ được sử dụng để phân tích đa hệ gen của cộng đồng sinh vật thu thập trực tiếp từ mẫu môi trường. Kỹ thuật này giúp nghiên cứu thành phần và đặc điểm của các sinh vật dựa trên giải mã toàn bộ vật liệu di truyền trong mẫu. Metagenomics mở ra cánh cửa cho việc nghiên cứu phổ rộng hơn về thành phần vi sinh vật, bao gồm vi khuẩn, nấm, vi rút, tảo, và nhiều loại khác, cả về định danh (taxonomic profiling) và chức năng (functional metagenomics). Kỹ thuật metagenomics dựa trên một loạt các công nghệ và phương pháp tin sinh tiên tiến để phân tích DNA trực tiếp từ mẫu môi trường, bao gồm [32-34]:

##### *Giải trình gen tự thế hệ mới (Next Generation Sequencing, NGS):*

Công nghệ NGS hiện đang là điểm nóng và nhận được sự quan tâm của các nhà vi sinh vật học trên thế giới trong những năm gần đây. Ba nền tảng NGS tiêu biểu và được sử dụng phổ biến cho kỹ thuật metagenomics hiện nay gồm:

- *Nền tảng Illumina*: Đây là công nghệ giải trình tự thế hệ thứ hai, nổi bật với khả năng xác định đồng thời nhiều DNA bases và xây dựng chuỗi axit nucleic [35]. Ưu điểm của Illumina là phân tích hiệu quả các trình tự lặp lại và cho phép mã hóa, tách riêng thư viện DNA trong suốt quá trình. Tuy nhiên, công nghệ này còn hạn chế về chiều dài đọc (khoảng 200-250bp với độ chính xác tối đa 99% ở base thứ 250)

(Bảng 3.2). Ngoài ra, thời gian chuẩn bị thư viện và giải trình tự cũng khá dài, có thể lên tới 23 giờ.

- *Nền tảng Pacific Biosciences (PacBio)*: Đây là đại diện tiêu biểu của công nghệ giải trình tự thế hệ thứ ba, khác biệt hoàn toàn so với Illumina ở việc không cần chia nhỏ và khuếch đại DNA. Thay vào đó, PacBio giải trình tự trực tiếp từng phân tử DNA đơn lẻ, mang lại ưu điểm vượt trội về chiều dài đọc và khả năng giải trình tự đơn phân tử (Bảng 3.2). Nhờ đó, PacBio cung cấp thông tin chi tiết hơn, nâng cao tính toàn vẹn của hệ gen, kết hợp được cả ưu điểm của giải trình tự Sanger (đọc dài) và Illumina (thông lượng cao).

- *Nền tảng Oxford Nanopore DNA Sequencing Technology*: Công nghệ này tận dụng dòng điện để vận chuyển một mẫu DNA/RNA chưa biết qua một lỗ nano siêu nhỏ (đường kính chỉ 1 nm). Lỗ nano này được tạo ra bởi một protein nanopore gắn trên màng polymer không dẫn điện. Khi đặt một điện trường không đổi vào hệ thống, dòng điện sẽ xuất hiện và cường độ của nó phụ thuộc vào kích thước lỗ nano và thành phần DNA/RNA đang tương tác với lỗ. Khi mẫu đủ gần lỗ nano, nó sẽ làm thay đổi đặc trưng cường độ dòng điện, cho phép xác định trình tự DNA/RNA. Tổng điện tích qua lỗ được tính bằng cách tích phân cường độ dòng điện trên bề mặt lỗ trong một khoảng thời gian nhất định [35]. Hiện nay có 3 thiết bị giải trình tự ứng dụng nguyên tắc này, gồm MinION flow cell có kích cỡ bỏ túi, chứa tới 512 kênh nanopore; GridION sử dụng 5 MinION đồng thời và PromethION chứa 48 flow cell có thể hoạt động riêng rẽ, mỗi cell có đến 3000 lỗ nano.

#### Tin sinh học và dữ liệu lớn sử dụng trong phân tích khu hệ vi sinh vật

Tin sinh học đóng vai trò quan trọng trong việc xử lý và phân tích dữ liệu lớn từ NGS. Các công cụ sinh tin học được sử dụng để lắp ráp các đoạn DNA ngắn thành các đoạn dài hơn (contigs hoặc scaffolds), chú thích gen và dự đoán chức năng, phân loại các trình tự DNA vào các nhóm phân loại và so sánh các quần xã vi sinh vật khác nhau.

Các cơ sở dữ liệu như NCBI GenBank, SILVA, UNITE và Greengenes cung cấp các trình tự tham chiếu và thông tin phân loại để hỗ trợ việc xác định và phân loại các vi sinh vật từ dữ liệu metagenomics. Các công cụ phân loại như BLAST, RDP Classifier và QIIME được sử dụng để so sánh các trình tự metagenomics với các cơ sở dữ liệu tham chiếu và gán chúng vào các nhóm phân loại.

Các phương pháp thống kê và trực quan hóa như: phân tích thành phần chính (Principal Component Analysis - PCA), Chia tỷ lệ đa chiều không theo hệ mét (Nonmetric Multidimensional Scaling - NMDS) và Phân tích tọa độ chính (Principal

Coordinate Analysis - PCoA) được sử dụng để khám phá các mẫu và mối quan hệ trong dữ liệu metagenomics [36].

Phân tích chức năng giúp hiểu rõ các quá trình trao đổi chất và vai trò sinh thái của các quần xã vi sinh vật trong môi trường. Các công cụ như MG-RAST, HUMAnN2 và PICRUSt được sử dụng để dự đoán chức năng của các quần xã vi sinh vật dựa trên các gen chức năng có trong dữ liệu metagenomics. Sử dụng dữ liệu KEGG, MetaCyc để phân loại gen vào các con đường chuyển hóa khác nhau [37]. Các công cụ trực quan hóa như Heatmap, biểu đồ Venn và biểu đồ mạng PERT giúp trình bày dữ liệu một cách rõ ràng và dễ hiểu.

### 1.2.2.3. Ứng dụng metagenomics trong đánh giá đa dạng khu hệ nấm

Nghiên cứu metagenomics đang phát triển nhanh chóng trong các lĩnh vực. Ví dụ như chẩn đoán các bệnh nhiễm nấm và theo dõi sự đáp ứng với điều trị y học. Một nhóm nghiên cứu ở Hàn Quốc đã áp dụng phương pháp metagenomics để phân tích sự đa dạng của nấm trong không khí ở thủ đô Seoul làm cơ sở để tìm biện pháp giải quyết ô nhiễm không khí ở thành phố. Nhóm đã tiến hành thu thập 6 mẫu không khí vào thời điểm mùa xuân, một thời điểm rất quan trọng ở Hàn Quốc vì nồng độ bào tử nấm đạt đỉnh và sự ảnh hưởng bởi cơn bão bụi châu Á. Kết quả xác định được ngành ưu thế nhất (50%) trong số các trình tự thu thập là ngành Ascomycota với các chi phổ biến được xác định là *Alternaria*, *Didymella*, *Khuskia*, *Geosmitha*, *Penicillium*, *Aspergillus* và *Davidiella*, trong đó chi chiếm ưu thế là *Davidiella*. Một tập hợp tiềm năng gồm 40 chi gây dị ứng đã được xác định, chiếm khoảng 22,5%. Nghiên cứu này giúp xác định mức độ gây dị ứng nấm có khả năng cao trong không khí mùa xuân của Hàn Quốc một cách nhanh chóng và có độ chính xác cao nhằm cung cấp một cơ sở tốt để so sánh với các cơn bão bụi trong tương lai ở Châu Á và tìm ra các giải pháp y học hiệu quả [38].

Kỹ thuật metagenomics được sử dụng trong nghiên cứu nấm phân huỷ gỗ và gây bệnh từ các cây gỗ trưởng thành tại Singapore. Tại các cây bệnh, mười bốn nấm đảm (chín loài Polyporales, bốn loài Hymenochaetales, một loài Boletales) và ba loài Ascomycetes (ba loài Scytalidium) có liên quan chặt chẽ với cây bị bệnh [39]. Từ các mẫu cây mục thu thập tại rừng tự nhiên ở Ba Lan, 120 loài được xác định ở cấp chi, thuộc 100 đơn vị phân loại họ, 50 đơn vị phân loại bộ, 24 đơn vị phân loại lớp và 10 đơn vị phân loại ngành đã được xác định [40]. Các chi phổ biến là *Rusulla*, *Solicoccozyma*, *Humicola*, *Saitozyma*, *Pochonia*, *Leptobacillum*, *Syncephalis*, *Cephaloteca*, *Cladophialophora*, *Ilyonectaria*, *Oidiodendron*, *Trichoderma*, *Leptodontidium*, *Penicillum*, và *Paxillus*.

Trong nông nghiệp, metagenomics giúp xác định các loài nấm có lợi hoặc gây hại trong đất nuôi trồng, từ đó phát triển các biện pháp quản lý dịch hại hiệu quả và bền vững. Vào năm 2022, Passarini và cộng sự đã nghiên cứu sự đa dạng của nấm và chức năng của chúng có trong trầm tích suối có chất thải công nghiệp bị ô nhiễm kim loại nặng bằng cách sử dụng phương pháp metagenomic. Tổng cộng có 12 bộ nấm được lấy từ các tập dữ liệu và ở cấp độ ngành, trong đó xác định được độ đa dạng thành phần loài ở nơi ít ô nhiễm cao hơn nơi ô nhiễm chì và xác định được các chi *Aspergillus* và *Chaetomium* và bộ Saccharomycetales có khả năng hấp thụ sinh học kim loại nặng. Nghiên cứu này đã chứng minh tầm quan trọng của việc sử dụng phương pháp metagenomic để hiểu động lực và các con đường chuyển hóa có thể liên quan đến quần thể nấm liên quan đến các mẫu môi trường có chứa kim loại nặng, cũng như chứng minh tầm quan trọng của việc cải thiện các kỹ thuật nuôi cấy để phân lập các chủng có khả năng ứng dụng trong các quy trình phục hồi sinh học đối với môi trường bị ô nhiễm kim loại nặng [41]. Đất vùng rẫy và bộ phận cây *Paulownia elongata* và *Paulownia fortunei* được phân tích metagenomics và kết quả cho thấy cộng đồng nấm rẫy trong cả hai đều do Ascomycota, Mortierellomycota và Basidiomycota chi phối. Hầu hết các nội sinh vùng rẫy đến từ Olpidiomycota, Oomycota và Ascomycota, trong khi hầu hết các nội sinh lá đến từ Ascomycota và Basidiomycota [42].

### 1.3. Các hoạt chất sử dụng trong bảo quản vật liệu gỗ

#### 1.3.1. Preventol

##### 1.3.1.1. Đặc điểm cấu tạo và tính chất

Preventol là một hợp chất hữu cơ, Công thức hóa học:  $C_{12}H_{10}O$ . Về cấu trúc, nó là một trong những đồng phân monohydroxyl hóa của biphenyl. Nó là một chất rắn màu trắng; giá trị pH 6-7 và có nhiều tên thương mại như Dowicide, Torsite, Preventol, Nipacide, Nectryl, Remol, Tetrosin, Anthrapole, CH9, ... và những tên gọi khác theo cấu tạo phân tử như 2-Phenylphenol/o-Phenylphenol (OPP), 2-Hydroxybiphenyl/o-Hydroxybiphenyl, 2-Biphenylol/ Biphenyl-2-ol/Biphenylol, 2-Hydroxydiphenyl/o-Hydroxydiphenyl, o-Xonal, ... [43] Preventol được tìm thấy ở nồng độ thấp trong một số sản phẩm gia dụng như thuốc khử trùng dạng xịt và bình xịt hoặc thuốc khử mùi hôi nách.

Ứng dụng chính của Preventol là thuốc diệt nấm và khử trùng phổ rộng được sử dụng rộng rãi trong nông nghiệp, công nghiệp và gia dụng [44]. Ngoài ra còn được sử dụng trên sợi và các vật liệu khác. Nó được sử dụng để khử trùng bệnh viện và thiết bị thú y. Các ứng dụng khác là trong ngành cao su và làm thuốc thử trong phòng

thí nghiệm. Nó cũng được sử dụng trong sản xuất làm chất bảo quản, thuốc nhuộm, nhựa và hóa chất cao su khác, nhưng chủ yếu sản xuất chất tẩy rửa khử trùng [43].

### 1.3.1.2. Khả năng kháng nấm

Alexandra Marco và cộng sự đã nghiên cứu khả năng ức chế các chủng nấm mốc phân lập từ các bức tranh tường cổ những năm 1500-1600 là *Alternaria tenuissima*, *Alternaria alternata*, TZ10.2.2 (*Pestaloptia* sp.) and TZ8.2.2 (*Penicillium* sp.) của các hoạt chất, trong đó Preventol R80 ức chế 4 chủng trên với MIC lần lượt là 3,12 ( $\mu\text{l/mL}$ ); 6,25 ( $\mu\text{l/mL}$ ); 6,25 ( $\mu\text{l/mL}$ ) và 1,56 ( $\mu\text{l/mL}$ ). So sánh với khả năng kháng nấm của các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên như tinh dầu quế, tinh dầu chanh... thì hiệu suất của Preventol kém khoảng 3-20 lần [45].

Ở dạng hợp chất muối Natri (Natri-orthophenyl-phenol), nồng độ ức chế tối thiểu điển hình (MIC,  $\mu\text{g/mL}$ ) cho một số chủng nấm là: *Aspergillus niger*, 4; *Epidermophyton* spp, 4; *Trichophyton interdigitale*, 8; *Myrothecium verrucaria*, 2 [46].

### 1.3.1.3. Cơ chế kháng nấm

Các hợp chất phenolic, trong đó có 2- phenylphenol hay còn gọi là Preventol, là chất điển hình ức chế quá trình hô hấp của tế bào nấm, tương tự như đồng sulphate [47, 48]. Ở nồng độ cao nhưng dưới mức gây nguy hiểm tới người, phenolic có khả năng xâm nhập qua thành tế bào vào bên trong và phá vỡ vách tế bào vi sinh vật. Ở nồng độ thấp thì làm bất hoạt các enzyme chức năng thiết yếu dẫn đến thiếu nguồn enzyme tham gia vào quá trình chuyển hóa tại thành tế bào [49, 50].

Preventol RI80 (Alky-dimethyl-benzylammoniumchlorid) và Preventol RI50 (N-Alkyl-N,N-dimetyl-N-benzylammonium clorua) đều là những hợp chất Ammonium bậc 4, nhóm hợp chất này có tác dụng làm bất hoạt các enzyme sinh năng lượng, do vậy làm thay đổi bản chất các protein và phá vỡ màng tế bào [51, 52].

## 1.3.2. Đồng sunphat

### 1.3.2.1. Đặc điểm cấu tạo và tính chất

$\text{CuSO}_4$ , còn được biết đến với các tên gọi như xanh vitriol, đá xanh, là một hợp chất muối có dạng tinh thể rắn hoặc bột, tồn tại ở cả dạng khan (màu trắng) và dạng ngậm nước (thường là  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , màu xanh lam). Đặc biệt, dạng ngậm nước có khả năng hút ẩm mạnh.

Trong nông nghiệp,  $\text{CuSO}_4$  đóng vai trò quan trọng như một nguyên liệu trong phân bón, giúp tăng cường sức đề kháng và khả năng chống chịu sâu bệnh cho cây trồng [53, 54]. Bên cạnh đó, đồng sunphat còn đóng vai trò quan trọng trong việc

cung cấp vi lượng đồng (Cu) thiết yếu cho cây trồng khi chúng bị thiếu hụt. Hơn nữa, hoạt chất này còn được ứng dụng rộng rãi như một loại thuốc kháng nấm, thuốc trừ sâu và diệt cỏ hiệu quả, giúp bảo vệ cây trồng khỏi các tác nhân gây hại [53, 54].

### 1.3.2.2. Khả năng kháng nấm

Oziengbe E.O và Osazee J.O đã cho thử nghiệm khả năng kháng nấm của đồng sunphat với một loại nấm bệnh thực vật *Colletotrichum gleosporioides* ở 4 nồng độ 0,2; 0,4; 0,6 và 0,8 mg/L. Kết quả đối với sự phát triển tuyến tính của nấm lần lượt là 16,8%; 28,5%; 51,6% và 78,2%. Và sự nảy mầm của bào tử nấm tương ứng là 30,6%; 44,4%; 46,7% và 66,3% [55].

Goncalves Rodrigues và cộng sự đã nghiên cứu về khả năng kháng sinh của đồng sunphat với nồng độ ức chế tối thiểu MICs dao động từ 100 đến 200  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Đối với nồng độ diệt khuẩn tối thiểu MBC-Cu = 1600  $\mu\text{g} / \text{mL}$  cho thấy tác dụng diệt khuẩn tốt nhất đối với phần lớn các chủng vi khuẩn được nghiên cứu (52%). Một hoạt động diệt khuẩn tốt của đồng sunphat đã được ghi nhận chống lại *Proteus vulgaris* và *Staphylococcus aureus* (MBC / MIC = 1) [56].

### 1.3.2.3. Cơ chế kháng nấm

Hợp chất đồng sunphat hoạt động ức chế sự hình thành nấm mốc bằng cơ chế chủ yếu là ức chế quá trình hô hấp của tế bào hay quá trình đường phân. Theo đó sự hình thành acetyl coenzym A (CoA) bị ức chế hoặc quá trình phosphoryl hóa chuỗi hô hấp bị gián đoạn, đồng thời ức chế quá trình sản xuất “adenosine triphosphate” (ATP) trung gian năng lượng cao [2]. Ion  $\text{Cu}^{2+}$  từ đồng sunphat có ái lực với các nhóm hóa học khác nhau trong tế bào của nấm, đặc biệt là với các nhóm thiol (nhóm S-H gắn vào carbon), dẫn đến sự biến tính không đặc hiệu của protein và enzyme [2].

Padmini Rathore và cộng sự cũng đưa ra ý kiến dựa trên cơ sở các giá trị MIZ (nồng độ ức chế trung bình) thu được rằng hoạt tính kháng nấm của đồng sulphate có thể là do khả năng của ion đồng ức chế enzyme. Ngoài ra, đồng sunphat là một loại muối hòa tan trong nước cho phép dễ dàng khuếch tán các ion đồng vào môi trường duy trì đủ mức ion đồng cần thiết cho hoạt động kháng nấm. Hơn nữa, ion đồng sẽ ưu tiên liên kết với thụ thể phối tử của thành tế bào nấm giúp cho ngăn chặn sự bám dính của nấm vào lớp lót nguyên liệu [57]. Có ý kiến cho rằng đồng ion hình thành liên kết tĩnh điện với vùng tích điện âm trên thành tế bào vi sinh vật. Những liên kết tĩnh điện này tạo kích thích dẫn đến tính thấm của thành tế bào bị thay đổi, làm gián đoạn quá trình hấp thụ bình thường các chất dinh dưỡng duy trì sự sống [57]. Các cơ

chế khác của hoạt động kháng nấm đồng có thể liên quan đến sự biến tính của axit nucleic và peroxy hóa lipid màng [58].

Tương tự, theo lập luận của báo cáo Kumbhar và cộng sự (1991) đưa ra, tác dụng kháng nấm của đồng sunphat đối với conidia và sự phát triển tuyến tính có thể là do các ion đồng có thể xúc tác cho việc sản xuất các gốc hydroxyl cao, gây tổn hại sau đó đối với lipid, protein, DNA và các phân tử sinh học khác. Sự phá vỡ tính toàn vẹn của màng do đồng gây ra trên diện rộng chắc chắn dẫn đến mất khả năng sống của tế bào [59].

### 1.3.3. Alpha-bromocinnamaldehyde

#### 1.3.3.1. Đặc điểm cấu tạo và tính chất

Cinnamaldehyde (CA) là thành phần chính trong tinh dầu quế chiết xuất từ vỏ và lá của cây quế, thuộc chi *Cinnamomum* [60]. Cinnamaldehyde có nhiều tác dụng khác nhau như chống ung thư, gây độc tế bào và gây đột biến; đồng thời có hoạt tính mạnh chống lại nhiều loại nấm gây mục gỗ [61]. Đây được coi là một chất an toàn, không gây độc cấp tính và mãn tính, không có trường hợp gây đột biến gen, nhiễm độc gen hay gây ung thư [62].

Khác với nhiều hợp chất tự nhiên có liên quan khác, Cinnamaldehyde đã được sử dụng như một chất chống nấm tiềm năng, nhưng bản chất dễ bay hơi và mùi hăng của nó đã hạn chế ứng dụng trong việc bảo vệ gỗ [60]. Do đó, các nhà khoa học đã biến đổi Cinnamaldehyde thành các dẫn xuất ổn định và có tính năng tốt hơn [60, 61, 63, 64]. Cinnamaldehyde được tạo phức với các bazơ Schiff (N,N,bis(p-methoxycinnamaldehyde) ethylenediamine) thu được sản phẩm có hoạt tính sinh học tốt hơn [60]. Ngoài ra có một số dẫn xuất cinnamaldehyde thay thế  $\alpha$  ( $\alpha$ -bromocinnamaldehyde,  $\alpha$ -chlorocinnamaldehyde, và  $\alpha$ -methylcinnamaldehyde) có hoạt tính ức chế enzyme Tyrosinase mạnh [61].

Hợp chất  $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde ( $\alpha$ -BCA) với công thức phân tử  $C_9H_7BrO$  là chất rắn ở nhiệt độ bình thường, trong số các chất có hoạt tính kháng nấm,  $\alpha$ -bromocinnamaldehyde được biết đến là một hoạt chất chống vi khuẩn và chống nấm mốc với phổ rộng. Trong những năm gần đây  $\alpha$ -brom cinnamaldehyde được sử dụng rộng rãi trong việc làm sạch môi trường, vệ sinh cá nhân; ứng dụng cả trong các lĩnh vực công nghiệp như giày da, dệt may, thực phẩm, đồ gỗ, giấy, sơn nhựa, dụng cụ quang học và nhiều sản phẩm khác. Hoạt chất  $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde còn được sử dụng làm chất khử mùi cho giày dép, đế lót giày.  $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde có độc tính thấp và một lượng hơi rất ít hình thành từ nó có thể được coi là gần như không



độc hại cho cơ thể con người [61, 64, 65].

Bên cạnh đó,  $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde hầu như không có ảnh hưởng đến các tính chất điện (sự cố điện áp điện môi và lượng điện trở), hơi của nó có tác dụng hiệu quả khi thấm qua giấy hoặc qua túi polyethylene, không gây ăn mòn kim loại, và không có tác dụng phụ trên các sợi tự nhiên, sợi tổng hợp hoặc trên giấy.

### 1.3.3.2. Khả năng kháng nấm

Hoạt động của  $\alpha$ -BCA đã được báo cáo không chỉ chống lại các loại nấm mốc như *Candida albicans*, *Aspergillus niger* và *Penicillium chrysogenum*, mà còn chống lại nhiều loài vi khuẩn như *Bacillus subtilis*, *Sarcia lutea*, *Staphylococcus aureus* [63]. S. Ishida và cộng sự đã khảo sát thành công khả năng ức chế của hoạt chất này đối với sự sinh trưởng của hai loại nấm mốc *Candida albicans* và *Trichophyton mentagrophytes* [66].

Daniela Maxim và cộng sự đã tiến hành thử nghiệm 10 loại hoạt chất chống vi sinh khác nhau để nghiên cứu tính kháng nấm đối với một số loại nấm mốc được phân lập từ các bức bích họa *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria* và *Fusarium*; đưa tới kết luận Cinnamaldehyde đều có tính kháng mạnh hơn Preventol ở các nồng độ thử nghiệm 3% và 5% [67]. Tính kháng tốt hơn của Cinnamaldehyde cũng được chứng minh ở báo cáo của A.Marco, 2019 cho thấy MIC cần dùng của Preventol bằng 12,5  $\mu\text{L/mL}$  gấp 5-10 lần so với Cinnamaldehyde đối với 2 chủng nấm thuộc chi *Alternaria*, gấp khoảng 20 lần với chủng *Pestaloptia* sp. và khoảng 3 lần với chủng *Penicillium* sp. [45].

Kang và cộng sự cũng đã đưa ra công bố vào năm 2007 về khả năng kháng nấm mạnh của các dẫn xuất halogen của Cinnamaldehyde là 2-chloro-cinnamaldehyde and 2-bromo-cinnamaldehyde với giá trị IC<sub>50</sub> là 37,2 và 26,6  $\mu\text{g/mL}$ . Ngoài ra còn cho thấy khả năng chống các chủng nấm đa dạng của 2 dẫn xuất Cinnamaldehyde này bao gồm nấm men, nấm mốc và các dòng nấm gây bệnh ở người như *Cryptococcus neoformans* (MIC = 16  $\mu\text{g/mL}$ ) [68].

Với các thử nghiệm nhiều loại dẫn xuất khác nhau của Cinnamaldehyde, Bang và cộng sự đã cho nghiên cứu 4 loại hoạt chất gồm hydrocinnamaldehyde,  $\alpha$ -methyl cinnamaldehyde,  $\alpha$ -chlorocinnamaldehyde, 4-(dimethyl-amino)-cinnamaldehyde và 4-methoxycinnamaldehyde hoạt động ức chế các chủng nấm *Trichophyton mentagrophytes*, *Micrococcus gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* và *Penicillium avellaneum*. Trong đó  $\alpha$ -chlorocinnamaldehyde được phát hiện có hoạt tính cao với MIC là 9,76-19,5

$\mu\text{g/mL}$  [69]. Một nghiên cứu khác của Bang và cộng sự khi thử nghiệm thêm dẫn xuất khác là  $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde có khả năng ức chế tốt nhất trong các dẫn xuất cinnamaldehyde đối với 7 chủng nấm như trên với MIC 0,61 – 9,76  $\mu\text{g/mL}$  [70]. Zengyu Gan và cộng sự cũng đưa ra báo cáo thử nghiệm khả năng kháng nấm *Penicillium digitatum* của Cinnamaldehyde (CA) cùng 6 dẫn xuất của CA, trong đó vùng ức chế nấm tối đa của 4-chloro CA ( $20.50 \pm 0.71$  mm) lớn hơn 4-bromo CA ( $17.50 \pm 0.71$  mm), cho thấy khả năng ức chế nấm của 2 loại dẫn xuất halogen của CA này gần như tương đương nhau [64]. Đây có thể làm con số tham khảo với nghiên cứu hoạt chất với dẫn xuất Cinnamaldehyde là  $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde.

Ở dạng dược liệu, Công ty Nippon Kayaku Tokyo đã đưa ra các báo cáo chứng minh halogen hóa các dẫn xuất cinnamaldehyde làm tăng mạnh hoạt tính kháng nấm.  $\alpha$ -bromocinnamaldehyde và p-nitro- $\alpha$ -bromocinnamaldehyde có hiệu quả khi bôi hoặc uống. Trong đó  $\alpha$ -bromocinnamaldehyde (0,5 hoặc 1%) ở dạng thuốc mỡ có hiệu quả chống lại *Trichophyton mentagrophytes*, ngoài ra còn chống dòng nấm bệnh da khác như *Candida albicans* [66].

Để so sánh khả năng kháng nấm của các hoạt chất với nhau, nhóm nghiên cứu của Daniela Maxim đã tiến hành thử nghiệm 10 loại hoạt chất chống vi sinh khác nhau, trong đó có hoạt chất Cinnamaldehyde và Preventol, đối tượng nghiên cứu là một số loại nấm mốc được phân lập từ các bức bích họa thuộc các chi *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria* và *Fusarium*; từ đó đưa tới kết luận rằng Cinnamaldehyde có khả năng kháng nấm cao hơn Preventol [67].

### 1.3.3.3. Cơ chế kháng nấm

Zengyu Gan và cộng sự năm 2020 đã thử nghiệm một số hoạt chất ức chế lên nấm *Penicillium digitatum*, một loại nấm thường gặp gây mốc xanh trên các loại cây ăn quả có múi. Quan sát hình dạng sợi nấm *Penicillium digitatum* sau khi cho nuôi trong môi trường chứa hoạt chất 4-methoxycinnamaldehyde cho thấy sợi nấm có hiện tượng phồng lên không đều và làm rỗng các tế bào sợi nấm, màng tế bào bị vỡ dần làm rò rỉ thể vùi tế bào chất dẫn đến chết tế bào. Ngoài ra, nghiên cứu còn chứng minh được hoạt chất này ở MFC (nồng độ diệt nấm tối thiểu) làm phá vỡ tế bào bằng cách làm dẫn ngoại bào với độ dẫn ngoại bào cao nhất  $645,3 \pm 5,0$   $\mu\text{s/cm}$ . Đồng thời kiểm tra hàm lượng đường khử để đánh giá liệu quá trình sinh tổng hợp và sản xuất các thể vùi nội bào có bị ảnh hưởng sau khi xử lý qua hoạt chất hay không, mức đường khử của nấm *P. digitatum* được xử lý bằng 4-methoxy CA ở MFC là  $7,33 \pm 0,38$  mg/g, thấp hơn một cách hợp lý so với nhóm đối chứng sau 24 giờ ủ ( $14,03 \pm 0,53$  mg/g), điều này cho thấy quá trình sinh tổng hợp và sản xuất hàm lượng đường khử

bị hạn chế gây nguy hiểm trực tiếp đến việc cung cấp năng lượng cho tế bào [64].

Một nghiên cứu vào năm 2013 đã đưa ra bằng chứng rằng cinnamaldehyde làm rối loạn cân bằng nội môi canxi ( $\text{Ca}^{2+}$ ), được chứng minh là có liên quan đến sự ức chế tăng trưởng của *Phytophthora capsici* [71]. Trong đó  $\text{Ca}^{2+}$  có chức năng quan trọng trong các quá trình khác nhau của tế bào như sự hình thành bào tử, sự nảy mầm của bào tử, sự phân nhánh của sợi nấm, sự phát triển của ngọn và sự khác biệt về cấu trúc [72-74]. Việc làm gián đoạn hoạt động trao đổi chất của tế bào nấm của hoạt chất này cũng được nhắc đến trong công bố của Yoshio Akimoto [63].

Ngoài ra, CA còn ảnh hưởng tới quá trình sinh tổng hợp thành tế bào và cấu trúc màng tế bào vi sinh vật. Hoạt chất này có khả năng thay đổi thành phần lipid của màng tế bào vi sinh vật [75]. Một nghiên cứu vào năm 2006 cũng đã nói rằng cấu hình lipid ở màng tế bào nấm bị thay đổi khi cho tế bào *Staphylococcus aureus* xử lý qua hoạt chất CA, dẫn đến tăng tính thấm và phân hủy lớp vỏ tế bào [76].

Một thử nghiệm trên nấm *Saccharomyces cerevisiae*, CA đã được khảo sát cho thấy sự ức chế các enzyme tổng hợp thành tế bào bằng cách CA hoạt động như một chất ức chế hỗn hợp các isozyme tổng hợp chitin và đồng thời ức chế enzyme tổng hợp thành tế bào sơ cấp  $\beta$ -(1,3)-glucansynthase [77]. Ngoài ra, màng tế bào bị phá vỡ có thể làm thay đổi quá trình điều hòa ATP nội bào và cân bằng một số ion thiết yếu (như ion  $\text{K}^+$  và  $\text{H}^+$ ) [78].

Một nghiên cứu cũng phát hiện ra rằng cinnamaldehyde có hiệu quả đối với một số chủng phân lập lâm sàng kháng fluconazole khi làm giảm hàm lượng ergosterol của thành tế bào [79]. Ở nấm men, ergosterol là thành phần quan trọng của thành tế bào nấm, đóng vai trò thiết yếu trong chức năng của màng nấm bao gồm độ cứng, tính lưu động và tính thấm của màng [80].

Ở nồng độ cao nhưng dưới mức gây chết người, CA hoạt động như một chất ức chế ATPase và ở nồng độ rất thấp, CA có thể ức chế các enzym tham gia vào quá trình tương tác với cytokine [81]. Tương tự, Gill AO và cộng sự cũng đưa ra các công bố chứng minh cinnamaldehyde xâm nhập vào chất nền tế bào và ức chế hoạt động ATPase xuyên màng [82, 83]. Các nghiên cứu cho thấy cinnamaldehyde ức chế hoạt động ATPase gắn màng của *Escherichia coli* và *Listeria monocytogenes* [83]. Do đó, sự cạn kiệt ATP (ATPase bị ức chế) có thể ảnh hưởng đến hoạt động bơm proton  $\text{H}^+$ , sự cân bằng vận chuyển ion và kim loại cũng như các chức năng của ty thể dẫn đến những tác động có hại đến tốc độ tăng trưởng. Màng sinh chất  $\text{H}^+$ -ATPase có thể đóng vai trò là mục tiêu phân tử quan trọng để can thiệp kháng nấm [84]. Enzyme thiết yếu này đóng một vai trò quan trọng trong sinh lý tế bào nấm trong việc duy trì

gradient proton điện hóa xuyên màng và cần thiết cho sự hấp thu chất dinh dưỡng và điều chỉnh pH nội bào [85, 86].

Có thể nói, Cinnamaldehyde có tác dụng kháng nấm của nó bằng cách ức chế các quá trình tổng hợp H<sup>+</sup>-ATPase và sterol, rối loạn cân bằng nội môi canxi (Ca<sup>2+</sup>), ức chế các enzyme chức năng và thay đổi cấu trúc màng tế bào.

#### 1.4. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam

Tại Việt Nam, nghiên cứu về khả năng phá hủy sinh học của nấm mốc và khả năng chống nấm mốc của hóa chất đã được các nhà khoa học quan tâm. Năm 2014, nhóm nghiên cứu của Nguyễn Ngọc Trúc Ngân đã phân lập được 55 chủng nấm mốc có khả năng phân giải cellulose từ bã thải vỏ sắn, trong đó có 2 chủng được đánh giá có khả năng phân giải cellulose tốt nhất với đường kính vòng phân giải trên môi trường CMC lần lượt là 28,5 mm và 27 mm [87]. Bên cạnh đó, Hồ Bảo Thủy Quyên và cộng sự (2018) đã phân lập và lưu được kho giống lớn gồm 220 nấm mốc có khả năng phân giải cellulose từ mẫu đất rừng Mã Đà, Đồng Nai. Bộ chủng này thuộc bốn chi nấm *Aspergillus*, *Penicillium*, *Curvularia* và *Trichoderma*; trong đó chi *Aspergillus* chiếm ưu thế nhất (56%) và một số chủng thuộc chi *Penicillium* có hoạt tính phân giải cellulose cao [88].

Trần Ngọc Trang và cộng sự đã làm thử nghiệm nấm mốc áp dụng phương pháp tiêu chuẩn ASTM D3273-16 trên một số vật liệu xây dựng đang được sử dụng phổ biến tại Việt Nam, trong đó đã thực hiện trên 3 loại tấm thạch cao gồm tấm thạch cao tiêu chuẩn, tấm thạch cao chịu ẩm và tấm thạch cao siêu chống ẩm mốc và đã công bố kết quả đánh giá về khả năng chống nấm của 3 vật liệu trên vào năm 2021. Cụ thể, mốc đã bắt đầu xuất hiện và phát triển trên các tấm mẫu thử và sau 28 ngày phơi nhiễm, tỷ lệ diện tích nhiễm mốc trung bình xác định là 11,375% đối với tấm thạch cao tiêu chuẩn và 16,192% đối với tấm thạch cao chịu ẩm. Xét theo thang đánh giá cấp độ kháng nấm mốc ASTM D3273 thì xếp hạng cấp kháng nấm mốc của hai nhóm sản phẩm này là cấp 8/10. Kết quả này cho thấy những vật liệu có khả năng kháng ẩm cũng chưa chắc có thể kháng được sự sinh trưởng của nấm mốc trên vật liệu. Mà để có hiệu quả kháng nấm mốc nói riêng và kháng vi sinh vật nói chung thì trong thành phần vật liệu phải chứa các tác nhân có hoạt tính kháng vi sinh vật. Như sản phẩm tấm thạch cao siêu kháng ẩm mốc (có tấm hoạt chất ức chế nấm) được tiến hành phơi nhiễm trong cùng một điều kiện như đối với tấm thạch cao tiêu chuẩn và thạch cao chịu ẩm và kết quả đánh giá kháng nấm mốc theo tiêu chuẩn đạt cấp 10/10. Nghiên cứu này là bước đệm quan trọng để hướng tới việc xây dựng tiêu chuẩn quốc gia TCVN [1].

Nhóm nghiên cứu Nguyễn Thị Hằng năm 2011 cũng đã thử nghiệm bảo quản chống mốc trên gỗ Thông mã vĩ, một trong các loài cây mọc nhanh rừng trồng với diện tích lớn ở nước ta, với 3 loại thuốc hòa tan trong dung môi nước bao gồm: XM<sub>5</sub> có thành phần hoạt chất chính là  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , LN<sub>5</sub> có thành phần hoạt chất chính là  $\text{ZnSO}_4 + \text{NaF}$ , thuốc bảo quản lâm sản hòa tan trong dung môi hữu cơ Cislin 2.5 EC. Kết quả cho thấy thuốc LN<sub>5</sub> có hiệu lực tốt nhất so ở cả 3 nồng độ thử nghiệm là 3%, 5%, 7%. Ngoài ra, bảo quản bằng XM<sub>5</sub> làm mẫu gỗ đổi màu từ màu vàng sang màu vàng xanh, còn bảo quản bằng LN<sub>5</sub> thì không ảnh hưởng tới màu sắc tự nhiên của gỗ, như vậy để bảo quản gỗ dùng làm sản xuất đồ mộc yêu cầu không làm ảnh hưởng tới màu sắc thì thuốc LN<sub>5</sub> là phù hợp [89].

Gỗ, một tài nguyên thiết yếu của Việt Nam ta, dưới điều kiện khí hậu nhiệt đới điển hình với đặc tính nóng ẩm mưa mùa là điều kiện thuận lợi cho vi sinh vật nói chung và nấm mốc nói riêng phát triển. Vì vậy xảy ra tình trạng mốc gỗ là không tránh khỏi, dẫn đến ảnh hưởng rất lớn tới đời sống sản xuất và sinh hoạt của con người. Ở nước ta, gỗ được áp dụng rộng rãi vào đa ngành, đa lĩnh vực như dùng gỗ vào các công trình kiến trúc hạ tầng như nhà cửa, các đền chùa, nhà thờ, bảo tàng, các di tích lịch sử...; ứng dụng trong nội thất và trang trí như bàn, ghế, tủ, kệ, giường, ...; ứng dụng trong công nghệ như các sản phẩm loa, đồng hồ, ...; trong thể thao và giải trí như đàn, vợt tennis, ...; trong ngành nông nghiệp như hệ thống giàn leo, cột chống, ...; trong ngành y học truyền thống, nghiên cứu, giáo dục, ngành thủ công, năng lượng tái tạo, hệ thống cân bằng sinh thái ... và đặc biệt là ứng dụng trong ngành quân đội. Trong lịch sử thời niên đại đến hiện đại, ông cha ta đã sử dụng vật liệu gỗ khi các vật liệu khoáng, kim loại chưa được khai thác nhiều, để lại cho Việt Nam hiện nay rất nhiều di tích lịch sử và các cổ vật quý giá có nguồn gốc từ gỗ. Việc bảo quản các di tích ấy là vô cùng quan trọng. Phá hủy sinh học ở gỗ gây nhiều tác hại như mục rữa, thay đổi kết cấu, mất mỹ quan kiến trúc, dễ gây sụt vỡ, hỏng hóc các sản phẩm làm từ gỗ. Không chỉ gây tổn thất về cơ sở vật chất, nấm mốc còn tác động xấu tới sức khỏe con người bởi đa phần các loại nấm mốc đều có độc tố. Nấm mốc sinh sản bằng bào tử với kích thước hiển vi nên chúng có mặt ở hầu khắp mọi nơi, trong đất, không khí, trên bề mặt các loại vật liệu. Vì vậy, con người sẽ dễ tiếp xúc và dễ mắc phải một số bệnh nếu sống lâu trong môi trường ẩm mốc. Trẻ em, người cao tuổi và một số đối tượng nhạy cảm với bào tử nấm có thể thấy các dấu hiệu như mắt hoặc da phát ban, ngứa, nghẹt mũi, hen suyễn hoặc khó thở ngay sau khi tiếp xúc với một ít bào tử [1]. Người khỏe mạnh cũng có thể bị ngộ độc nấm nếu tiếp xúc với mycotoxin ở nồng độ cao hoặc trong thời gian dài. Các phản ứng nghiêm trọng có thể bao gồm sốt và khó thở [1]. Vì vậy, việc ngăn ngừa sự sinh trưởng và phát triển của

nấm mốc trên các vật liệu gỗ không chỉ là vấn đề về tính thẩm mỹ, giá trị vật chất cần bảo quản, bảo tồn mà còn đảm bảo sức khỏe, tinh thần và y tế cộng đồng.

Khu vực Biên Hòa là một địa điểm thuộc tỉnh Đồng Nai, miền Nam Việt Nam, khí hậu gồm hai mùa là mùa mưa và mùa khô, dao động nhiệt độ trong năm khoảng từ 22°C đến 35°C, đây là khoảng nhiệt độ lý tưởng cho nhiều loài nấm phát triển. Khi hòm gỗ bị mốc, chúng sẽ có nguy cơ bị hư hại và có thể ảnh hưởng đến chất lượng của chi tiết, trang thiết bị bảo quản trong đó, cũng như có nguy cơ ảnh hưởng đến sức khỏe bộ đội khi tiếp xúc hoặc hít thở phải nấm mốc. Từ đó cho thấy việc bảo quản và giảm thiểu sự phá hủy của nấm mốc đến hòm gỗ cất chứa, niêm cất chi tiết, trang thiết bị cũng như ống giấy bảo quản là điều cần thiết. Việc nghiên cứu ứng dụng hóa chất chống nấm mốc để tăng khả năng kháng nấm cho các loại hòm gỗ, ống giấy bảo quản trang thiết bị là có tính cấp thiết để đáp ứng được yêu cầu nhiệm vụ. Chính vì vậy, chúng tôi đề xuất đề tài ***“Nghiên cứu đa dạng khu hệ nấm gây hại trên hòm gỗ thu thập tại Đồng Nai và khảo sát hiệu quả ức chế nấm của một số chế phẩm”***.

## Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

#### 2.1.1. Vật liệu nghiên cứu

**Vật liệu vi sinh:** 5 hòm gỗ bị phá huỷ bởi nấm được thu thập tại nhà kho K752 tại tỉnh Đồng Nai. Trong đó, 20 vị trí bị nấm phá huỷ mạnh nhất được lựa chọn để thu mẫu nghiên cứu.



**Hình 2.1.** Hình ảnh hòm gỗ lưu kho trên 5 năm tại kho K752, Đồng Nai, Việt Nam



**Hình 2.2.** Các mẫu tăm bông sau quá trình thu hồi mẫu nấm trên bề mặt

**Vật liệu hóa học :** 4 loại hoạt chất thử nghiệm gồm: Đồng sunphat, Preventol,  $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde ( $\alpha$ -BCA) và chế phẩm AM-QS được tạo ra bởi tổ hợp 3 hóa chất trên.

#### 2.1.2. Hóa chất và thiết bị

##### *Hóa chất*

Các hóa chất chính được sử dụng trong đề tài:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Đức),  $\text{NaNO}_3$  (Merck, Đức),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Đức),  $\text{FeSO}_4$  (Merck, Đức),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Đức), Peptone (Trung Quốc), Glucose (Trung Quốc), Saccharose (Trung Quốc),  $\text{NaCl}$  (Trung Quốc),  $\text{KCl}$  (Trung Quốc) Agar (Việt Nam), Glycerol (Ấn Độ), Tween

80 (Trung Quốc) và một số hóa chất thí nghiệm khác đảm bảo độ tinh khiết của các hãng nội địa và nước ngoài như Sigma, Merck, Aldrich...

Hóa chất nghiên cứu sinh học phân tử: Lysozyme (Merck, Đức), nước RO, bộ kit tinh sạch DNA từ gel agarose, bộ kit tách DNA của nấm EZ-10 Spin Column Fungal Genomic DNA Mini-Preps Kit (BioBasic, Mỹ), Taq DNA polymerase (Thermo scientific, Mỹ).

### ***Dụng cụ***

Đĩa Petri nhựa Ø90 và Ø60 (Biologix, Mỹ), bình duran (Đức), micropipettes, đầu tip (Isolab, Đức), bình tam giác (các thể tích 100mL, 500mL, 1000mL) (Đức), ống falcon (15mL, 50mL) (Biologix, Mỹ), ống eppenndorf (1,5mL; 2mL ; 5mL) (Biologix, Mỹ), que cấy, que trang, đĩa thủy tinh, lam kính lõm (ISOLAB, Đức), lamén (Marienfeld, Đức), cốc đong các loại...

### ***Thiết bị, máy móc***

Các thiết bị nuôi cấy và lưu giống: Box nuôi cấy vi sinh (Box Laminar, Việt Nam), tủ ấm (Sanyo, MIR-262 Nhật Bản), tủ ẩm lắ (ES-20/60 Biosan-EU), tủ lạnh (Hitachi), tủ lạnh sâu -20°C (Sanyo, Nhật Bản), tủ lạnh sâu -80°C (Binder, Đức).

Các thiết bị sấy và khử trùng: tủ sấy (Sanyo, Mov 212- Nhật), nồi hấp khử trùng (Hirayama, Nhật Bản), lò vi sóng (Blue Stone, Việt Nam).

Các thiết bị sinh học phân tử: tủ thao tác gen (UV-cabinet, Hàn Quốc), bộ điện di ngang (Nyx tochnik, Mỹ), máy PCR (Applied Biosystems Life Technologies, Singapore) và máy soi gel (Ugenius 3, Anh).

Các thiết bị khác: máy vortex (Velp, Italia), kính hiển vi điện tử huỳnh quang (Axio 503 Imagez.22 Carl Zeiss, Đức), máy đo pH Hanna (Ý, PH 211), máy ly tâm lạnh (Roto 2k15, Sigma, Đức), cân kỹ thuật (Ohaus, Mỹ), ...

### **2.1.3. Môi trường nuôi cấy**

Môi trường Czapek-Dox (g/L): saccharose 30; peptone 7,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,5; KCl 0,5; NaNO<sub>3</sub> 3; FeSO<sub>4</sub> 0,01; agar 20; pH 7,0.

## **2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.2.1. Phương pháp phân tích đa dạng khu hệ nấm sợi bằng kỹ thuật metagenomics [37]**

Hai mươi đầu tăm bông được dùng để lau 5 thùng gỗ chứa hàng trong kho ở Đồng Nai, Việt Nam đã được lấy để tách chiết DNA. DNA tổng số được tách chiết



bằng kít DNeasy PowerSoil (Qiagen, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chất lượng của DNA được phân tích bằng điện di ngang trên gel agarose và NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). Các mẫu DNA đạt tiêu chuẩn được bảo quản ở  $-80^{\circ}\text{C}$  trước khi giải trình tự [37].

DNA đã được tách chiết được sử dụng để tạo thư viện bằng bộ chuẩn bị thư viện NEBnext Ultra II và NEBnext Multiplex Oligos Dual (NEBnext) với quy trình tạo thư viện được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó, thư viện được sử dụng giải trình tự thế hệ mới trên hệ thống Illumina (USA). Dữ liệu thô được trải qua 2 bước, bao gồm tiền xử lý và làm sạch. Biểu đồ biểu diễn các phân loài ở các mẫu và các phân tích đa dạng alpha, đa dạng beta được thực hiện với QIIME2 [90].

### **2.2.2. Phân lập nấm sợi**

Thu thập mẫu và phân lập nấm sợi được thực hiện theo Hayes (1965) và GOST 9053-75 (1975) kèm theo một số hiệu chỉnh như sau [91, 92]:

- Mẫu tấm bông vô trùng quét lên bề mặt hòm gỗ bị nhiễm nấm, kiểm tra bằng kính lúp soi nổi đến khi không còn thấy sợi nấm thì dừng.
- Đầu tấm bông được cho vào ống nghiệm chứa nước cất vô trùng chứa 0,005% Tween 80 và lắc 200 vòng/phút trong 30 phút.
- Sau đó, 0,1 mL dịch pha loãng và trang trên đĩa chứa môi trường Czapek-Dox, nuôi ở  $28^{\circ}\text{C}$  trong 4-5 ngày.
- Các khuẩn lạc riêng rẽ được tách và làm sạch trên môi trường Czapek-Dox.

### **2.2.3. Xác định đặc điểm hình thái của nấm sợi**

Các chủng nấm sợi đã tách riêng được nuôi cấy trên môi trường Czapek-Dox trong 5-10 ngày ở  $28^{\circ}\text{C}$  và được quan sát đặc điểm hình thái theo Raper và Thom (1949), Samson và cộng sự (2011), Crous và Groenewald (2015), Stolk và Samson (1972) dựa trên một số đặc điểm chính về hình dạng khuẩn lạc, bề mặt và màu sắc [12, 93-95].

Các chủng nấm sợi được nuôi cấy ở điều kiện  $28-30^{\circ}\text{C}$  trên môi trường thạch Czapek-Dox trên lamén cấy nghiêng. Sau 72 giờ nuôi cấy, chủng nấm được lấy ra quan sát bằng kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 40 lần [96]. Quan sát cuống sinh bào tử và bào tử tập trung vào một số điểm như sợi nấm (hyphae), bào tử (conidia), cuống sinh bào tử, ...

### **2.2.4. Phân loại nấm dựa trên giải và phân tích trình tự gen ITS**

Các chủng nấm được nuôi trong môi trường Czapek-Dox dịch thể ở điều kiện  $28^{\circ}\text{C}$ , lắc 150 vòng/phút. Sau 72 giờ nuôi cấy, sinh khối nấm sợi được chuyển vào

ống ly tâm 1,5 mL. Các bước tiến hành thu và làm sạch sinh khối nấm sợi và quy trình tách chiết DNA tổng số được thực hiện theo hướng dẫn Kít Fungi/Yeast DNA Extraction (Norgen, Canada) [97]. Trình tự ITS được nhân lên từ DNA tổng số với cặp mồi ITS1F (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3'); ITS4R (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). Phản ứng PCR được thực hiện trong tổng thể tích 50  $\mu$ L có chứa 1  $\mu$ L mẫu DNA của bộ gen (10 ng/ $\mu$ L), 5  $\mu$ L của 10 x Taq buffer, 1  $\mu$ L dNTP (200  $\mu$ M), 1  $\mu$ L mồi xuôi và mồi ngược (0,5  $\mu$ M) và Taq DNA polymerase (0,05 U/ $\mu$ L) (MBI, Fermentas, Lithuania). Phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt: 95°C: 4 phút, 30 chu kỳ (95°C: 1 phút, 55°C: 1 phút, 72°C: 2 phút), và 72°C: 10 phút [98].

Sản phẩm PCR được phân tích trên 1% (w/v) gel agarose. Thang DNA chuẩn có kích thước 100 bp và 1 kb (Fermentas, Lithuania) và gel được chạy ở 100 V ở nhiệt độ phòng trong 45 phút. Sản phẩm PCR được quan sát bằng thiết bị phân tích hình ảnh (ChemImager 5500, Alpha Innotech, CA, Mỹ) [99]. Sản phẩm PCR được kiểm tra, tinh sạch và gửi đến công ty First BASE Laboratories Sdn. Bhd. (Malaysia) để giải trình tự. Các trình tự được xử lý bằng phần mềm BioEdit (ver. 6.0.7, Mỹ) và so sánh với các trình tự tương ứng của các chủng đã được đăng ký trên GenBank bằng công cụ BLAST, NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Cây phả hệ được xây dựng bằng phần mềm Mega (ver.7) bằng cách sử dụng phương pháp Maximum-likelihood, dựa trên thuật toán gamma và Kimura 2 với giá trị bootstrap 1000 [100, 101]. Cây phân loại được chỉnh sửa bằng phần mềm Treedyn [102] với giá trị bootstrap thấp hơn 0,5 được hiển thị trên cây [100].

### **2.2.5. Khảo sát khả năng sinh enzym ngoại bào của các chủng nấm phân lập**

Các chủng nấm đã tinh sạch được nuôi cấy trên môi trường Czapek-Dox ở nhiệt độ 30°C  $\pm$  2°C trong 3-5 ngày. Đục lấy thổi thạch và đặt lên các đĩa petri chứa môi trường thạch có bổ sung cơ chất 1% CMC, 0,5% tinh bột, 0,05% guaiacol tương ứng để xác định khả năng sinh enzyme cellulase, amylase và laccase. Đặt đĩa trong tủ lạnh 4-6 giờ. Sau đó, chuyển đĩa vào tủ ấm ở nhiệt độ 30°C  $\pm$  2°C trong 24 giờ. Hiện màu bằng dung dịch lugol 1%, đo đường kính vòng phân giải trên đĩa thạch. Hoạt tính enzym được xác định bằng đường kính vòng phân giải (mm) [103-105].

### **2.2.6. Đánh giá khả năng kháng nấm của các hoạt chất thử nghiệm**

Khảo sát khả năng ức chế thông qua việc xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC của các hoạt chất lên bào tử nấm bằng kính hiển vi điện tử với các bước sau [64, 106]: Xác định mật độ bào tử trong dịch bào tử bằng buồng đếm hồng cầu và điều chỉnh nồng độ dịch bào tử để đưa về mật độ bào tử là  $1 \times 10^5$  CFU/mL. Chuẩn bị các

phiến kính lõm vô trùng. Mỗi phiến kính hút 30  $\mu\text{L}$  môi trường Czapek-Dox đã pha sẵn hoạt chất với các nồng độ khác nhau trộn đều với 2  $\mu\text{L}$  dịch bào tử ( $1 \times 10^5$  CFU/mL). Các mẫu thử nghiệm được bổ sung với các nồng độ khác nhau như sau:  $\text{CuSO}_4$  (mg/L): 0; 200; 300; 400; 500; 600 [55, 107]. Preventol (mg/L): 0; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05 [45, 46, 67, 108].  $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde (mg/L): 0; 1; 5; 10; 20; 30 [64, 109, 110]. Chế phẩm AM-QS (%): 0; 0,1; 0,3; 0,5; 1; 2. Phiến kính đã cấy đặt trên giấy lọc và đặt trong 1 đĩa petri, ủ ở  $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ . Theo dõi khả năng nảy mầm của bào tử sau 24h và 48h bằng kính hiển vi điện tử.

Các bào tử được xác định là nảy mầm nếu chiều dài ống mầm bằng hoặc lớn hơn chiều dài bào tử [64]. Nồng độ ức chế tối thiểu MIC được xác định là nồng độ hoạt chất tối thiểu ức chế trên 90% sự phát triển của sợi nấm [106].

$$\text{Tính sự ức chế nảy mầm của bào tử (SGI\%)} = \frac{\text{GC} - \text{GT}}{\text{GC}} \times 100$$

Trong đó: GC: số lượng bào tử nảy mầm của mẫu đối chứng

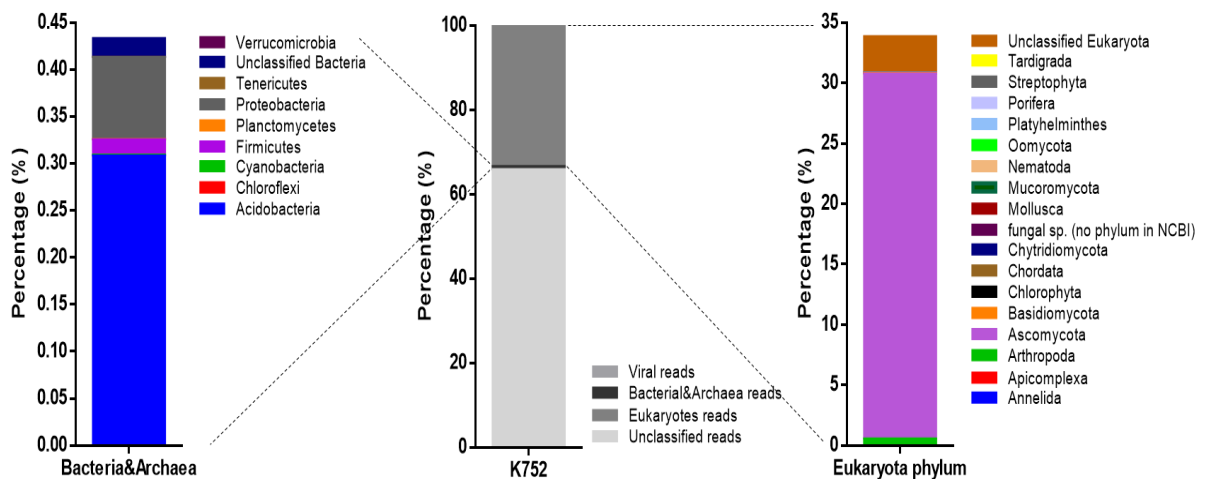
GT: số lượng bào tử nảy mầm của mẫu chứa hoạt chất.

### Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Đánh giá đa dạng khu hệ nấm trên bề mặt hòm gỗ bằng kỹ thuật metagenomics

##### 3.1.1. Phân tích đa dạng vi sinh vật phân huỷ hòm gỗ

Mẫu DNA thu được từ bề mặt hòm gỗ lưu trữ trang bị đã được sử dụng để giải trình tự bằng hệ thống Illumina. Kết quả nay được sử dụng để phân tích và đánh giá và sự đa dạng của các nhóm vi sinh vật (vi khuẩn, vi khuẩn cổ, sinh vật nhân chuẩn) trong các mẫu hòm gỗ bị phân huỷ. Quá trình giải trình tự đã tạo ra 6.185.888 đoạn đọc thô, trong đó chiếm tới 65,74% là các đoạn đọc không được phân loại. Trong số các đoạn đọc được phân loại, 33,79% là tổng các đoạn đọc sinh vật nhân chuẩn và số lượng đoạn đọc sinh vật nhân sơ, trong đó đa số là đoạn đọc của sinh vật nhân chuẩn. Vi khuẩn và vi khuẩn cổ chỉ chiếm 0,74% tổng số đoạn đọc thu được với 8 ngành được phân loại, bao gồm Acidobacteria, Chloroflexi, Cyanobacteria, Firmicutes, Planctomycetes, Proteobacteria, Tenericutes và Verrucomicrobia. Trong đó ngành có số lượng lớn nhất là Acidobacteria (0,3075%), tiếp theo là các ngành Proteobacteria (0,0842%), Firmicutes (0,0148%) và Chloroflexi (0,0021%) (Hình 3.1).



**Hình 3.1.** Phân tích đa dạng của khu hệ vi sinh vật trên mẫu hòm bị phân huỷ

Ngược lại, với nhóm sinh vật nhân chuẩn, có tất cả 17 ngành được xác định bao gồm Ascomycota, Arthropoda, Basidiomycota, Streptophyta, Mucoromycota, Oomycota, Mollusca, Nematoda, Chytridiomycota, Annelida, fungal sp. (no phylum in NCBI), Chordata, Platyhelminthes, Porifera, Apicomplexa, Chlorophyta và Tardigrada. Ngành chiếm ưu thế là Ascomycota với tỷ lệ lớn nhất là 30,19%, tiếp theo là ngành Arthropoda với tỷ lệ 0,63%. Ngoài ra, ngành nấm không được phân

loại chiếm 3%, điều này khẳng định sự phong phú về đa dạng khu hệ nấm trên mẫu hòm phân hủy.

Vi khuẩn ít phổ biến hơn nấm và chỉ được tìm thấy trên bề mặt gỗ trong các môi trường cụ thể như nước, độ ẩm bão hòa hoặc giai đoạn phân hủy gỗ giữa và cuối [111]. Ngoài ra, nghiên cứu của Buchner và cộng sự đã chỉ ra sự phát triển của nấm (ngành Basidiomycota và Ascomycota), xạ khuẩn Actinomycetes và vi khuẩn Eubacteria trên các bề mặt gỗ bị phong hóa tự nhiên [112]. Trong nghiên cứu của Anna M. Kielak và cộng sự (2016) về sự tương tác giữa cộng đồng vi khuẩn và nấm trong các giai đoạn phân hủy gỗ thông cũng đã đưa ra kết quả về sự phong phú của khu hệ nấm cao hơn so với khu hệ vi khuẩn [111].

Trong khu hệ vi khuẩn và cổ khuẩn trên hòm gỗ phân hủy, Acidobacteria và Proteobacteria chiếm một tỷ lệ lớn. Tương tự với kết quả nghiên cứu này, kết quả nghiên cứu metagenomic đối với các mẫu gỗ bị phân hủy tại rừng tự nhiên Bialowieza chứng minh rằng Acidobacteria và Proteobacteria là 2 ngành có độ đa dạng lớn [113]. Tuy nhiên, Proteobacteria chiếm tỷ lệ cao nhất, khác biệt với khu hệ vi khuẩn trên hòm gỗ phân hủy. Với khu hệ vi khuẩn, chiếm ưu thế luôn là ngành Proteobacteria, cụ thể là Alpha-Proteobacteria và Gamma-Proteobacteria. Ở nghiên cứu về khu hệ vi sinh vật phân hủy dăm mảnh gỗ, Firmicutes và Proteobacteria đại diện cho khu hệ vi khuẩn phong phú nhất với tỷ lệ lần lượt là 45,9% và 32,3%, tiếp theo là Bacteroidetes (9,9%) [113].

### 3.1.2. Phân tích đa dạng khu hệ nấm trên hòm gỗ

Sau khi phân tích khu hệ vi sinh vật có trong mẫu thu thập trên bề mặt hòm gỗ, khu hệ nấm được phân tích và kết quả thể hiện ở Hình 3.2. Ngành Ascomycota là ngành nấm chiếm ưu thế (30,19%) trên bề mặt hòm gỗ, trong đó lớp lớn nhất là Dothideomycetes. Lớp này chiếm 20,05% tổng số đoạn đọc thu được và 58,5% số đoạn đọc được phân loại. Các lớp chiếm tỷ lệ thấp hơn là Leotiomyces, Saitoella (no class in NCBI), Sordariomyces, Eurotiomyces, Saccharomyces, Agaricomycetes và Tremellomyces. Ngoài ra, có tới 7,59% tổng số đoạn đọc không được phân loại trong ngành Ascomycota. Các đoạn đọc không được phân loại thành chi trong lớp Dothideomycetes chiếm một số lượng lớn, chúng bao gồm 10,99% Dothideomycetes không được phân loại, 5,36% Mycosphaerellales không được phân loại và 2,23% cho các họ khác.

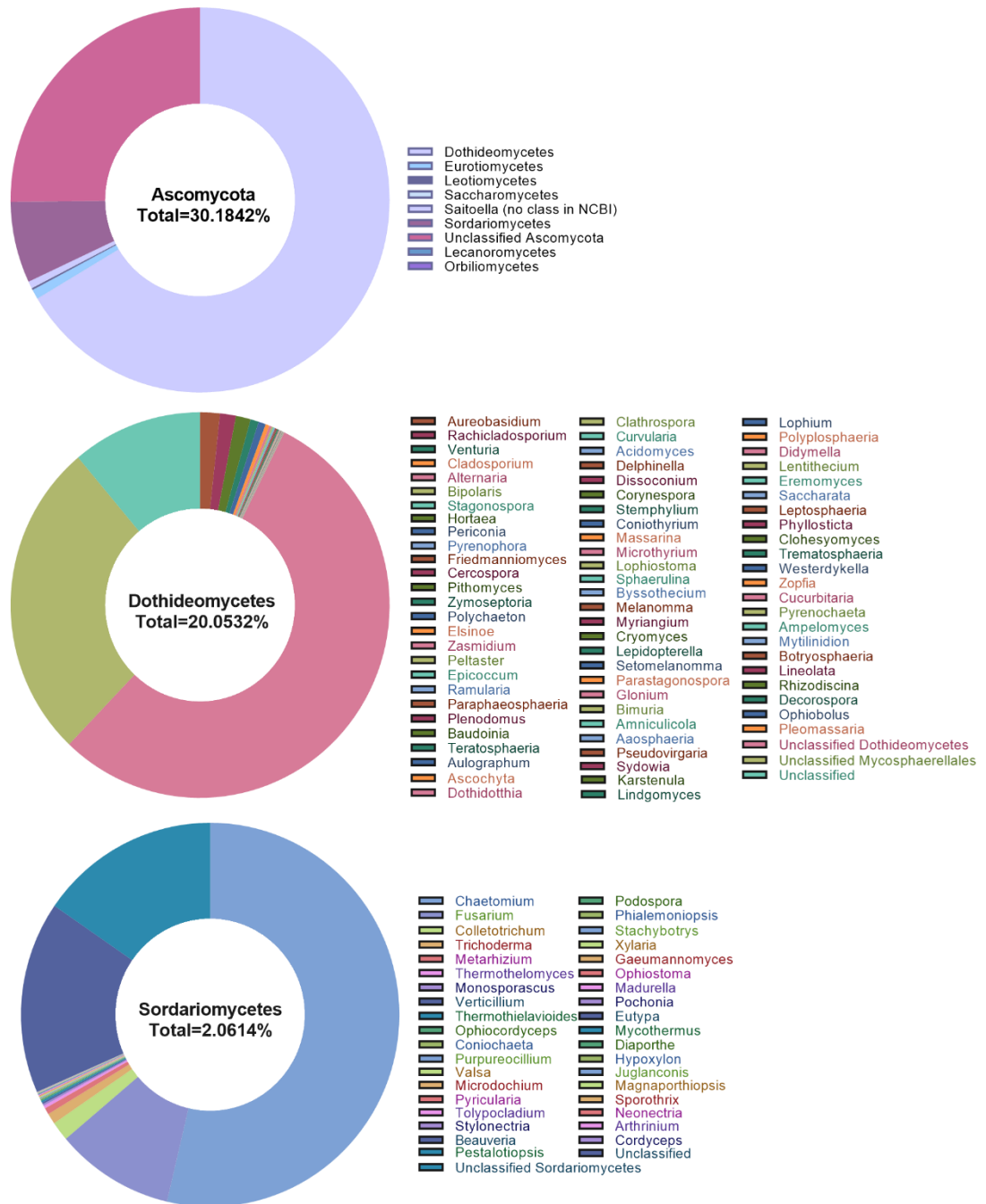
Trong lớp Dothideomycetes, các chi chiếm ưu thế là *Aureobasidium*, *Rachicladosporium*, *Hortaea*, *Venturia* và *Periconia*, đặc biệt chiếm tỉ lệ cao nhất thuộc về *Aureobasidium* với 0,33%. Lớp Sordariomyces gồm một số chi phổ biến

được tìm thấy trên vật liệu gỗ như *Chaetomium*, *Fusarium* và *Trichoderma* [114]. Với kết quả Hình 3.2 cho thấy trong lớp Sordariomycetes, *Chaetomium* (1,1%) là chi chiếm ưu thế nhất. *Chaetomium globosum* là một loài nấm nội sinh có khả năng phân hủy gỗ và các sản phẩm gỗ trong nhà và ngoài trời. Loài này cũng có khả năng sản xuất độc tố nấm mốc có thể gây dị ứng và các bệnh cơ hội [115, 116].

Theo El Bergadi, trên bề mặt vật liệu gỗ đã tìm thấy nhiều loài nấm bao gồm *Aspergillus ustus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Cladosporium tenuissimum*, *Chaetomium cf. subglobosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium westlingii*, *Alternaria sp.*, *Coniochaeta sp.*, *Trichoderma cf. longibrachiatum*,... trong đó các chi nấm phổ biến được tìm thấy là *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Penicillium* và *Trichoderma* [114]. So với kết quả giải trình tự metagenomic với mẫu nấm trên hòm gỗ này, cũng xuất hiện tất cả các chi nấm trên nhưng một số chi lại chiếm tỉ lệ rất nhỏ. Cụ thể là các chi *Fusarium* và *Trichoderma* tồn tại trong lớp Sordariomycetes, chỉ chiếm một tỷ lệ nhỏ lần lượt là 0,209% và 0,018%. Trong lớp Eurotiomycetes chiếm tỉ lệ rất thấp trong ngành Ascomycota cũng tìm được nhiều loài *Penicillium sp.* Bên cạnh đó, chi *Aspergillus* cũng chỉ chiếm 0,0427% và thậm chí không thể được phân loại ở cấp loài. Ngược lại, *Fusarium* đại diện cho tỷ lệ phần trăm tương đối cao với một số loài tìm được trong mẫu không qua phân lập như *F. clavum*, *F. coffeatum* và *F. flagelliforme*.

Trong nhà máy sản xuất đồ gỗ ở miền đông Ba Lan, hệ vi sinh vật trong không khí sau khi nghiên cứu cho thấy độ đa dạng thành phần loài của vi khuẩn cao hơn so với nấm men và nấm mốc, cụ thể đã tìm ra 28 loài vi khuẩn thuộc các chi *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium* với tỷ lệ 18,1% - 50% cùng 12 loài nấm sợi thuộc các chi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Absidia* và nấm men với tỷ lệ 6,2% - 54,4% [117].

Như vậy có thể thấy, ở các điều kiện địa lý khác nhau sẽ có hệ vi sinh vật khác nhau, kéo theo sự tác động của hệ vi sinh vật lên các sản phẩm gỗ cũng có sự khác biệt tương ứng. Chưa hết, các sản phẩm gỗ có nguồn gốc từ các loại gỗ khác nhau cũng thay đổi đến các tác nhân vi sinh vật [118].



**Hình 3.2.** Sơ đồ phân loại của các nhóm ưu thế ở ngành Ascomycota (A); Lớp Dothideomycetes (B); Lớp Sordariomycetes (C).

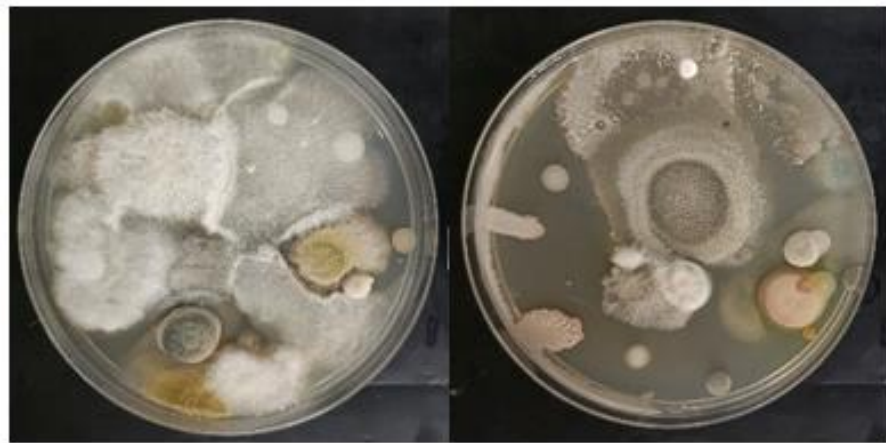
**3.2. Phân lập và đánh giá sự phân bố các chủng nấm trên bề mặt hòm gỗ bằng giải trình tự gen ITS.**

**3.2.1. Phân lập các chủng nấm trên bề mặt hòm gỗ**

Các mẫu tấm bông thu thập tại 20 vị trí lấy mẫu nấm mốc trên các bề mặt hòm gỗ trong kho lưu, thực hiện ly tâm và vortex với dung dịch đệm để chuẩn bị dịch gốc rồi trang trên bề mặt môi trường Czapek-Dox. Phương pháp này đảm bảo sự phân bố

đồng đều các chủng loài nấm trên bề mặt cơ chất. Hơn nữa, cũng đảm bảo giảm thiểu sự xốt dính nấm trên tấm bông nếu phết trực tiếp tấm bông trên đĩa môi trường.

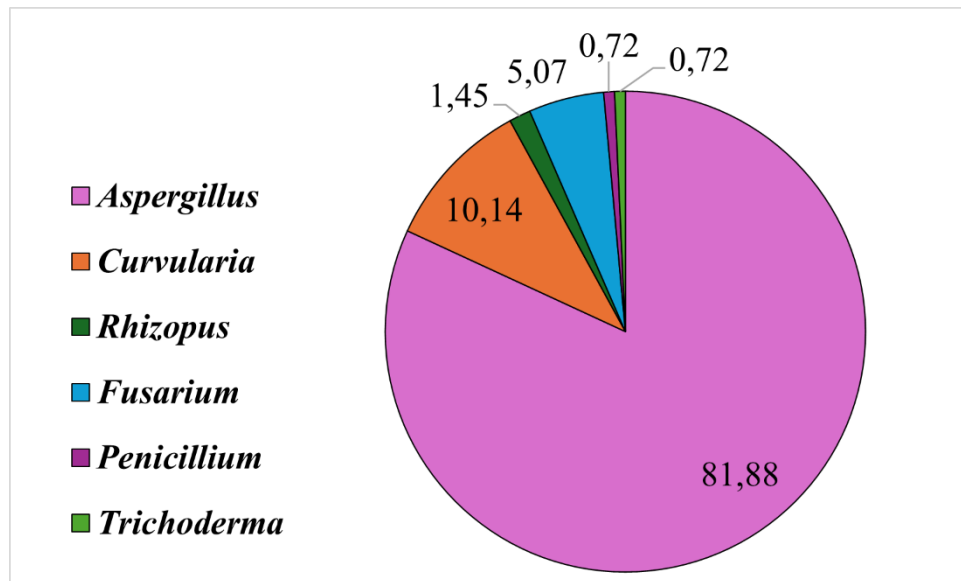
Sau 4 -5 ngày nuôi tủ ẩm, các đĩa phân lập ban đầu có sự xuất hiện đa dạng hình thái khuẩn lạc trên cùng một đĩa. Ta có thể quan sát thấy rõ sự sinh trưởng độc lập hay sự ức chế nhau giữa các chủng nấm; độ phát triển nhanh hay chậm; dạng mọc phủ lan bề mặt (sinh trưởng ngang) hay dạng đâm sâu trong lòng cơ chất (sinh trưởng dọc), trong đó thường thấy những chủng loài sinh trưởng ngang sẽ dễ ức chế sự sinh trưởng của các chủng khác, đặc biệt là những chủng có tốc độ mọc nhanh, bởi sự chiếm không gian cũng như sự hấp thụ dinh dưỡng từ môi trường. Bởi vậy mà trên nhiều đĩa thấy rõ hiện tượng mọc đè nhau, chồng chéo, một số mẫu đĩa phân lập điển hình thể hiện ở Hình 3.3.



**Hình 3.3.** Một số mẫu đĩa phân lập nấm mốc trên môi trường Czapek – Dox sau 5 ngày nuôi cấy

Từ 27 đĩa phân lập tương ứng từ 20 mẫu nấm thu thập, các chủng nấm được kiểm đếm để thống kê mật độ chủng bằng việc quan sát hình thái khuẩn lạc như hệ sợi, màu sắc, dạng viền, độ bông xốp, sự tiết sắc tố và tạo giọt tiết cùng với đặc điểm tế bào như hình dạng cuống sinh, vách ngăn, bong, bào tử và vỏ bào tử, dựa theo khóa phân loại của tác giả Miên (2015) [119]. Kết quả phân lập được tất cả 13 chủng nấm sợi thuộc sáu chi, bao gồm *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Penicillium* và *Trichoderma*, kết quả tương ứng với phương pháp metagenomics. Mật độ các chủng nấm phân lập được từ bề mặt các hòm gỗ được thể hiện ở Hình 3.4 và chi tiết mô tả đặc điểm từng chủng được thể hiện ở Bảng 3.1.






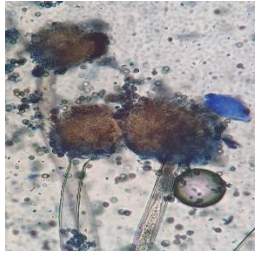
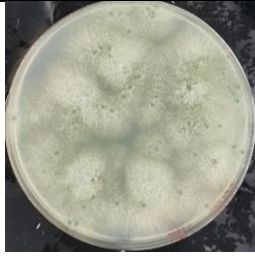
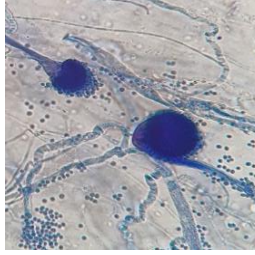
**Hình 3.4.** Thành phần (%) các chủng thuộc chi nấm mốc phân lập từ hòm gỗ tại Đồng Nai

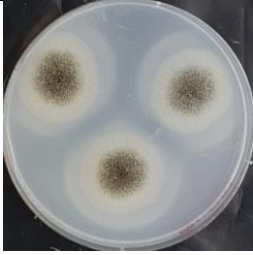
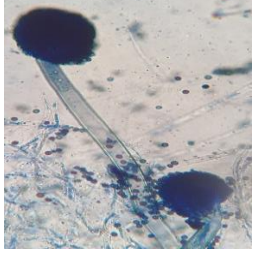

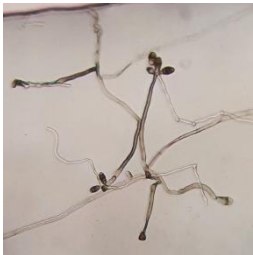
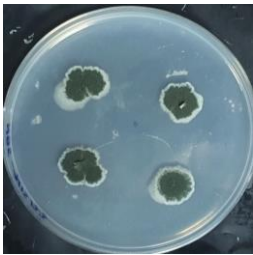
Từ Hình 3.4 cho thấy nhóm nấm *Aspergillus* chiếm ưu thế nhất với mật độ 81,88% và đứng thứ hai là chi *Curvularia* với tỷ lệ 10,14%. Qua quan sát đặc điểm hình thái khuẩn lạc và soi hình dạng tế bào qua kính hiển vi, có tất cả 6 chủng thuộc chi *Aspergillus* bao gồm các chủng TS1, TS5, TS6, TĐ5, TĐ11.1, TĐ12.1 và TĐ12.2. Trong số đó, chủng TS6 là chủng không những chiếm mật độ cao nhất trong nhóm *Aspergillus* mà còn là chủng chiếm ưu thế nhất trong tổng số 13 chủng phân lập được. Qua đây có thể thấy nhóm nấm *Aspergillus* không chỉ chiếm ưu thế về số lượng mà còn cả về sự đa dạng thành phần loài. Ngoài ra, các chủng thuộc chi *Curvularia* bao gồm chủng TĐ7 và TĐ4.2. Riêng các chủng còn lại gồm 4 chủng TĐ12.3, TS10.1, TĐ6.1 và TĐ6.2 lần lượt tương ứng với 4 chi khác nhau là *Penicillium*, *Trichoderma*, *Rhizopus* và *Fusarium*. Đây cũng là 4 chi chiếm tỷ lệ thấp nhất lần lượt là 0,72%, 0,72%, 1,45% và 5,07%. Kết quả này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu của Hồ Bảo Thủy Quyên và cộng sự (2018) về nấm phân hủy gỗ trong điều kiện khu vực rừng Đồng Nai, trong 63 chủng được phân lập và định danh, nhóm nấm *Aspergillus* (55%) và *Penicillium* (36%) chiếm ưu thế so với 2 chi còn lại là *Curvularia* và *Trichoderma*. Tuy nhiên, thành phần loài của chi *Penicillium* lại đa dạng hơn chi *Aspergillus* (chỉ có 2 nhóm là *A. flavus* và *A. niger* [88]).

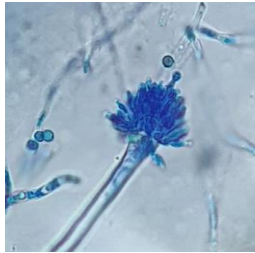
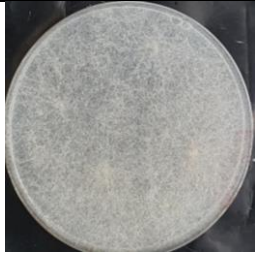
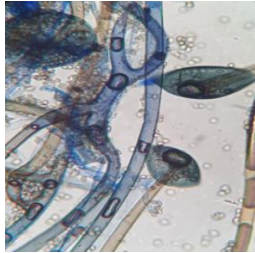
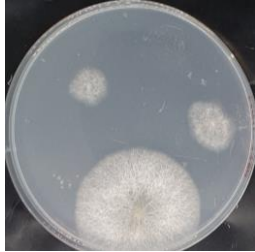
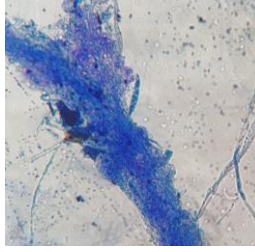

Nghiên cứu của Fukasawa (2011) chỉ ra rằng các loài nấm thuộc Basidiomycota, Ascomycota và Zygomycota được phân lập từ các mảnh vụn gỗ mục nát, trong đó năm loài *Bjerkandera adusta*, *Mycena haematopus*, *Omphalotus guepiniformis*, *Trametes hirsuta*, *Trametes versicol* (Basidiomycota) gây ra mức độ

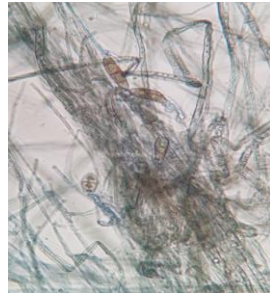
phân hủy cao nhất, tiếp theo là bốn loài *Scytalidium lignicola*, *Trichoderma hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningi* (Ascomycota) và cuối cùng là Zygomycota [22].

**Bảng 3.1.** Đặc điểm hình thái và phân loại các chủng nấm sợi phân lập từ mẫu gỗ thu thập tại Đồng Nai

STT	Ký hiệu chủng	Hình ảnh khuẩn lạc và bào tử	Mô tả đặc điểm	Phân loại tới chi
1	TS1		<p>Hệ sợi trắng dính bào tử đen, tâm đen dày bào tử đến hệ sợi trắng dày bông xơ, viền ngoài cùng trắng trong hơn và bông mịn.</p>	<i>Aspergillus</i>
			<p>Cuống sinh bào tử không màu, vách nhẵn. Bọng cầu hay gân cầu. Khắp bề mặt đính nhiều thể bình 2 lớp: lớp 1 hình tam giác ngược, lớp 2 hình chai. Bào tử tròn, gai xù xì, đen xám.</p>	
2	TS6		<p>Khuẩn lạc xanh rêu, viền trắng. Bề mặt bông nhẹ. Có tạo sắc tố xanh ra môi trường.</p>	<i>Aspergillus</i>
			<p>Hệ sợi có vách ngăn. Cuống sinh bào tử vách dày, có gai nhám. Bọng hình chùy ngắn. Thể bình 1 lớp hình chai mọc chiếm toàn bộ bề mặt bọng. Bào tử hình cầu, vách dày và có gai.</p>	

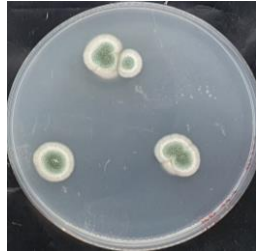
3	TS5		<p>Khuẩn lạc dạng bột, thành vành đồng tâm, tâm màu đen hơi nâu, viền ngoài màu trắng đục.</p>	<i>Aspergillus</i>
			<p>Hệ sợi có vách ngăn. Cuống sinh vách nhẵn, dày, màu nâu. Bọng hình cầu hay gần cầu, khắp bề mặt mọc thể bình 2 lớp: lớp 1 hình tam giác ngược, lớp 2 hình chai. Bào tử tròn, gai, đen, vách dày.</p>	
4	TĐ4.2		<p>Khuẩn lạc mọc tỏa tròn, thành vành đồng tâm. Tâm đen nâu, hệ sợi nâu olive. Bề mặt dạng nhung mịn.</p>	<i>Curvularia</i>
			<p>Hệ sợi có vách ngăn. Cuống hầu như không phân nhánh. Bào tử mọc tập trung đa số ở đầu cuống. Bào tử hình gỏi, hình chùy hay oval, 2 đầu thuôn tròn, có 2-3 tế bào ngăn nhau bởi vách ngăn.</p>	
5	TĐ5		<p>Khuẩn lạc dạng tỏa tròn, màu vàng rêu đến viền trắng thưa. Bề mặt khuẩn lạc dạng bột. Có tạo sắc tố xanh ra môi trường.</p>	<i>Aspergillus</i>

			Cuống sinh bào tử nhân hoặc có mụn com. Bọng gần cầu hoặc chùy ngắn. khắp bề mặt bọng là thể bình 2 lớp: lớp 1 hình con quay, lớp 2 hình elip. Bào tử hình cầu, có gai.
6	TĐ6.1		Khuẩn lạc dạng lan rộng phủ kín bề mặt môi trường, sợi màu trắng khá bông xốp, đỉnh bào tử màu đen dạng bụi lấm tấm.
			Cuống sinh phân nhánh, không vách ngăn, màu nâu. Nang bào tử hình cầu, nứt rách. Lõi dạng mũ nấm mở. bào tử nang có sọc, hình cầu hay gần cầu.
7	TĐ6.2		Khuẩn lạc dạng tỏa tròn, vành đồng tâm, tâm vàng nhạt, rìa mép hơi thưa. Phần hệ sợi ghi trắng dày ở tâm, thưa ở mép, phân vành rõ và bông xơ.
			Sợi mọc thành bó, tế bào màng dày ít, nâu sẫm, thành chuỗi hoặc đơn độc, ở đầu hoặc giữa. Đại bào tử đa số cong, dài, có tế bào gót. Tiêu bào tử hình quả lê.
8	TĐ7		Khuẩn lạc phân vành, tâm ghi xám, vành ngoài nhạt hơn. Bề mặt khuẩn lạc bông xốp.

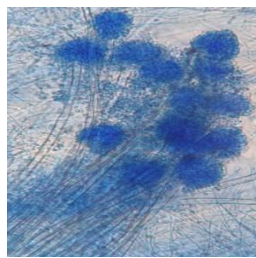


Hệ sợi có vách ngăn. Cuống hầu như không phân nhánh. Bào tử mọc tập trung đa số ở đầu cuống. Bào tử hình hình chùy, 2 đầu thuôn tròn, có 3-4 tế bào ngăn nhau bởi vách ngăn.

9 TĐ11.1

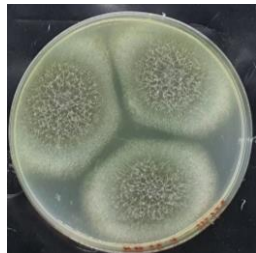


Khuẩn lạc vành đồng tâm, *Aspergillus* màu xanh rêu, viền trắng phân vành. Mặt trái màu vàng nâu nhạt. Bề mặt dạng bột hoặc xốp nhẹ. Có tạo sắc tố xanh ra môi trường.

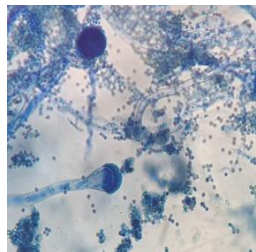


Hệ sợi có vách ngăn. Cuống sinh bào tử không phân nhánh, dài, thành dày. Bọng hình chùy,  $\frac{3}{4}$  bề mặt đỉnh lớp thể bình hình chai. Bào tử dạng cầu, có gai.

10 TĐ12.1

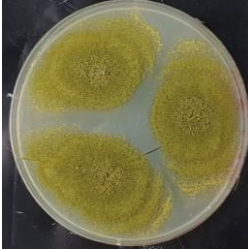
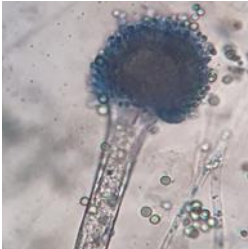
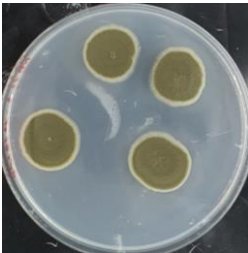
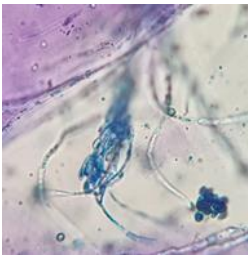



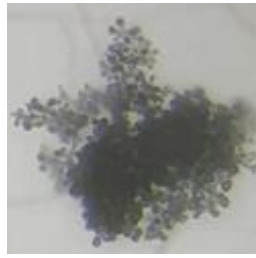
Khuẩn lạc dạng tỏa tròn, *Aspergillus* vòng tâm mọc dày các sợi màu xanh rêu chuyển dần sang trắng, viền trắng dày và xơ. Bề mặt nhung mịn. Có tạo sắc tố xanh ra môi trường.



Hệ sợi có vách ngăn. Cuống sinh bào tử không phân nhánh, dài, hơi xù xì, thành dày. Bọng hình chùy,  $\frac{3}{4}$  bề mặt đỉnh lớp thể bình hình chai. Bào tử dạng cầu, có gai xù xì.



11	TĐ12.2		<p>Khuẩn lạc dạng tủa tròn, <i>Aspergillus</i> phân vành, vòng màu vàng rêu đậm nhạt xem kẽ. Bề mặt khuẩn lạc dạng bột hoặc xốp nhẹ.</p>
			<p>Hệ sợi có vách ngăn. Cuống sinh bào tử không màu, vách xù xì. Khắp bề mặt bong là thể bình 1 lớp, nhiều loại 2 lớp: lớp 1 hình tam giác ngược, lớp 2 hình chai. Bào tử cầu hoặc oval, vách dày, có gai rõ.</p>
12	TĐ12.3		<p>Khuẩn lạc dạng tủa tròn, <i>Penicillium</i> phân màu theo vành khăn, vòng màu xanh vàng rêu đậm nhạt xen kẽ, viền ngoài cùng trắng mịn và thưa. Mặt trái màu vàng. Bề mặt dạng bột hoặc xốp nhẹ.</p>
			<p>Chồi mọc từ cơ chất hoặc cuống chính, 1-2 tầng. Cuống nhỏ mọc 2-5 cái trên 1 chồi. Thể bình hình chai cổ thuôn, 3-6 cái trên 1 cuống nhỏ. Bào tử cầu hoặc elip, vách dày, có gai.</p>
13	TS10.1		<p>Khuẩn lạc dạng tủa tròn, <i>Trichoderma</i> tâm đen xám đậm, viền màu trắng xám và dày. Bề mặt khuẩn lạc khá bông và xơ.</p>



Hệ sợi có vách ngăn, nhẵn, phân nhánh, trong suốt. Cuống phân nhánh dạng tháp. Thể bình hình chai, 1-3 cái trên 1 nhánh nhỏ. Bào tử gần cầu hoặc elip, nhẵn.

Gỗ thông, một loại gỗ công nghiệp phổ biến, được ứng dụng rộng rãi trong sản xuất hộp lưu trữ, thùng chứa và pallet. Để đảm bảo độ bền và ngăn ngừa sự tấn công của nấm mốc và côn trùng, gỗ thông thường trải qua nhiều phương pháp xử lý khác nhau trước khi được chế tác thành sản phẩm hoàn chỉnh [120]. Tuy nhiên, những thùng chứa bằng gỗ này thường bị đổi màu hoặc xuất hiện những vết ó xanh, gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến tính thẩm mỹ, chất lượng sản phẩm lưu trữ, khả năng sử dụng và thậm chí gây mục nát vật liệu gỗ. Sự đổi màu này chủ yếu do vi sinh vật gây ra, trong đó các chi nấm mốc phổ biến bao gồm *Aspergillus*, *Penicillium* và *Fusarium* [121]. Nghiên cứu đã chỉ ra rằng các chi nấm này thuộc nhóm nấm phân hủy gỗ, gây ra hiện tượng thối mềm [122].

Các chi nấm này cũng đã được xác định trong các mẫu vi sinh vật lấy từ bề mặt hộp gỗ thông lưu trữ trong nghiên cứu này. Trong số 13 chủng nấm phân lập, chúng được phân loại thành 6 chi nấm sợi thuộc ngành Ascomycota. So sánh với cấu trúc quần xã vi sinh vật thu được thông qua phương pháp metagenomics shotgun đã cho thấy những khác biệt đáng kể giữa hai phương pháp nuôi cấy và không qua nuôi cấy này. Các chi *Fusarium*, *Trichoderma*, *Aspergillus* và *Curvularia* đều có mặt trong các mẫu nghiên cứu; tuy nhiên, tỷ lệ nhận dạng của chúng khác nhau đáng kể. Mặc dù, *Aspergillus* là chi chiếm ưu thế, có sự đa dạng thành phần loài nhất với 7 trong số 13 chủng phân lập thuộc chi này, nhưng kết quả phân tích metagenomics cho thấy nhóm này chỉ chiếm tỉ lệ nhỏ trong quần xã nấm và không được phân loại cấp loài. Ngược lại, metagenomics đưa ra *Fusarium* đại diện cho tỷ lệ phần trăm tương đối cao gấp 5 lần *Aspergillus*, tuy nhiên tỉ lệ phân lập lại thấp nhất trong số 13 chủng. Tương tự với *Rhizopus* được phân lập từ các mẫu sinh học từ bề mặt gỗ, nhưng nó không được phát hiện trong dữ liệu trình tự thu được. Điển hình với loài *Chaetomium globosum*, một chủng chiếm ưu thế nhất trong quần xã nấm sau khi giải trình tự nhưng lại không xuất hiện trên các mẫu đĩa phân lập. Các kết quả trên đã bổ sung dữ liệu khẳng định tính ưu việt của phương pháp metagenomics cũng như những hạn chế tồn tại của phương pháp phân lập truyền thống.

### 3.2.2. Định danh và đánh giá sự phân bố của các chủng nấm gây hại

Tất cả 13 chủng phân lập đã được phân loại qua quan sát quá trình phát triển trên môi trường cơ chất chọn lọc, dựa trên đặc điểm hình thái để định danh sơ cấp đến cấp chi. Ngoài ra, chúng tôi tiến hành áp dụng phương pháp sinh học phân tử đọc trình tự gen vùng ITS để phân loại các chủng phân lập đến cấp loài. Trình tự gen ITS của 13 chủng nấm mốc được trình bày trong Phụ lục.

Kết quả khớp tốt nhất với mức độ nhận dạng cao nhất (>98%) sau khi căn chỉnh 13 trình tự ITS so sánh với trình tự các loài nấm đã công bố trên cơ sở dữ liệu GenBank được trình bày chi tiết trong Bảng 3.2. Mỗi quan hệ phát sinh loài dựa trên trình tự ITS của các chủng nấm phân lập được thể hiện trong Hình 3.5.

Kết quả Bảng 3.2 cho thấy trong số 13 chủng được định danh, có 7 chủng có vùng trình tự gen mã hóa ITS tương đồng với các loài thuộc chi *Aspergillus*, một chi chiếm ưu thế trong số các loại nấm có thể nuôi cấy trên bề mặt hộp gỗ. Bảy chủng thuộc 6 loài *Aspergillus*, có thể thấy sự đa dạng chi này trong môi trường phân lập, chúng được nhóm lại với nhau thành một nhóm lớn riêng, chứng tỏ chúng có quan hệ họ hàng gần. Tuy nhiên, cũng có sự phân nhánh rõ ràng giữa các loài khác nhau trong chi này, ví dụ như *A. sydowii* tách biệt với nhóm *A. flavus*, *A. fumigatus* và *A. awamori*.

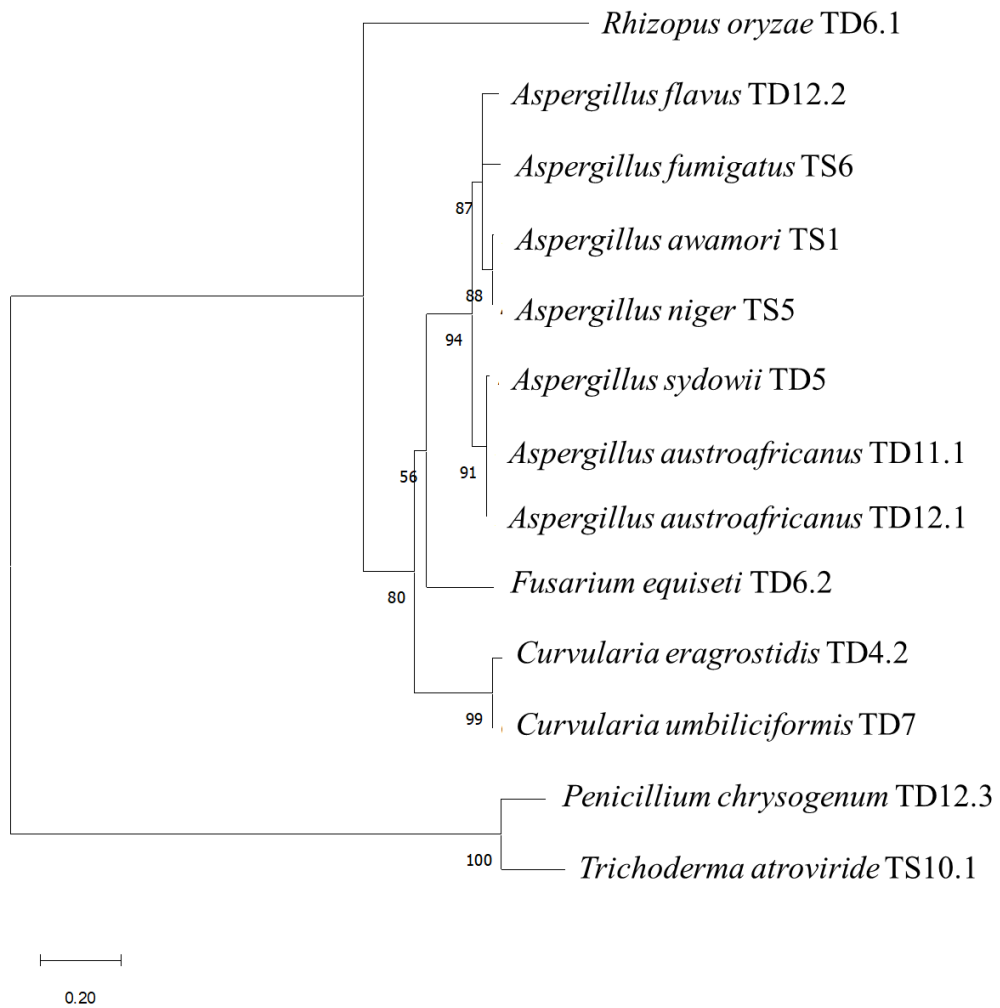
**Bảng 3.2.** So sánh các chủng nấm sợi phân lập với các chủng đại diện trên Genbank

STT	Ký hiệu chủng	Mã số GenBank	Tên loài tương đồng	Độ tương đồng (%)
1	TS1	OR939719.1	<i>Aspergillus awamori</i>	100
2	TS6	OR939721.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99.88
3	TS5	OR135784.1	<i>Aspergillus niger</i>	99.51
4	TĐ4.2	OR135782.1	<i>Curvularia eragrostidis</i>	100
5	TĐ5	OR135783.1	<i>Aspergillus sydowii</i>	99,88
6	TĐ6.1	OR939711.1	<i>Rhizopus oryzae</i>	100
7	TĐ6.2	OR939712.1	<i>Fusarium equiseti</i>	100
8	TĐ7	OR939713.1	<i>Curvularia umbiliciformis</i>	100
9	TĐ11.1	OR939715.1	<i>Aspergillus austroafricanus</i>	100
10	TĐ12.1	OR939716.1	<i>Aspergillus austroafricanus</i>	100
11	TĐ12.2	OR939717.1	<i>Aspergillus flavus</i>	100
12	TĐ12.3	OR939718.1	<i>Penicillium chrysogenum</i>	100
13	TS10.1	OR939722.1	<i>Trichoderma atroviride</i>	99,89



Bên cạnh đó, có 2 chủng thuộc chi *Curvularia* và 4 chủng còn lại thuộc 5 chi khác nhau *Rhizopus*, *Fusarium*, *Penicillium* và *Trichoderma*. Hai loài *Curvularia* (*C. eragrostidis* và *C. umbiliciformis*) tạo thành một nhánh riêng biệt, thể hiện mối quan hệ họ hàng gần hơn so với các loài khác trong sơ đồ. Bốn chi còn lại xuất hiện riêng lẻ hoặc theo cặp, cho thấy sự đa dạng về nguồn gốc tiến hóa của các loài nấm trên bề mặt hộp gỗ. *Trichoderma atroviride* nằm ở nhánh xa nhất, cho thấy nó có quan hệ họ hàng xa nhất với các loài khác trong nghiên cứu. Sơ đồ này cung cấp thông tin về mối quan hệ tiến hóa giữa các loài nấm, giúp hiểu rõ hơn về sự đa dạng và tiến hóa của chúng trong môi trường cụ thể. Điều này cũng có thể hữu ích trong việc xác định các loài nấm mới hoặc nghiên cứu về khả năng sản xuất enzyme của chúng.

Sơ đồ thể hiện ở Hình 3.5 cho thấy sự đa dạng về loài nấm trên bề mặt hộp gỗ, bao gồm cả các chi thường gặp như *Aspergillus* và các chi ít gặp hơn như *Rhizopus* và *Trichoderma*. Điều này phản ánh sự phức tạp của quần xã nấm trong môi trường này. Sự hiện diện của nhiều loài nấm khác nhau cho thấy khả năng thích nghi của chúng với môi trường trên bề mặt hộp gỗ, có thể bao gồm khả năng sử dụng các nguồn dinh dưỡng khác nhau và chịu đựng các điều kiện môi trường khắc nghiệt.



**Hình 3.5.** Mối quan hệ phát sinh gen giữa các loài nấm phân lập từ bề mặt hòm gỗ. Số trong nhánh biểu thị giá trị Bootstrap 1000 với thanh tỷ lệ 0,02

Sự chiếm ưu thế của chi *Aspergillus* có thể liên quan đến khả năng sinh bào tử, tốc độ phát triển, sự phát tán rộng của chúng, cũng như khả năng sử dụng nhiều loại cơ chất khác nhau [14].

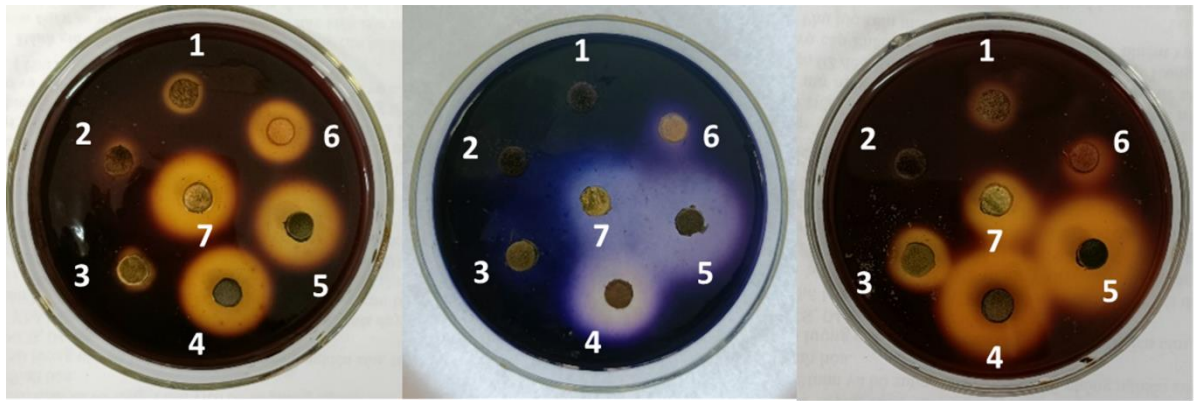
### 3.3. Đánh giá các đặc tính gây hại của một số chủng nấm điển hình

Động vật nguyên sinh, nấm và vi khuẩn là 3 nhóm chính tham gia vào quá trình phân hủy xác thực vật để thực hiện chu trình carbon trong tự nhiên, trong đó nấm là nhóm vi sinh vật đầu tiên tấn công xác thực vật, chúng phân hủy thành phần khó phân hủy nhất của xác thực vật là lignin thành những vật liệu nhỏ hơn, giúp vi khuẩn và xạ khuẩn có thể sử dụng những vật liệu đó, hoặc sự phá vỡ cấu trúc lignin của nấm giúp vi khuẩn, xạ khuẩn dễ dàng tấn công vào các thành phần cấu trúc bên trong xác thực vật (cellulose và hemicellulose). Vì vậy, nấm phân hủy cellulose, đóng vai trò quan trọng trong vòng tuần hoàn chất dinh dưỡng.

Đặc tính gây hại lên gỗ của các chủng nấm sợi được đánh giá dựa trên thử nghiệm khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào khi cấy nấm trên các môi trường chọn lọc. Để phát triển và duy trì sự sinh trưởng trên bề mặt vật liệu gỗ, nấm sợi đã sinh tổng hợp các loại enzyme, mỗi loại enzyme sẽ có khả năng thủy phân một loại hay một nhóm thành phần có trong gỗ thành các phần tử có cấu tạo phân tử đơn giản hơn, trở thành một nguồn dinh dưỡng cho nấm sử dụng để sinh trưởng và tiếp tục tổng hợp enzyme.

Với các thành phần chính trong gỗ gồm cellulose, lignin và thành phần phụ có tinh bột, 3 loại enzyme có khả năng thủy phân tương ứng là cellulase, laccase và amylase. Để tìm hiểu khả năng phân huỷ của các chủng nấm, chúng tôi đã tiến hành sàng lọc khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng nấm phân lập tương ứng trên 3 loại cơ chất CMC, guaiacol và tinh bột bằng các phương pháp sàng lọc trên đĩa thạch và đo vòng phân giải cơ chất của chúng. Hình 3.6 minh họa đại diện cho các mẫu thử nghiệm hoạt tính enzyme và các chỉ số đường kính vòng phân giải được thể hiện trong Hình 3.7.

Với thử nghiệm trên 3 loại cơ chất CMC, tinh bột và guaiacol, kết quả thu được cho thấy các mức độ khác nhau ở khả năng sinh tổng hợp 3 loại enzyme tương ứng cellulase, amylase và laccase của các chủng nấm phân lập được trên gỗ. Cụ thể có 11 chủng trong tổng số 13 chủng nấm phân lập là có hoạt tính sinh ít nhất 1 loại enzyme ngoại bào, trong đó cả 11 chủng đều có khả năng sinh cellulase, 5 chủng có khả năng sinh amylase và 8 chủng có khả năng sinh laccase. Đặc biệt, chủng *Curvularia eragrostidis* TĐ4.2 và *Aspergillus sydowii* TĐ5 là hai chủng có khả năng sinh được cả 3 loại enzyme ngoại bào. Đồng thời với vòng thủy phân của mỗi loại enzyme ngoại bào cellulase, amylase và laccase trên đĩa môi trường cho thấy, hai chủng này đều có khả năng sinh tổng hợp enzyme ở mức cao hơn các chủng nấm phân lập. Như vậy có thể thấy hoạt tính sinh các enzyme của *Curvularia eragrostidis* TĐ4.2 và *Aspergillus sydowii* TĐ5 cao hơn so với các chủng còn lại.



Cellulase

Amylase

Laccase

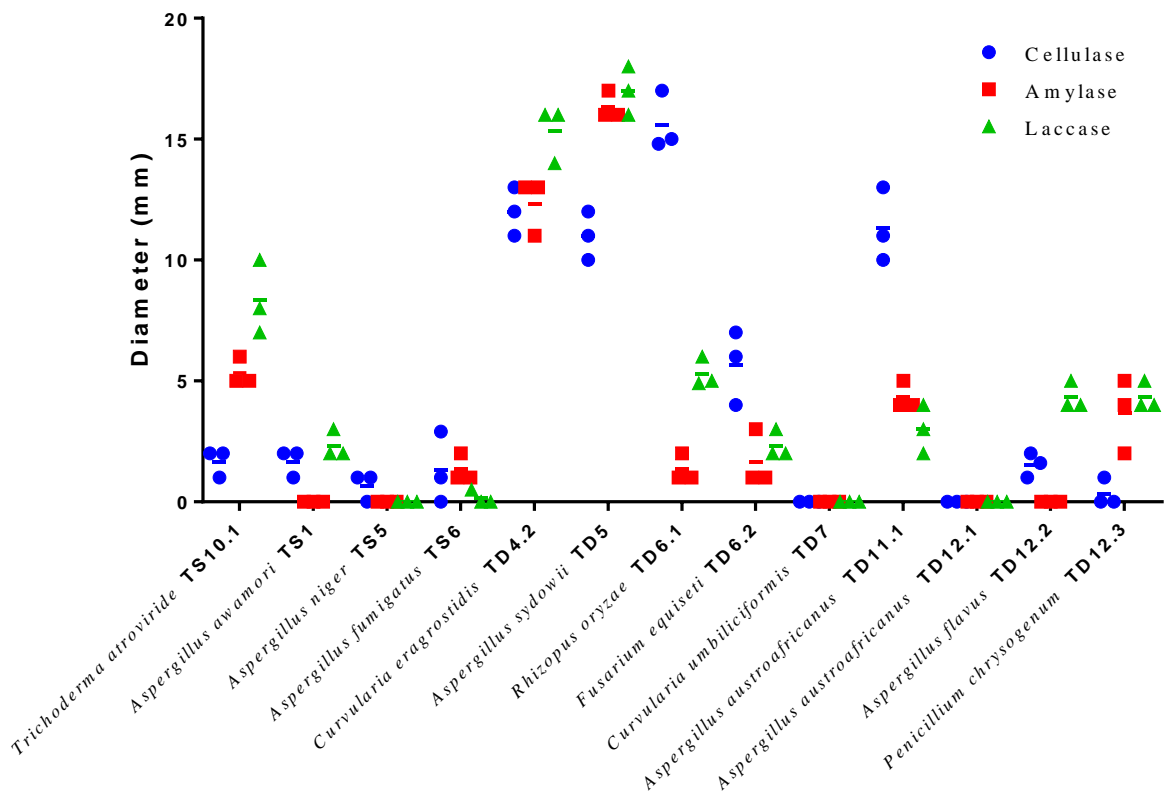
**Hình 3.6.** Các đĩa thử nghiệm hoạt động của enzyme. Các vị trí trên đĩa: 1) *Aspergillus awamori* TS1; 2) *Aspergillus niger* TS5; 3) *Penicillium chrysogenum* TĐ12.3; 4) *Curvularia eragrostidis* TĐ4.2; 5) *Aspergillus sydowii* TĐ5; 6) *Fusarium equiseti* TĐ6.2; 7) *Aspergillus austroafricanus* TĐ11.1.

Ngoài ra, có hai chủng *Aspergillus austroafricanus* TĐ11.1 và *Rhizopus oryzae* TĐ6.1 là những chủng sản xuất lượng enzyme cellulase cao hơn đáng kể so với 11 chủng còn lại, đặc biệt là chủng TĐ6.1 có hoạt tính sinh cellulase cao nhất trong tất cả các chủng nấm phân lập. Tuy nhiên, lượng cellulase tiết ra có sự chênh lệch khá lớn so với amylase và laccase ở cả 2 chủng này. Như vậy, hoạt tính sinh 3 loại enzyme ở hai chủng nấm TĐ11.1 và TĐ6.1 không được đồng đều như 2 chủng *Curvularia eragrostidis* TĐ4.2 và *Aspergillus sydowii* TĐ5. Điều đó cũng tương tự với chủng *Trichoderma atroviride* TS10.1 khi hoạt tính amylase và laccase nhiều hơn hẳn cellulase và đường kính vòng phân giải cellulose của chủng này không được xác định rõ.

Trong số 13 chủng phân lập được, có hai chủng *Curvularia umbiliciformis* TĐ7 và *Aspergillus austroafricanus* TĐ12.1, đây là những chủng cho kết quả quan sát thấy không xuất hiện hoặc không rõ vòng phân giải cơ chất bởi enzyme ngoại bào.

Khả năng sinh tổng hợp enzyme có sự khác nhau không chỉ giữa các chi, mà trong cùng một chi cũng có sự khác biệt rõ rệt (*Curvularia eragrostidis* TĐ4.2 và *Curvularia umbiliciformis* TĐ7) hay sự khác biệt trong cùng một loài (*Aspergillus austroafricanus* TĐ11.1 và *Aspergillus austroafricanus* TĐ12.1). Một trường hợp tương tự cũng cho thấy khả năng sản xuất enzyme trong các điều kiện khảo sát phụ thuộc vào đặc tính từng chủng cụ thể, đó là các chủng *Aspergillus*; *Aspergillus sydowii* TĐ5 thể hiện hoạt tính cao trên cả ba loại enzym, trong khi các chủng khác

của chi này không cho thấy hoạt tính enzyme (*Aspergillus austroafricanus* TĐ12.1) hoặc hoạt tính rất thấp.



**Hình 3.7.** So sánh hoạt tính enzyme ngoại bào giữa các chủng nấm phân lập. Biểu đồ phân tán biểu thị giá trị đường kính vùng phân giải. ANOVA hai chiều với mức ý nghĩa  $p < 0,0001$

Trong thử nghiệm này, chủng *Aspergillus flavus* TĐ12.2 không phát hiện thấy có sự phân giải của enzyme amylase, còn khả năng phân giải của 2 loại enzyme cellulase và laccase thì khá thấp. Còn chủng *Aspergillus niger* TS5 thì không phát hiện ở cả 2 thử nghiệm enzyme amylase và laccase, cellulase thì kém hơn chủng TĐ12.2. Kết quả này cũng tương tự với thử nghiệm với mẫu nấm thu thập từ rừng Mã Đà (Đồng Nai) của Hồ Bảo Thủy Quyên và cộng sự (2018), 5 chủng thuộc loài *A. flavus* và 9 chủng loài *A. niger* thử nghiệm sinh tổng hợp cellulose trên cơ chất CMC đều cho thấy có sự phát triển trên môi trường này nhưng không tạo được vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc [88]. Mặt khác, các chủng này đều có khả năng sản xuất enzyme cellulose nhưng hoạt tính enzyme không cao. Hơn nữa, hoạt tính enzyme của các chủng cũng khác nhau dù thuộc cùng một chi hay loài, điều này được chứng minh trong thử nghiệm của Hồ Bảo Thủy Quyên với nhóm nấm *Penicillium*, cụ thể trong 14 chủng nấm thuộc chi này chỉ có 4 chủng tạo được vòng phân giải với đường kính từ 0,6-2cm [88].

Về việc đánh giá hoạt tính enzyme ngoại bào laccase, nhóm nghiên cứu của Yomna K. Abdallah đã chứng minh chủng *Aspergillus sydowii* NYKA 510 phân lập được có hoạt tính enzyme laccase mạnh nhất (2.569 U/mL), vượt trội hơn hẳn 2 chủng còn lại là *Aspergillus niger* (0,323 U/mL) và *Penicillium chrysogenum* (0,115 U/mL) [104]. Với kết quả thí nghiệm tương đương, chủng *Aspergillus sydowii* TĐ5 phân lập từ hòm gỗ có hoạt tính enzyme cao nhất trong 13 chủng không chỉ ở enzyme laccase mà còn cả 2 enzyme còn lại cellulase và amylase. Dựa vào những kết quả thử nghiệm đánh giá hoạt tính enzyme ngoại bào, chủng nấm có hoạt tính enzyme mạnh nhất sẽ được lựa chọn cho các thử nghiệm ức chế nấm của một số hoạt chất kháng nấm.

### **3.4. Thử nghiệm khả năng ức chế nấm gây hại của một số chất diệt nấm**

Các chủng nấm sau khi phân lập, tinh sạch, định danh qua hình thái và trình tự gen ITS kèm theo thử nghiệm sinh hóa về khả năng phân giải của các enzyme ngoại bào, chủng *Aspergillus sydowii* TĐ5 đã được lựa chọn để thử nghiệm khả năng ức chế nấm sợi của một số hoạt chất kháng nấm. Có bốn hoạt chất bao gồm preventol, đồng sunphat,  $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde và chế phẩm AM-QS được đưa vào thử nghiệm với dải 6 nồng độ tại mỗi hoạt chất. Quá trình thử nghiệm bao gồm kiểm tra, quan sát tế bào dưới kính hiển vi điện tử và đo chiều dài nảy mầm kéo dài 48h, thu nhận kết quả tại các thời điểm 0h, 24h và 48h để so sánh quá trình nảy mầm của bào tử và tốc độ phát triển của sợi mầm dưới điều kiện nuôi có sự tác động ức chế của các hoạt chất. Từ đó tính toán thu nhận kết quả về khả năng kháng nấm của từng hoạt chất cũng như so sánh sự tương quan và hiệp đồng giữa các hoạt chất. Khả năng nảy mầm của nấm sợi được ghi nhận qua 3 kính trường tương ứng 3 vị trí khác nhau trên 1 ô lam kính lõm.

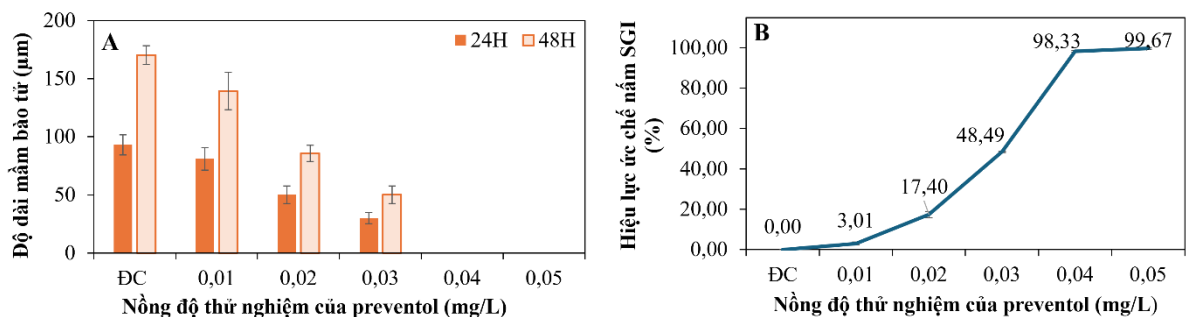
Sau quá trình thực nghiệm, các kết quả thu được cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa các mẫu thử nghiệm với hoạt chất với mẫu đối chứng không chứa hoạt chất cũng như có sự thay đổi rõ rệt về khả năng phát triển của nấm khi tăng dần các nồng độ của hoạt chất. Các mẫu tại thời điểm 0h được kiểm tra dưới kính hiển vi đã đảm bảo các bào tử không có sự nảy mầm trước đó, phân bố đều trong dịch nuôi và không kết dính thành nhóm quá dày để đảm bảo các bào tử được tiếp xúc đều với hoạt chất chứa trong môi trường thử nghiệm.

#### **3.4.1. Khả năng ức chế nấm sợi của Preventol**

Đối với mẫu đối chứng, môi trường dinh dưỡng là Czapek-Dox dạng lỏng và không chứa chất ức chế, kết quả sau 24h theo dõi cho thấy 100% các bào tử đều có sự nảy mầm. Độ dài sợi nấm quan sát đạt giá trị trung bình  $93,00 \pm 8,77 \mu\text{m}$  và tăng

gấp đôi sau 48h. Điều đó chứng tỏ bào tử nấm nảy mầm và phát triển bình thường trong điều kiện thí nghiệm.

Khi khảo sát khả năng ức chế sự nảy mầm của bào tử với thử nghiệm bằng preventol, các đồ thị ở Hình 3.8 thể hiện rõ xu hướng giảm dần độ dài mầm bào tử theo sự tăng hiệu lực ức chế nảy mầm khi tăng nồng độ preventol. Các hình ảnh trên kính hiển vi cho thấy sự giảm số lượng bào tử nảy mầm và độ dài mầm bào tử theo độ tăng nồng độ preventol (Bảng 3.3). Tại nồng độ 0,03 mg/L, tốc độ phát triển của mầm bào tử đã giảm đi khoảng 3 lần tại 2 thời điểm khảo sát so với mẫu đối chứng, đồng thời chỉ có 48,49% số bào tử có sự nảy mầm. Khi tăng thêm 0,01 mg/L preventol, gần như không có dấu hiệu nảy mầm của bào tử sau 48h quan sát. Như vậy đã xác định được giá trị MIC của preventol đối với nấm là 0,04 mg/L tương ứng với hiệu lực ức chế SGI đạt 98,33%. Kết quả này gần như là tương đồng khi so với dữ liệu của Luigia Sabatini và cộng sự với nồng độ ức chế tối thiểu đối với loài nấm *Aspegillus niger* dao động từ 0,25% – 0,5% [123].



**Hình 3.8.** Tác động của preventol lên sự nảy mầm của bào tử (A) và hiệu lực kháng nấm của preventol sau 48 giờ (B)

Theo Suzanne L Moore, khi 2-Phenylphenol ở dạng hợp chất muối Natri (Natri-orthophenyl-phenol), nồng độ ức chế tối thiểu điển hình tác động lên chủng nấm *Aspergillus niger* đạt 4 (µg/mL) [46].

Một nghiên cứu khác được nhóm nghiên cứu của Nguyễn Vũ Hùng và cộng sự khi thử nghiệm đánh giá khả năng kháng nấm của preventol lên chủng nấm *Aspergillus sydowii* bằng phương pháp cấy trên đĩa thạch chứa môi trường có sẵn hoạt chất, kết quả cho thấy preventol gần như ức chế hoàn toàn sự phát triển của nấm sợi tại nồng độ 5mg/L tương đương với giá trị MIC là 5mg/L [124].

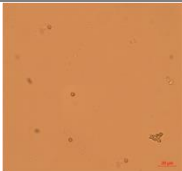
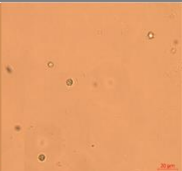


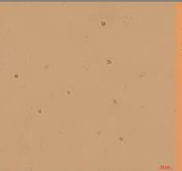

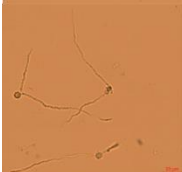
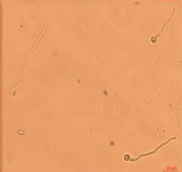
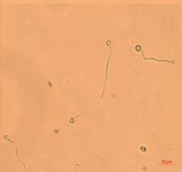









Preventol được sử dụng tạo chế phẩm PREVENTOL® TM Preservative Insecticide với nồng độ 0,01 – 1% có tác dụng diệt côn trùng đặc biệt là mối mọt nhằm bảo quản vải. Với mục đích để sử dụng chống mối mọt nhiễm vào các chất kết

dính và keo, đặc biệt với sản phẩm kết dính tiếp xúc với đất thì chế phẩm PREVENTOL® TM được trộn với nồng độ từ 800 – 1200 ppm hay 0,08 – 0,12% [125].

Các chất dẫn xuất của phenol là chất chống nấm tác động chính lên màng tế bào chất của nấm (cytoplasmic membrane) bằng cách liên kết với thành phần ergosterol của màng tế bào, tạo thành lỗ nhỏ trên màng nhằm dẫn các chất của thành phần nội bào ra ngoài và gây phá hủy màng, làm đông tụ nội bào ở nồng độ cao của chất được sử dụng [68].

Tương tự như axit, các chất dẫn xuất của phenol phân ly các ion hydro trong dung dịch và tạo thành muối. Tác dụng kháng khuẩn của chúng chỉ xảy ra ở trạng thái chưa phân ly. Khi hợp chất bị phân ly, các anion mang điện tích âm sẽ bị đẩy bởi các anion mang điện tích âm trên bề mặt của tế bào vi sinh vật, và do đó không thể phát huy tác dụng kháng khuẩn của hợp chất. Điều này có nghĩa là để giữ cho đặc tính kháng khuẩn của các hợp chất ở mức tối đa, người ta phải biết giá trị pKa của nó tức là độ pH mà tại đó 50% của phenol ở trạng thái phân ly [126]. Ở độ pH thấp hơn pKa của nó, hợp chất tồn tại ở dạng trung tính, trong khi ở trên giá trị đó, nó sẽ đạt điện tích âm. Như vậy, theo cách này, nếu một pKa của một phenol là 5, nó sẽ hiệu quả hơn ở các giá trị pH dưới 5.

**Bảng 3.3.** Khả năng nảy mầm của bào tử tại các nồng độ ức chế của preventol

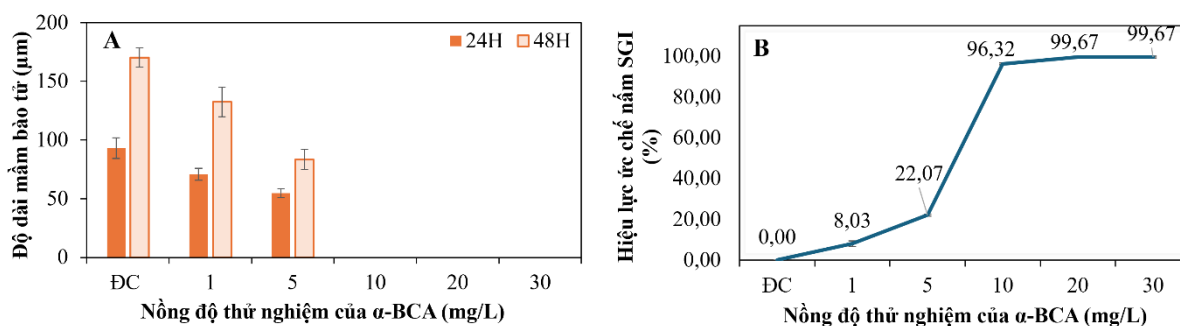
Thời gian	Khả năng nảy mầm của bào tử tại các nồng độ ức chế của preventol					
	Đối chứng	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
0h						
24h						
48h						



So sánh giá trị MIC của preventol giữa phương pháp thử nghiệm dạng lỏng với các kết quả công bố thử nghiệm trên môi trường rắn có thể thấy sự chênh lệch rất nhiều, gần như 100 lần, có thể được giải thích một phần bởi sự khác biệt trong diện tích tiếp xúc giữa tế bào nấm và hoạt chất trong hai môi trường. Trong môi trường rắn, sự khuếch tán của preventol có thể bị hạn chế, làm chậm quá trình tiếp cận các tế bào nấm nằm sâu trong khuẩn lạc. Hơn nữa, preventol có thể tương tác với các thành phần của môi trường rắn, làm giảm hoạt tính hoặc khả năng tiếp cận các tế bào nấm. Ngoài ra, nấm có thể thể hiện các cơ chế thích nghi khác nhau trong môi trường rắn so với môi trường lỏng, ảnh hưởng đến khả năng kháng lại hoạt chất.

### 3.4.2. Khả năng ức chế nấm sợi của $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde

Đối với hoạt chất  $\alpha$ -BCA, với dải nồng độ 1, 5, 10, 20 và 30 mg/L, so với sự phát triển mạnh mẽ của sợi nấm ở mẫu đối chứng, độ dài của sợi nấm cũng đã có sự thay đổi rõ rệt khi có mặt chất ức chế. Từ kết quả Hình 3.9, tại nồng độ thử nghiệm 5mg/L, tốc độ mọc của bào tử đã giảm đi khoảng một nửa so với mẫu đối chứng. Tại thời điểm sau 48h kiểm tra thấy độ dài sợi nấm giảm từ  $132,40 \pm 12,47 \mu\text{m}$  xuống đến gần như không có sự nảy mầm của bào tử tại nồng độ 10 mg/l. Khoảng chênh lệch của hiệu lực ức chế giữa 2 nồng độ 5mg/L và 10mg/L cũng rất lớn lần lượt là 22,07% và 96,32%. Tại đây xác định được MIC của  $\alpha$ -BCA là 10mg/L.



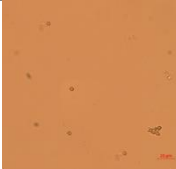
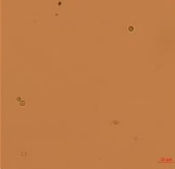
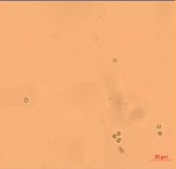
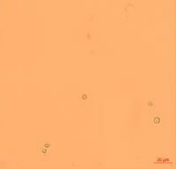




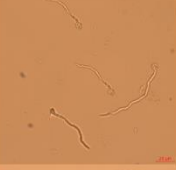






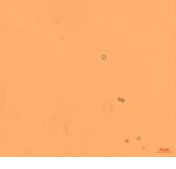


**Hình 3.9.** Tác động của  $\alpha$ -BCA lên sự nảy mầm của bào tử (A) và hiệu lực kháng nấm của  $\alpha$ -BCA sau 48 giờ (B)

Nhiều công bố đã thông báo về hoạt tính kháng nấm của các dẫn xuất của cinnamaldehyde. Zengyu Gan và cộng sự năm 2020 đã cho thử nghiệm 6 chất dẫn xuất của cinnamaldehyde lên loài nấm *Penicillium digitatum*, trong đó dẫn xuất 4-methoxy cinnamaldehyde có hoạt tính kháng nấm cao nhất được thử nghiệm trên lam kính lõm là 250 mg/l với hiệu lực SGI đạt 92,87% [51]. Nhóm nghiên cứu cũng quan sát được hiện tượng phòng lên không đều và làm rỗng các tế bào sợi nấm, màng tế bào bị vỡ dần làm rò rỉ thể vùi tế bào chất dẫn đến chết tế bào khi có sự tác động của

dẫn xuất này [51]. Các dẫn xuất của cinnamaldehyde thể hiện mức độ kháng nấm biến đổi thông qua giá trị MIC<sub>90</sub> chẳng hạn đối với  $\alpha$ -methyl cinnamaldehyde giá trị MIC<sub>90</sub> từ 100-250  $\mu\text{g/mL}$  đối với chủng nấm cảm và từ 100-200  $\mu\text{g/mL}$  đối với chủng đề kháng. Các dẫn xuất khác nhau của cinnamaldehyde thể hiện hoạt tính kháng khác nhau trên các chủng nấm như *Trychophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* và *Penicillium avellaneum*. Trong đó  $\alpha$ -chlorocinnamaldehyde thể hiện hoạt tính kháng cao với giá trị MIC từ 9,76 – 19,5  $\mu\text{g/mL}$  [127]. Một nghiên cứu khác, *o*-methoxy cinnamaldehyde được chỉ ra ức chế sự sản sinh độc tố và sự sinh trưởng của nấm sản sinh độc tố. Đồng thời, dẫn xuất này cũng ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của *A. flavus* và *A. parasiticus* ở nồng độ 100  $\mu\text{g/ml}$ ; *Avicularia versicolor* và *Aspergillus ochraceus* ở 200  $\mu\text{g/mL}$  [66]. Nghiên cứu của Li và cộng sự (2021) đã chỉ ra hiệu quả diệt nấm *Aspergillus flavus* với 3 chất aldehyde chiết xuất từ thực vật [128]. Cơ chế diệt nấm của chúng thể hiện ở việc tăng tính thấm của sợi nấm, phá hủy cấu trúc của thành và màng tế bào sợi nấm dẫn đến việc giải phóng các thành phần nội bào, tăng độ dẫn điện tương đối, giảm thành phần lipid của màng tế bào. Những mức độ tác động khác nhau của các chất aldehyde đều phụ thuộc vào nồng độ sử dụng [128].

Chất  $\alpha$ - BCA có độc tính với con người rất thấp, gần như là không độc hại với cơ thể con người; không ảnh hưởng đến các tính chất điện, không gây ăn mòn kim loại, không có tác dụng phụ trên các chất liệu sợi tự nhiên, sợi tổng hợp hoặc giấy. Các độc tính đường miệng của  $\alpha$ -bromocinnamaldehyde ở chuột, LD<sub>50</sub> là 470 mg/ kg và qua da là 2220 mg/ kg. Trong các thử nghiệm mãn tính bằng cách sử dụng chuột, qua kiểm tra mô học của khám nghiệm cho thấy không có sự thay đổi trong các cơ quan nội tạng. Những bằng chứng đó cho thấy rằng  $\alpha$ -bromocinnamaldehyde có độc tính thấp và một lượng hơi rất ít hình thành từ nó có thể được coi là gần như không độc hại cho cơ thể con người [109].

**Bảng 3.4.** Khả năng nảy mầm của bào tử tại các nồng độ ức chế của  $\alpha$ -BCA

Thời gian	Khả năng nảy mầm của bào tử tại các nồng độ ức chế của $\alpha$ -BCA					
	Đối chứng	1	5	10	20	30
0h						
24h						
48h						

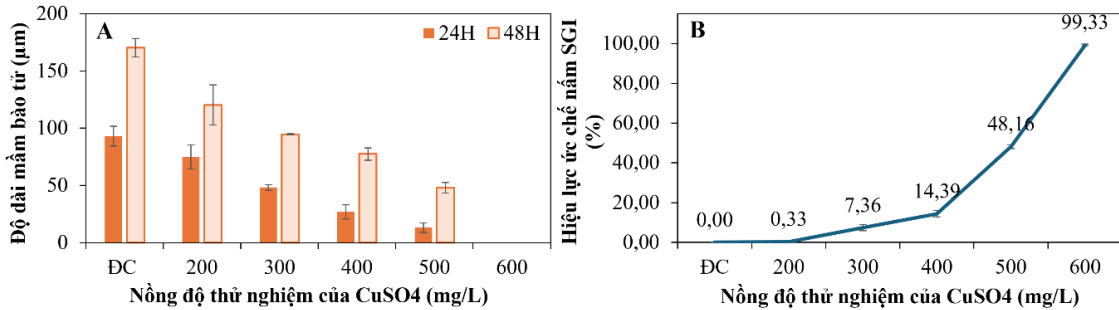
Giá trị MIC của  $\alpha$ -BCA gấp 250 lần so với giá trị MIC xác định được của preventol. Kết quả này trái ngược với kết quả thử nghiệm của Daniela Maxim (2012) và A.Marco (2019), khi so sánh khả năng kháng nấm của các hoạt chất với nhau. Nhóm nghiên cứu của Daniela Maxim đã tiến hành thử nghiệm 10 loại hoạt chất kháng vi sinh khác nhau, trong đó có hoạt chất Cinnamaldehyde và Preventol, tác động lên một số loại nấm mốc được phân lập từ các bức bích họa thuộc 6 chi *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria* và *Fusarium*; từ đó đưa tới kết luận rằng Cinnamaldehyde có khả năng kháng nấm cao hơn Preventol [67]. A.Marco cũng chứng minh được tính kháng tốt hơn của Cinnamaldehyde so với Preventol khi cho thử nghiệm lên 4 chủng nấm thuộc các chi *Alternaria*, *Pestalotia* và *Penicillium* [45]. Qua đó cho thấy tùy vào chủng loại nấm mà khả năng kháng nấm của các hoạt chất cũng khác nhau.

### 3.4.3. Khả năng ức chế nấm sợi của đồng sunphat

Khả năng ức chế sinh trưởng trên nấm gây hại mạnh trên gỗ của đồng sunphat ( $\text{CuSO}_4$ ) được thử nghiệm với 5 nồng độ từ 200, 300, 400, 500 và 600 mg/L. Kết quả khảo sát được trình bày ở Hình 3.10 dưới đây.

Với nhân tố là đồng sunphat, kết quả cho thấy tại nồng độ được thử nghiệm cao nhất 600 mg/L, ghi nhận gần như không có sự nảy mầm của bào tử nấm, như vậy MIC nằm ở khoảng 600 mg/L, tại đây hiệu lực kháng nấm SGI đạt 99,33%. Kết quả này cho thấy nồng độ khá cao so với thử nghiệm kháng nấm sử dụng hạt nano CuO là khoảng 80 mg/l với đối tượng thử nghiệm là *Alternaria citri* [129]. Sự khác biệt

này có thể đến từ kích thước của hạt và đối tượng thử nghiệm. Tuy vậy đồng sunphat vẫn cho khả năng ức chế nảy mầm bảo tử với sự chênh lệch sự phát triển của sợi nấm qua thời gian và nồng độ  $\text{CuSO}_4$ .



**Hình 3.10.** Tác động của  $\text{CuSO}_4$  lên sự nảy mầm của bào tử (A) và hiệu lực kháng nấm của  $\text{CuSO}_4$  sau 48 giờ (B)

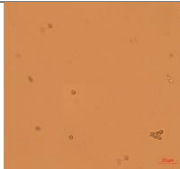
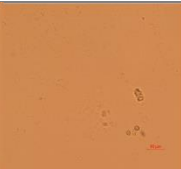

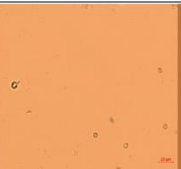


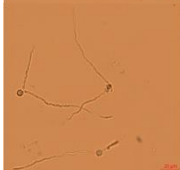

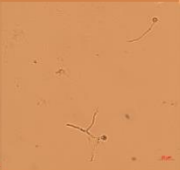

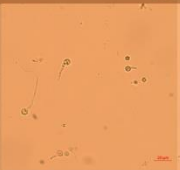







Do  $\text{CuSO}_4$  có tính ổn định kém, dễ bị rửa trôi và bị các hóa chất khác tác dụng làm mất hiệu lực đối với sinh vật hại gỗ nên chúng thường được kết hợp cùng với một số thành phần khác để tăng cường hiệu lực và độ ổn định. Nhóm nghiên cứu của Nguyễn Thị Hằng đã kết hợp đồng sunphat với Kali dichromat tạo thành chế phẩm XM5 cho thấm vào gỗ Thông mã vĩ thông qua phương pháp ngâm tẩm, kết quả khảo nghiệm hiệu lực ức chế nấm đã xác định thuốc XM5 có hiệu lực tốt đối với nấm mốc gây hại trên gỗ Thông mã vĩ ở nồng độ dung dịch 5% khi xử lý gỗ theo phương pháp nhúng 15 phút và phương pháp ngâm thường 24 giờ [89].

Các chất hóa học thường phản ứng với những chất bên ngoài màng tế bào như các enzyme kết hợp lỏng lẻo với bề mặt tế bào nấm, đặc biệt là enzyme phân hủy các polysaccharide ngoại bào. Chất hóa học có thể phong bế các enzyme, làm đông kết protein, hoặc gắn vào những nhóm hoạt động ngoại tế bào, khiến cho các chất dinh dưỡng không thể được phân hủy thành những chất đơn giản mà tế bào nấm có thể hấp thụ được. Các cation kim loại nặng như  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  rất phù hợp sử dụng trong trường hợp này bởi các hóa chất hoặc kim loại nặng có thể che kín bề mặt tế bào, ngăn cản không cho nước và không khí xâm nhập, khiến cho tế bào bị thiếu những chất rất cơ bản và không phát triển, dẫn đến chết.

Với xu hướng sử dụng công nghệ nano, tác giả Ibarra-Laclette và cộng sự (2022) đã chỉ ra rằng nano đồng (Cu-NP) có khả năng ức chế nấm sợi *Fusarium kuroshium*, một loại nấm gây bệnh cho thực vật. Cu-NP ở các nồng độ khác nhau đã ức chế hơn 80% sự phát triển của *F. kuroshium* và thậm chí còn hiệu quả hơn so với thuốc diệt nấm thương mại [130].

Như vậy, hợp chất  $\text{CuSO}_4$  hoặc ở dạng nano, đồng sunphat có khả năng ức chế sự phát triển của sợi nấm cũng như sự nảy mầm của bào tử ở các chủng nấm khác ở in vitro. Bên cạnh đó, hợp chất nano thể hiện tính ưu việt hơn, phương pháp áp dụng công nghệ nano là kỹ thuật nghiên cứu mới đầy triển vọng dần thay thế các phương pháp truyền thống.

**Bảng 3.5.** Khả năng nảy mầm của bào tử tại các nồng độ ức chế của đồng sunphat

Thời gian	Khả năng nảy mầm của bào tử tại các nồng độ ức chế của đồng sunphat					
	Đối chứng	200	300	400	500	600
0h						
24h						
48h						

#### 3.4.4. Khả năng ức chế nấm sợi của chế phẩm AM-QS

Để đánh giá khả năng kháng nấm của công thức hỗn hợp chất kháng nấm AM-QS gồm chứa đồng thời cả 3 thành phần là Preventol,  $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde và đồng sunfat. Căn cứ kết quả thử nghiệm khả năng ức chế nấm của từng đơn chất, chế phẩm AM-QS được tạo ra với hỗn hợp ba chất có công thức như Bảng 3.6.

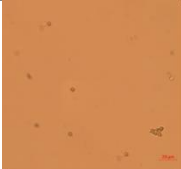





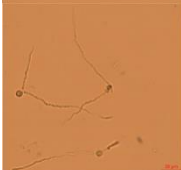











**Bảng 3.6.** Giá trị nồng độ của thành phần đơn chất trong chế phẩm AM-QS

AMQS (mg/L)	AM-QS (%)				
	0,1	0,3	0,5	1	2
<b>Preventol</b>	0,01	0,03	0,05	0,1	0,2
<b><math>\alpha</math>-BCA</b>	0,02	0,06	0,1	0,2	0,4
<b>Đồng sunphat</b>	0,02	0,06	0,1	0,2	0,4

Thử nghiệm khảo sát khả năng ức chế sinh trưởng của chế phẩm AM-QS ở 5 nồng độ khác nhau từ 0,1; 0,3; 0,5; 1 và 2 % trên chủng nấm gây hại chính được lựa chọn. Kết quả thử nghiệm được trình bày ở Hình 3.11 và Bảng 3.7 dưới đây.

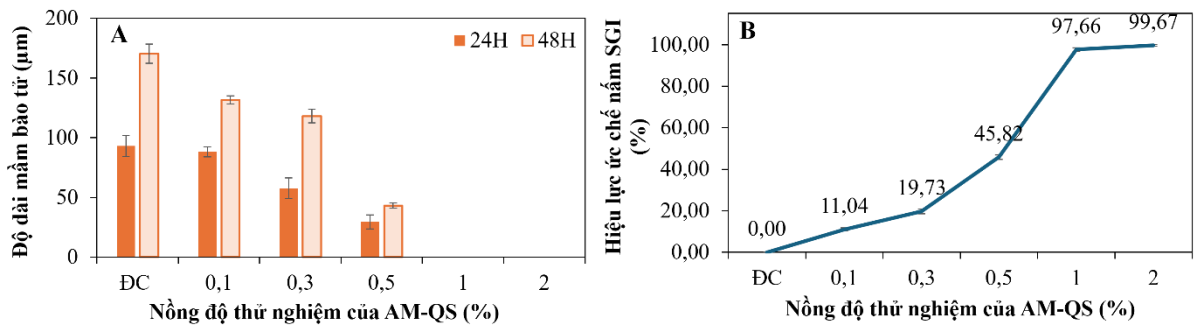
Tại AM-QS 0,5%, có 45,82% lượng bào tử không có khả năng nảy mầm, nhưng khi tăng gấp đôi lượng AM-QS, tương ứng hiệu lực ức chế cũng tăng lên đến 97,66%. Như vậy, giá trị MIC của chế phẩm được xác định là AM-QS 1%, đã tác động mạnh mẽ tới khả năng phát triển của bào tử nấm, tương đương với sự hiệp đồng của tổ hợp (preventol 0,1mg/L;  $\alpha$ -BCA 0,2mg/L; đồng sunphat 0,2mg/L). Dựa vào nồng độ thành phần đơn chất tại MIC 1% được quy đổi ở bảng 1, so sánh với nồng độ ức chế tối thiểu khi sử dụng riêng từng đơn chất, cho thấy lượng các đơn chất sử dụng trong AM-QS giảm đi đáng kể. Cụ thể, lượng đồng sunphat giảm xuống tận 3000 lần và  $\alpha$ -BCA giảm tới 50 lần. Từ đó cho thấy việc kết hợp các đơn chất vừa làm tăng hiệu quả kháng nấm khoảng 50 lần vừa giảm lượng sử dụng hóa chất cũng như tiết kiệm chi phí.

**Bảng 3.7.** Khả năng nảy mầm của bào tử tại các nồng độ ức chế của AM-QS

Thời gian	Khả năng nảy mầm của bào tử tại các nồng độ ức chế của AM-QS					
	Đối chứng	0,1	0,3	0,5	1	2
0h						
24h						
48h						

Một nghiên cứu của Tumah (2005) đã chứng minh rằng sự kết hợp giữa Triclosan 0,5% và 2-phenylphenol 0,5% tạo ra hiệu ứng hiệp đồng mạnh mẽ, tăng cường đáng kể khả năng diệt nấm đối với các chủng *C. albicans*, *A. versicolor* và *A. corymbifera* ở nồng độ hỗn hợp chỉ 1,5  $\mu\text{g/mL}$ , và đối với *P. verrucosum var. cyclopium* ở nồng độ 3  $\mu\text{g/mL}$ . Hiệu quả hiệp đồng này không chỉ làm tăng hiệu lực diệt nấm lên đến 5-10 lần mà còn cho phép giảm đáng kể nồng độ cần thiết của từng

hoạt chất riêng lẻ. Điều này mang lại lợi ích tiềm năng trong việc giảm thiểu các tác dụng phụ không mong muốn có thể xảy ra khi sử dụng các hoạt chất này [131].



**Hình 3.11.** Tác động của AM-QS lên sự nảy mầm của bào tử (A) và hiệu lực kháng nấm của AM-QS sau 48 giờ (B)

Nghiên cứu khác của Cai và cộng sự (2020) về công thức kháng nấm *Postia placenta*, *Gloeophyllum trabeum* gây hại trên gỗ thông, chứa hỗn hợp Methyl- $\beta$ -cyclodextrin và cinnamaldehyde đã cho thấy hiệu quả đáng kể dựa vào sự kết hợp của các hoạt chất. Khối lượng gỗ bị mất đi sau xử lý với hỗn hợp cinnamaldehyde và 50% dung dịch M $\beta$ CD chỉ là 5,5% với nấm gây hại *P. placenta* và chỉ 6,86% do nấm gây hại *G. trabeum* so với đối chứng khoảng 35% [132]. Hỗn hợp giữa Nano-CuO và dịch chiết lá *Nerium oleander* có khả năng ức chế nấm *Trametes hirsuta*, *Postia placenta* gây hại trên gỗ cao su (*Hevea brasiliensis*). Khối lượng gỗ bị mất đi sau xử lý với công thức hỗn hợp chất là 24,75% do nấm gây hại *T. hirsuta* so với gỗ không được xử lý 28,28%, và mất đi 13,19% do nấm gây hại *P. placenta* so với gỗ không được xử lý 51,59% [133].

Có thể khẳng định rằng chế phẩm AM-QS thể hiện khả năng ức chế nấm vượt trội hơn hẳn so với việc sử dụng các đơn chất thành phần một cách riêng lẻ. Hiệu quả vượt trội này có thể được giải thích bởi sự hiệp đồng tác dụng giữa các hoạt chất có trong chế phẩm, gây ảnh hưởng mạnh mẽ hơn đối với nấm bệnh. Cụ thể hơn, sự kết hợp giữa preventol,  $\alpha$ -BCA và đồng sunphat đã tạo ra một phổ tác động rộng hơn, không chỉ đơn thuần là tiêu diệt nấm mà còn can thiệp vào nhiều giai đoạn quan trọng trong vòng đời của nấm. Từ việc ngăn chặn sự nảy mầm của bào tử, ức chế sự phát triển của sợi nấm, cho đến phá vỡ cấu trúc tế bào nấm, chế phẩm AM-QS thể hiện một khả năng kiểm soát toàn diện sự phát triển của nấm. Sự hiệp đồng này không chỉ mang lại hiệu quả vượt trội mà còn có thể giúp giảm thiểu nguy cơ nấm phát triển kháng thuốc, một vấn đề ngày càng đáng lo ngại trong nông nghiệp và y tế hiện nay.



Thuốc hoặc các phân tử thể hiện tính hiệp đồng khi kết hợp với nhau, có nghĩa là chúng tương tác để tạo ra một hiệu ứng tổng hợp vượt trội hơn so với tổng hiệu quả của từng thành phần riêng lẻ. Điều này đặc biệt phổ biến với các thuốc hoặc phân tử có nguồn gốc thực vật, nơi mà sự phức tạp của các hợp chất tự nhiên có thể mang lại những lợi ích điều trị đa dạng [134, 135]. Sự hiệp đồng này có thể biểu hiện bằng nhiều cách: tăng cường một hoặc nhiều tác dụng của các loại thuốc, tạo ra một hiệu ứng hoàn toàn mới mà không thể đạt được khi sử dụng từng thuốc riêng lẻ, hoặc thậm chí làm thay đổi cơ chế tác động của thuốc. Trong lĩnh vực phát triển thuốc, chiến lược kết hợp thuốc được ứng dụng rộng rãi nhằm đạt được nhiều mục tiêu quan trọng. Đầu tiên, hiệu quả điều trị hiệp đồng cho phép đạt được kết quả điều trị tốt hơn, đặc biệt trong các trường hợp bệnh phức tạp hoặc kháng thuốc. Thứ hai, việc giảm liều lượng của từng thuốc riêng lẻ khi kết hợp có thể giúp giảm thiểu độc tính và tác dụng phụ không mong muốn. Cuối cùng, sự kết hợp thuốc có thể giúp làm chậm hoặc ngăn chặn sự phát triển của kháng thuốc, một thách thức lớn trong điều trị nhiều bệnh nhiễm trùng và ung thư hiện nay [136].

Các nhà khoa học cũng chỉ ra rằng việc sử dụng hỗn hợp hóa chất có thể tăng cường đáng kể tác dụng chống nấm mốc, mang lại hiệu quả vượt trội so với việc sử dụng từng hóa chất riêng lẻ. Điều này là do không có một hóa chất đơn lẻ nào có khả năng phòng chống tất cả các loại nấm mốc. Hơn nữa, việc sử dụng hỗn hợp hóa chất còn cho phép giảm nồng độ của từng chất so với khi sử dụng đơn chất, từ đó hạn chế dư lượng hóa chất tồn tại trong môi trường và đồng thời nâng cao hiệu quả phòng chống nhiều loại nấm mốc khác nhau [137].

Đối với chất aldehyde, các nghiên cứu về sự kết hợp giữa cinnamaldehyde và các chất kháng vi sinh vật khác đã mang lại những kết quả đầy hứa hẹn trong việc chống lại các chủng nấm phân lập, bao gồm cả các chủng kháng thuốc và không kháng thuốc. Ví dụ điển hình là sự kết hợp giữa cinnamaldehyde và fluconazole hoặc AmB (Amphotericin B), đã chứng minh khả năng ức chế và tiêu diệt nấm một cách hiệu quả [138]. Điều này mở ra tiềm năng to lớn trong việc phát triển các phương pháp điều trị nấm mới, đặc biệt là đối với các chủng nấm kháng thuốc đang ngày càng trở nên phổ biến và gây khó khăn trong điều trị. Sự kết hợp này không chỉ giúp tăng cường hiệu quả chống nấm mà còn có thể giảm thiểu nguy cơ phát triển kháng thuốc, đồng thời giảm tác dụng phụ không mong muốn của các chất kháng nấm đơn lẻ.



## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

1. Giải trình tự mẫu ghi nhận 6.185.888 đoạn, trong đó có 65,74% trên tổng số chưa có thông tin phân loại. Nhóm vi sinh vật nhân chuẩn ghi nhận 17 ngành, chiếm ưu thế là Ascomycota với tỷ lệ 30,19%, có 3% các đoạn thuộc về nhân chuẩn chưa xác định. Trong ngành Ascomycota thì lớp Dothideomycetes chiếm 20,05% và 58% trong số đó được phân loại. Các lớp Sordariomycetes là 2,06%, Mycosphaerellales chiếm 5,36%. Các chi chiếm hơn 0,1% như *Rachicladospodium*, *Hortaea*, *Venturia* và *Periconia*, cao nhất thuộc về *Aureobasidium* với 0,33%. *Chaetomium* (1,1%). Chi *Fusarium* và *Trichoderma* thuộc lớp Sordariomycetes. chiếm tỷ lệ nhỏ lần lượt là 0,2 và 0,018%.
2. Đã phân lập được tất cả 13 chủng nấm sợi thuộc 6 chi nấm bao gồm *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Penicillium* và *Trichoderma*, trong đó nhóm nấm *Aspergillus* chiếm ưu thế nhất (81,88%) về mật độ chủng loài.
3. Kết quả thử nghiệm khả năng sinh 03 enzym cellulase, amylase và laccase của 13 chủng nấm phân lập cho thấy 11/13 chủng có khả năng sinh tổng hợp từ một loại enzym trở lên, có 8 chủng sinh tổng hợp enzym amylase. Có 5/13 chủng có khả năng sinh tổng hợp cả ba loại enzym, trong đó *Aspergillus austroafricanus* TD11.1 và *Rhizopus oryzae* TD6.1 sinh tổng hợp enzym cellulase cao hơn so với amylase và laccase, *Curvularia eragrostidis* TD4.2 và *Aspergillus sydowii* TD5 sinh tổng hợp ba loại enzym cao hơn các chủng còn lại.
4. Đã xác định được nồng độ ức chế tối thiểu MIC của 4 hoạt chất kháng nấm *Aspergillus sydowii* TD5 là preventol,  $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde, đồng sunphat và chế phẩm AM-QS, với giá trị MIC lần lượt là 0,04mg/L; 10mg/L, 600mg/L và 1%.

### KIẾN NGHỊ

Áp dụng thử nghiệm chế phẩm AM-QS trên các trang thiết bị bằng gỗ và đánh giá khả năng kháng nấm của chế phẩm AM-QS ở các điều kiện khác nhau ngoài điều kiện phòng thí nghiệm.

## DANH MỤC CÔNG TRÌNH TÁC GIẢ

1. **Trần Khánh Linh**, Nguyễn Vũ Hùng, Nguyễn Văn Đại, Quách Ngọc Tùng, Ngô Cao Cường, 2024, Đánh giá khả năng ức chế nấm *Aspergillus sydowii* TD5 phân lập từ hòm gỗ của một số hoạt chất kháng nấm, *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2024*.
2. Nguyễn Vũ Hùng, **Trần Khánh Linh**, Nguyễn Thị Thanh Lợi, Lê Trọng Tài, Ngô Cao Cường, 2024, Hiệu quả hiệp đồng kháng nấm gây hại vật liệu gỗ của hoạt chất preventol,  $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde ( $\alpha$ -BCA) và đồng sunfat, *Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 66(5): 64-69.
3. Ngô Cao Cường, Nguyễn Vũ Hùng, **Trần Khánh Linh**, Nguyễn Thị Thanh Lợi, Quách Ngọc Tùng, Đỗ Thị Tuyền, Đào T.N. Anh, 2024, Structure of fungal community and culturable fungi on the discolored surfaces of pine storage boxes in the tropical region in Dong Nai, Vietnam, *Brazilian Journal of Biology*. (Đã chấp nhận đăng)

## DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Ngọc Trang, Lê Thị Song, Lê Cao Chiên, 2021, Nghiên cứu đánh giá khả năng kháng nấm mốc cho vật liệu xây dựng, *Tạp chí Vật liệu và Xây dựng*, 11(6).
2. Reinprecht L., 2010, *Fungicides for Wood Protection – World Viewpoint and Evaluation/Testing in Slovakia*, InTech, Rijeka, Croatia, p. 95-122.
3. Ryszard K., Małgorzata M., 2016, *Smart environmentally friendly composite coatings for wood protection*, in *Smart Composite Coatings and Membranes*, Elsevier, p. 293-325.
4. Kirk T.K., Farrell R.L., 1987, Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin, *Microbiol*, 41: pp. 465-505.
5. Malherbe S., Cloete T.E., 2002, Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1: pp. 105-114.
6. Anwar Z., Gulfraz M., Irshad M., 2014, Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review, *Radiation Research and Applied Sciences*, 7(2): pp. 163-173.
7. Sankaran R., Markandan K., Khoo K.S., Cheng C.K., Ashokkumar V., Deepanraj B., Show P.L., 2021, The expansion of lignocellulose biomass conversion into bioenergy via nanobiotechnology, *Frontiers in Nanotechnology*, 3: pp. 793528.
8. Payne C.M., Knott B.C., Mayes H.B., Hansson H., Himmel M.E., Sandgren M., Stahlberg J., Beckham G.T., 2015, Fungal cellulases, *Chemical reviews*, 115(3): pp. 1308-1448.
9. Winandy J.E., Morrell J.J., 1993, Relationship between incipient decay, strength, and chemical composition of Douglas-fir heartwood, *Wood Fiber Science*, pp. 278-288.
10. Curling S.F., Clausen C.A., Winandy J.E., 2002, Relationships between mechanical properties, weight loss, and chemical composition of wood during incipient brown-rot decay, *Forest Products Journal*, 52(7/8): pp. 34-39.
11. Deacon J., 2013, *Fungal biology*, John Wiley & Sons.
12. Crous P.W., Groenewald J.Z., 2015, Saprobic and phytopathogenic Dothideomycetes, *Studies in Mycology*, 82: pp. 1-218.
13. Nguyễn Xuân Thành, 2007, *Giáo trình vi sinh vật học công nghiệp*, Nhà Xuất bản Giáo dục.

14. Houbraken J., Vries R.P., Samson R.A., 2014, Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species, *Advances in applied microbiology*, 86: pp. 199-249.
15. Didelot X., Bowden R., Wilson D.J., Peto T.E., Crook D.W., 2012, Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing, *Nature Reviews Genetics*, 13(9): pp. 601-612.
16. Jong S.C., Birmingham J.M., 2001, *Cultivation and preservation of fungi in culture*, in *Systematics and Evolution*, Springer, p. 193-202.
17. Maria G.L., Sridhar K.R., 2002, Richness and diversity of filamentous fungi on woody litter of mangroves along the west coast of India, *Current Science*: pp. 1573-1580.
18. Hu D.M., Liu F., Cai L., 2013, Biodiversity of aquatic fungi in China, *Mycology*, 4(3): pp. 125-168.
19. Tokumasu S., Aoiki T., 2002, A new approach to studying microfungal succession on decaying pine needles in an oceanic subtropical region in Japan, *Fungal Diversity*, 10(Special Issue): pp. 167-183.
20. Zyani M., Mortabit D., Mostakim M., Iraqui M., Haggoud A., Ettayebi M., Koraichi S.I., 2009, Cellulolytic potential of fungi in wood degradation from an old house at the Medina of Fez, *Annals of microbiology*, 59: pp. 699-704.
21. Poohphajai F., Myronycheva O., Karlsson O., Belt T., Rautkari L., Sandak J., Gubenšek A., Zalar P., Gunde-Cimerman N., Sandak A., 2023, Fungal colonisation on wood surfaces weathered at diverse climatic conditions, *Heliyon*, 9(6).
22. Fukasawa Y., Osono T., Takeda H., 2009, Microfungus communities of Japanese beech logs at different stages of decay in a cool temperate deciduous forest, *Canadian Journal of Forest Research*, 39(8): pp. 1606-1614.
23. Köser C.U., Holden M.T., Ellington M.J., Cartwright E.J., Brown N.M., Ogilvy-Stuart A.L., Hsu L.Y., Chewapreecha C., Croucher N.J., Harris S.R., 2012, Rapid whole-genome sequencing for investigation of a neonatal MRSA outbreak, *New England Journal of Medicine*, 366(24): pp. 2267-2275.
24. Guo M., Huang K., Chen S., Qi X., He X., Cheng W.-H., Luo Y., Xia K., Xu W., 2014, Combination of metagenomics and culture-based methods to study the interaction between ochratoxin a and gut microbiota, *Toxicological Sciences*, 141(1): pp. 314-323.

25. Chen P., Sun W., He Y., 2020, Comparison of metagenomic next-generation sequencing technology, culture and GeneXpert MTB/RIF assay in the diagnosis of tuberculosis, *Journal of Thoracic Disease*, 12(8): pp. 4014.
26. Pace N.R., Stahl D.A., Lane D.J., Olsen G.J., 1986, The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences, *Advances in microbial ecology*: pp. 1-55.
27. Sara C.O., Leite L.R., Smith A., Medeiros J.D., Badotti F., Fonseca P.L., Vaz A.B., Oliveira G., Aristóteles G.-N., 2013, Assessment of fungal diversity in the environment using metagenomics: a decade in review, *Fungal Genomics Biology*, 3(2): pp. 1.
28. Handelsman J., Rondon M.R., Brady S.F., Clardy J., Goodman R.M., 1998, Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products, *Chemistry biology*, 5(10): pp. R245-R249.
29. Venter J.C., Remington K., Heidelberg J.F., Halpern A.L., Rusch D., Eisen J.A., Wu D., Paulsen I., Nelson K.E., Nelson W., 2004, Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea, *Science*, 304(5667): pp. 66-74.
30. Cai L., Lim H., Nicholas D.D., Kim Y., 2020, Bio-based preservative using methyl- $\beta$ -cyclodextrin-essential oil complexes for wood protection, *International journal of biological macromolecules*, 147: pp. 420-427.
31. Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T., 2010, A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing, *Nature*, 464(7285): pp. 59-65.
32. Thomas T., Gilbert J., Meyer F., 2012, Metagenomics-a guide from sampling to data analysis, *Microbial informatics experimentation*, 2: pp. 1-12.
33. Sharpton T.J., 2014, An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data, *Frontiers in plant science*, 5: pp. 209.
34. Quince C., Walker A.W., Simpson J.T., Loman N.J., Segata N., 2017, Shotgun metagenomics, from sampling to analysis, *Nature biotechnology*, 35(9): pp. 833-844.
35. Jagadeesan B., Gerner-Smidt P., Allard M.W., Leuillet S., Winkler A., Xiao Y., Chaffron S., Van Der Vossen J., Tang S., Katase M., McClure P., Kimura B., Ching Chai L., Chapman J., Grant K., 2019, The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice, *Food Microbiology*, 79: pp. 96-115.
36. Zuur A.F., Ieno E.N., Smith G.M., 2007, *Analysing ecological data*, Springer, Vol, 680.

37. Nguyễn Minh Giang, Đỗ Thị Huyền, Trương Nam Hải, 2015, Sử dụng công cụ tin sinh trong nghiên cứu metagenomics-hướng nghiên cứu và ứng dụng mới trong sinh học, *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Đại học Sư Phạm Thành phố Hồ Chí Minh*, 2(67): pp. 167-177.
38. Oh S.Y., Fong J.J., Park M.S., Chang L., Lim Y.W., 2014, Identifying airborne fungi in Seoul, Korea using metagenomics, *Journal of Microbiology*, 52: pp. 465-472.
39. Hong Y., Tan J.Y., Xue H., Chow M.L., Ali M., Ng A., Leong A., Yeo J., Koh S.M., Tang M.S.Y., 2023, A metagenomic survey of wood decay fungi in the urban trees of Singapore, *Journal of Fungi*, 9(4): pp. 460.
40. Janusz G., Mazur A., Pawlik A., Kołodzyńska D., Jaroszewicz B., Marzec-Grządziel A., Koper P., 2023, Metagenomic Analysis of the Composition of Microbial Consortia Involved in Spruce Degradation over Time in Białowieża Natural Forest, *Biomolecules*, 13(10): pp. 1466.
41. Passarini M.R.Z., Ottoni J.R., Costa P.E.d.S., Hissa D.C., Falcão R.M., Melo V.M.M., Balbino V.Q., Mendonça L.A.R., Lima M.G.d.S., Coutinho H.D.M., 2022, Fungal community diversity of heavy metal contaminated soils revealed by metagenomics, *Archives of Microbiology*, 204(5): pp. 255.
42. Woźniak M., Grządziel J., Gałązka A., Frąc M., 2019, Metagenomic analysis of bacterial and fungal community composition associated with *Paulownia elongata* × *Paulownia fortunei*, *BioResources*, 14(4): pp. 8511-8529.
43. Kuchi V.S., Ilahy R., Siddiqui M.W., 2018, CHAPTER 15: Commercial Disinfectants in Skirmishing Postharvest Diseases, *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables*.
44. Eastmond D.A., Balakrishnan S., 2010, Genotoxicity of Pesticides, in *Hayes' handbook of pesticide toxicology*, Academic Press, pp. 357-380.
45. Marco A., Santos S., Caetano J., 2019, Basil essential oil as an alternative to commercial biocides against fungi associated with black stains in mural painting, *Journal Pre-proof*.
46. Moore S.L., Payne D.N., 2004, Types of antimicrobial agents, *Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection Preservation & Sterilization*.
47. Eaton R.A., Hale M.D.C., 1993, *Wood – decay, pests and protection*, Chapman & Hall, London.
48. Reinprecht L., 2008, Ochrana Dreva (Wood Protection), *Handbook*, Technical University in Zvolen - Slovakia.

49. Tamás M.J., Sharma S.K., Ibstedt S., Jacobson T., Christen P., 2014, Heavy Metals and Metalloids As a Cause for Protein Misfolding and Aggregation, *Biomolecules*, 4: pp. 252-267.
50. Rita W.S., Suprpta D.N., Swantara I.M.D., Sudana I.M., 2022, Antifungal Activity of Phenolic Compounds From Samanea Saman Leaves Against Stem Rot Disease on Dragon Fruits Caused by Fusarium Solani, *KnE Life Science*, in *The First Asian PGPR Indonesian Chapter International e-Conference 2021*, pp. 621–635.
51. Castillo I.F., Hierro L., Fuente J.s.M.d.l., Ascaso A.s.S., Mitchell S.G., 2021, Perspectives for antimicrobial nanomaterials in cultural heritage conservation, *Chem* 7, 2021: pp. 629–669.
52. Di Vito M., Vergari L., Mariotti M., Proto M.R., Barbanti L., Garzoli S., Sanguinetti M., Sabatini L., Peduzzi A., Bellardi M.G.J.M., 2022, Anti-mold effectiveness of a green emulsion based on Citrus aurantium hydrolate and Cinnamomum zeylanicum essential oil for the modern paintings restoration, *Microorganisms*, 10(2): pp. 205.
53. Sharma A.K., Sharma R., Saxena M., 2018, Biomedical and antifungal application of Cu (II) soaps and its urea complexes derived from various oils, *Open Access Journal of Translational Medicine & Research*, 2(2).
54. Cruz L.F., Cruz J.C., Carrillo D., 2021, In-vitro evaluation of copper nanoparticles as a potential control agent against the fungal symbionts of the invasive ambrosia beetle Ewallacea fornicatus, *Crop Protection*, 143: pp. 105564-105574.
55. Oziengbe E.O., Osazee J.O., 2012, Antifungal activity of copper sulphate against colletotrichum gloeosporioides, *Asian Journal of Scientific Research*, 2(12): pp. 835-839.
56. Benhalima L., Amri S., Bensouilah M., Ouzrout R., 2019, Antibacterial effect of copper sulfate against multi-drug resistant nosocomial pathogens isolated from clinical samples, *Pakistan journal of medical sciences*, 35(5): pp. 1322–1328.
57. Rathore P., Hegde A., Ginjupalli K., Upadhya N., 2009, Evaluation of antifungal activity of additives to resilient liners: an in vitro pilot study, *Trends in Biomaterials Artificial organs*, 23(1): pp. 6-9.
58. Borkow G., Gabbay J., 2005, *Copper as a biocidal tool*.
59. Kumbhar A.S., Padhye S.B., West D.X., Liberta A.E., 1991, Electrochemical studies of copper(II) 2-acetylpyridine4N-dialkylthiosemicarbazones. Relation

- to their spectral, magnetic, and biological properties, *Transition Metal Chemistry*, 16(2): pp. 276-279.
60. Zhang Y., Li S., Kong X., 2013, Relationship between antimold activity and molecular structure of cinnamaldehyde analogues, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(5): pp. 1358-1364.
  61. Cui Y., Liang G., Hu Y.-H., Shi Y., Cai Y.-X., Gao H.-J., Chen Q.-X., Wang Q., 2015, Alpha-substituted derivatives of cinnamaldehyde as tyrosinase inhibitors: inhibitory mechanism and molecular analysis, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 63(2): pp. 716-722.
  62. Bickers D., Calow P., Greim H., Hanifin J.M., Rogers A.E., Saurat J.H., Sipes I.G., Smith R.L., Tagami H., 2005, A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde, and cinnamic acid when used as fragrance ingredients, *Food Chem*, 43: pp. 799–836.
  63. Akimoto Y., Nito S., Urakubo G., 1988, Studies on the Metabolic Fate of alpha-Bromocinnamaldehyde (an Anti-Fungal Agent) in Rat, *Eisei kagaku*, 34(4): pp. 303-312.
  64. Gan Z., Huang J., Chen J., 2020, Synthesis and Antifungal Activities of Cinnamaldehyde Derivatives against *Penicillium digitatum* Causing Citrus Green Mold, *Journal of Food Quality*, 2020.
  65. Amanda A. Doylea J.C.S., 2019, A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents, *Fitoterapia*, 139: pp. 104405-104423.
  66. Ishida S., Matsuda A., Kawamura Y., Yamanaka K., 1960, Antifungal agent. I. Antibacterial and antifungal activities in vitro of several organic compounds. II. Antibacterial and antifungal activities of cinnamaldehyde derivatives. III. Antibacterial and antifungal activities of  $\alpha$ -bromocinnamaldehyde derivatives, *Chemotherapy*, 8: pp. 146–159.
  67. Maxim D., Bucsa L., Moza M.I., Chachula O., 2012, Preliminary antifungal investigation of ten biocides against moulds from two different church frescoes, *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 17(2).
  68. Kang T.H., Hwang E.I., Yun B.S., Park K.D., Kwon B.M., Shin C.S., Kim S.U., 2007, Inhibition of chitin synthases and antifungal activities by 2'-benzoyloxycinnamaldehyde from *Pleuropterusciliinervis* and its derivatives. , *Biol Pharm Bull* 30(3): pp. 598-602.
  69. Bang K.H., Min B.S., Lee Y.H., 1998, Antifungal activity of cinnamaldehyde derivatives, *The Korean Journal of Mycology*, 26(4): pp. 525-530.



70. Bang K.H., Jo G.H., Rhee Y.H., 2001, Antifungal Activities of trans-Cinnamaldehyde Derivatives, *Yakhak Hoej*, 45(5): pp. 431-436
71. Hu L., Wang D., Liu L., Chen J., Xue Y., Shi Z., 2013, Ca<sup>2+</sup> efflux is involved in cinnamaldehyde induced growth inhibition of *Phytophthora capsici*, *PLoS One* 8: pp. 7626.
72. Courchesne W.E., Tunc M., Liao S., 2009, Amiodarone induces stress responses and calcium flux mediated by the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*., *Can J Microbiol* 55: pp. 288-303.
73. Heusinkveld H.J., Molendijk J., Berg M.v.d., Westerink R.H., 2013, Azole fungicides disturb intracellular Ca<sup>2+</sup> in an additive manner in dopaminergic PC12 cells, *Toxicol Sci*, 134: pp. 374-81.
74. Liu S., Hou Y., Liu W., Lu C., Wang W., Sun S., 2015, Components of the calcium-calcineurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets. , *Eukaryot Cell*, 14: pp. 324-34.
75. Wendakoon C.N., Morihiko S., 1995, Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices., *Journal of Food Prot*, 58: pp. 280-283.
76. Di P.R., Hoskins N., Betts G., Mauriello G., 2006, Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media., *Journal of Agric Food Chem*, 54: pp. 2745-2749.
77. Bang K.H., Lee D.W., Park H.M., Rhee Y.H., 2000, Inhibition of fungal cell wall synthesizing enzymes by trans-cinnamaldehyde., *Biosci Biotechnol Biochem*, 64: pp. 1061-1063
78. Ultee A., Kets E.P., Smid E.J., 1999, Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*, *Appl Environ Microbiol*, 65(10): pp. 4606-4610.
79. Shreaz S., Bhatia R., Khan N., Muralidhar S., Basir S.F., Manzoor N., Khan L.A., 2011, Spice oil cinnamaldehyde exhibits potent anticandidal activity against fluconazole resistant clinical isolates, *Fitoterapia*, 82: pp. 1012-1020.
80. Parks L.W., Casey W.M., 1995, Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast., *Annu Rev Microbiol*, 49: pp. 95-116.
81. Shreaz S., Wani W.A., Behbehani J.M., Raja V., Irshad M., Karched M., Ali I., Siddiqi W.A., Lee T.H., 2016, Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents, *Fitoterapia*.

82. Gill A.O., Holley R.A., 2006, Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics., *Int J Food Microbiol*, 108: pp. 1-9.
83. Gill A.O., Holley R.A., 2006, Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics., *Int J Food Microbiol*, 111: pp. 170-74.
84. Monk B.C., Perlin D.S., 1994, Fungal plasma membrane proton pumps as promising new antifungal targets., *Critical Reviews in Microbiology*, 20(3): pp. 209-223.
85. Prasad R., 1987, Nutrient transport in *Candida albicans*, a pathogenic yeast., *Yeast*, 3: pp. 209-221.
86. Serrano R., 1988, Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi., *Biochim Biophys Acta*, 947: pp. 1-28.
87. Nguyễn Ngọc Trúc Ngân, Phạm Thị Ngọc Lan, 2014, Tìm hiểu khả năng phân giải cellulose của vi sinh vật phân lập từ chất thải rắn của nhà máy Fococev, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Trường Đại học Khoa học Huế*, 1(1).
88. Hồ Bảo Thùy Quyên, Phạm Nguyễn Phương Thảo, Nguyễn Mỹ Phi Long, 2018, Khảo sát nấm mốc có khả năng phân giải cellulose thu nhận từ rừng Mã Đà, Đồng Nai, *Tạp chí Khoa học Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh*, 13(1): pp. 198-208.
89. Nguyễn Thị Hằng, Vũ Văn Thu, Phạm Thị Thanh Miên, 2011, Kết quả khảo nghiệm hiệu lực của 3 loại thuốc bảo quản đối với nấm mốc hại gỗ Thông mã vĩ, *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, 4: pp. 2059 - 2066.
90. Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Al-Ghalith G.A., Alexander H., Alm E.J., Arumugam M., Asnicar F., 2019, Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2, *Nature biotechnology*, 37(8): pp. 852-857.
91. GOST, 1975, Standard, Unified System of Corrosion and Ageing Protection, Non-metallic Materials and Articles with Their Application, Method of Microbiological Resistance Tests under Natural and Atmospheric Conditions, 9053-9075.
92. Hayes A., 1965, Some microfungi from Scots pine litter, *Transactions of the British Mycological Society*, 48(2): pp. 179-185.
93. Raper K.B., Thom C., 1949, A manual of the *Penicillia*, *A manual of the Penicillia*.

94. Stolk A.C., 1972, The genus *Talaromyces*. Studies on *Talaromyces* and related genera II, *Studies in Mycology*, 2: pp. 1-65.
95. Varga J., Frisvad J.C., Samson R., 2011, Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*, *Studies in Mycology*, 69: pp. 57-80.
96. Seifert K.A., Gams W., 2011, The genera of *Hyphomycetes*—2011 update, *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 27: pp. 119-129.
97. Biotek N., 2018, *Fungi Yeast Isolation Kit*.
98. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1990, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1): pp. 315-322.
99. Ihrmark K., Bödeker I., Martinez K.C., Friberg H., Kubartova A., Schenck J., Strid Y., Stenlid J., Brandström D.M., Clemmensen K.E., 2012, New primers to amplify the fungal ITS2 region—evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities, *FEMS Microbiology Ecology*, 82(3): pp. 666-677.
100. Felsenstein J., 1985, Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, *Evolution*, 39(4): pp. 783-791.
101. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S., 2013, MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): pp. 2725-2729.
102. Chevenet F., Brun C., Bañuls A.L., Jacq B., Christen R., 2006, TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees, *BMC Bioinformatics*, 7(1): pp. 439-453.
103. Anita B.B., Thatheyus A.J., Ramya D., 2013, Biodegradation of Carboxymethyl Cellulose using *Aspergillus flavus*, *Science International*, 1(4): pp. 85-91.
104. Abdallah Y.K., Estevez A.T., Tantawy D.E.D.M., Ibraheem A.M., Khalil N.M., 2019, Employing laccase-producing *Aspergillus sydowii* NYKA 510 as a cathodic biocatalyst in self-sufficient lighting microbial fuel cell, *Journal of Microbiology Biotechnology*, 29(12): pp. 1861-1872.
105. Adegoke S., Odibo F., 2019, Production, purification and characterization of  $\alpha$ -amylase of *Aspergillus sydowii* IMI 502692, *Plant cell biotechnology molecular Biology and Evolution*, 20(23&24): pp. 1050-1058.
106. Xu J., Zhao X., Han X., Du Y., 2007, Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi in vitro, *Pesticide Biochemistry Physiology*, 87(3): pp. 220-228.







107. Straus D.L., Mitchell A.J., Carter R.R., 2009, Optimizing Copper Sulfate Treatments for Fungus Control on Channel Catfish Eggs, *Journal of Aquatic Animal Health*, 21: pp. 91-97.
108. Leo F.D., Cardiano P., Carlo G.D., Schiavo S.L., Urzì C., 2017, Testing the antimicrobial properties of an upcoming “environmental-friendly” family of ionic liquids, *Journal of Molecular Liquids*.
109. Alves D.d.N., Martins R.X., Ferreira E.d.S., Alves A.F., Andrade J.C.d., Batista T.M., Lazarini J.G., Amorim L.S., Rosalen P.L., Farias D.F., Castro R.D.d., 2021, Toxicological Parameters of a Formulation Containing Cinnamaldehyde for Use in Treatment of Oral Fungal Infections: An In Vivo Study, *Hindawi, BioMed Research International*.
110. Khadke S.K., Lee J.H., Kim Y.G., Raj V., Lee J., 2022, Appraisal of Cinnamaldehyde Analogs as Dual-Acting Antibiofilm and Anthelmintic Agents, *Frontiers in Microbiology*.
111. Kielak A.M., Scheublin T.R., Mendes L.W., Van Veen J.A., Kuramae E.E., 2016, Bacterial community succession in pine-wood decomposition, *Frontiers in microbiology*, 7: pp. 231.
112. Buchner J., Irle M., Belloncle C., Michaud F., Macchioni N., 2019, Fungal and bacterial colonies growing on weathered wood surfaces, *Wood Material Science Engineering*, 14(1): pp. 33-41.
113. Daniel V.D.L., Taghavi S., McCorkle S.M., Li L.L., Malfatti S.A., Monteleone D., Donohoe B.S., Ding S.Y., Adney W.S., Himmel M.E., 2012, The metagenome of an anaerobic microbial community decomposing poplar wood chips, *PloS one*, 7(5): pp. e36740.
114. Fatimazahra E.B., Laachari F., Elabed S., Mohammed I.H., Ibnsouda S.K., 2014, Cellulolytic potential and filter paper activity of fungi isolated from ancient manuscripts from the Medina of Fez, *Annals of microbiology*, 64: pp. 815-822.
115. Fogle M.R., Douglas D.R., Jumper C.A., Straus D.C., 2008, Growth and mycotoxin production by *Chaetomium globosum* is favored in a neutral pH, *International journal of molecular sciences*, 9(12): pp. 2357-2365.
116. Azeem A., Ahmed M., Blanchette R.A., Held B.W., 2020, *Chaetomium* as potential soft rot degrader of woody and papery cultural heritage, *Recent Developments on Genus Chaetomium*: pp. 395-419.







117. Traczyk E.K., Skórska C., Cholewa G., Sitkowska J., Milanowski J., Dutkiewicz J., 2002, Exposure to airborne microorganisms in furniture factories, *Annals of Agricultural Environmental Medicine*, 9(1).
118. Dan P., Nwachukwu J., 2020, Effect of microbes and atmospheric parameters on wood products utilization in Uyo, Akwa Ibom state, Nigeria, *Journal of Research in Forestry, Wildlife Environment*, 12(2).
119. Đặng Vũ Hồng Miên, 2015, *Hệ nấm mốc ở Việt Nam (phân loại, tác hại, độc tố, cách phòng chống)*, Khoa học và Kỹ thuật.
120. Khademibami L., Bobadilha G.S., 2022, Recent developments studies on wood protection research in academia: A review, *Frontiers in Forests Global Change*, 5: pp. 793177.
121. Singh P., Chauhan M., 2013, Influence of environmental factors on the growth of building deteriorating fungi: *Aspergillus flavus* and *Penicillium chrysogenum*, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Research*, 4(1): pp. 425.
122. Zabel R.A., 1992, Chemical changes in wood caused by decay fungi, *Wood microbiology decay its prevention*: pp. 195-224.
123. Sabatini L., Ciandrini E., Campana R., 2021, Antifungal Activity of Vinegar on Different Types of Artistic Rear Canvases, *EC Microbiology*, 17: pp. 03-10.
124. Nguyễn Vũ Hùng, Trần Khánh Linh, Nguyễn Thị Thanh Lợi, Ngô Cao Cường, 2024, Hiệu quả hiệp đồng kháng nấm gây hại vật liệu gỗ của hoạt chất preventol,  $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde ( $\alpha$ -BCA) và đồng sunfat, *Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 66(5): pp. 64-69.
125. Russell A., 2003, Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 52(5): pp. 750-763.
126. Haines J.H., Kohler S.A., 1986, An evaluation of ortho-phenyl phenol as a fungicidal fumigant for archives and libraries, *Journal of the American Institute for Conservation*, 25(1): pp. 49-55.
127. Morozumi S., 1978, Isolation, purification, and antibiotic activity of o-methoxycinnamaldehyde from cinnamon, *Applied Environmental Microbiology*, 36(4): pp. 577-583.
128. Li Q., Zhu X., Xie Y., Liang J., 2021, Antifungal properties and mechanisms of three volatile aldehydes (octanal, nonanal and decanal) on *Aspergillus flavus*, *Grain Oil Science Technology*, 4(3): pp. 131-140.

129. Sardar M., Ahmed W., Al Ayoubi S., Nisa S., Bibi Y., Sabir M., Khan M.M., Ahmed W., Qayyum A., 2022, Fungicidal synergistic effect of biogenically synthesized zinc oxide and copper oxide nanoparticles against *Alternaria citri* causing citrus black rot disease, *Saudi journal of biological sciences*, 29(1): pp. 88-95.
130. Enrique I.L., Blaz J., Torres C.A.P., Villafán E., Lamelas A., Greta R.S., Juárez L.A.I., Ávila C.d.J.G., Enriquez A.I.M., Pariona N., 2022, Antifungal effect of copper nanoparticles against *Fusarium kuroshium*, an obligate symbiont of *Euwallacea kuroshio* ambrosia beetle, *Journal of Fungi*, 8(4): pp. 347.
131. Haitham N. T., 2005, Synergistic effect of the combination triclosan with 2-phenylphenol against *Pseudomonas aeruginosa* and fungi, *Saudi Medical Journal*, 26 (5): pp. 723-727.
132. Cai L., Lim H., Nicholas D.D., Kim Y., 2020, Bio-based preservative using methyl- $\beta$ -cyclodextrin-essential oil complexes for wood protection, *International journal of biological macromolecules*, 147: pp. 420-427.
133. Shiny K., Nair S., Mamatha N., Sundararaj R., 2022, Decay resistance of wood treated with copper oxide nanoparticles synthesised using leaf extracts of *Lantana camara* L. and *Nerium oleander* L, *Wood Material Science Engineering*, 17(6): pp. 727-733.
134. Chou T.C., 2006, Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies, *Pharmacological reviews*, 58(3): pp. 621-681.
135. Velikova T., Trepova E., Grigoreva R.T., 2011, *The use of biocides for the protection of library documents: before and now*, in *Science against microbial pathogens*, p. 152-159.
136. Kim J.H., Faria N.C., Martins M.D.L., Chan K.L., Campbell B.C., 2012, Enhancement of antimycotic activity of amphotericin B by targeting the oxidative stress response of *Candida* and *Cryptococcus* with natural dihydroxybenzaldehydes, *Frontiers in Microbiology*, 3: pp. 261.
137. Woźniak M., 2022, Antifungal agents in wood protection—A review, *Molecules*, 27(19): pp. 6392.
138. Bi Z., Fang S., Gao Q., Lei Y., Morrell J.J., Yan L., 2022, Improvement of mould resistance of wood with cinnamaldehyde chitosan emulsion, *Wood Science Technology*: pp. 1-18.







## PHỤ LỤC



### Phụ lục 1: Kết quả phân lập các mẫu nấm mốc




STT	Ký hiệu mẫu	Số khuẩn lạc	Hình ảnh phân lập	Số lượng từng chủng
1	Đ1_412	1		TS1: 1
2	Đ2_412	3		TS6: 3
3	Đ3_412	5		TS5: 3 TS6: 2
4	Đ4_412	26		TĐ4.2:5 TS6: 21
5	Đ5_412	26		TĐ5: 2 TĐ4.2: 2 TS6: 22
6	Đ6_412	13		TĐ6.1: 2 TĐ6.2: 4 TS1: 3 TS6: 4

7	Đ7_420	16		TĐ7: 4 TS1: 4 TS6: 8
8	Đ8_420	6		TS6: 3 TĐ7: 1
9	Đ9_420	2		TS6: 2
10	Đ10_420	1		TS6:1
11	Đ11_420	3		TĐ11.1: 1 TĐ5: 2
12	Đ12_420	8		TĐ12.1: 1 TĐ12.2: 1 TĐ12.3:1 TĐ4.2: 2 TĐ6.2: 3


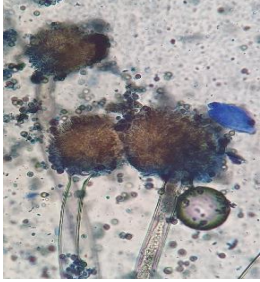
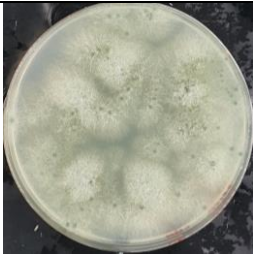
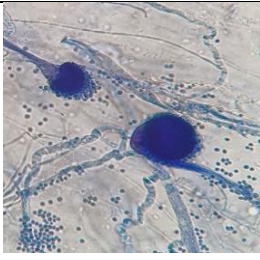

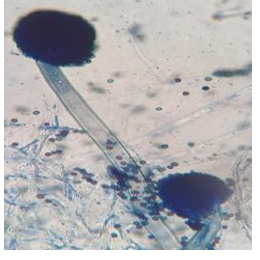

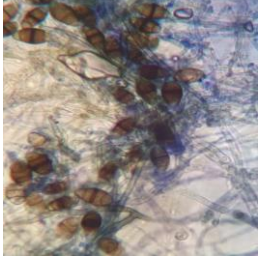
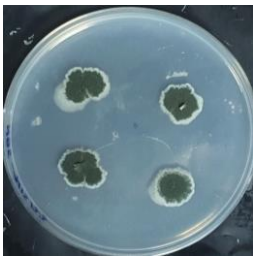



13	S1_412	2		TS1: 2
14	S2_412	0		
15	S3_412	0		
16	S5_412	4		TS5: 4
17	S6_412	4		TS1: 1 TS6: 3
18	S8_412	1		TS1: 1

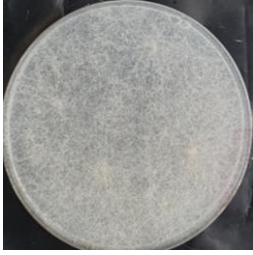
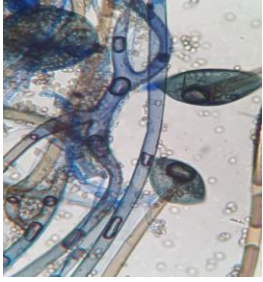

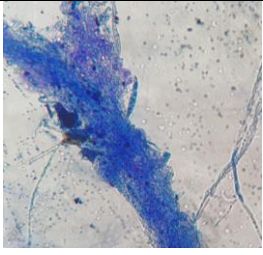

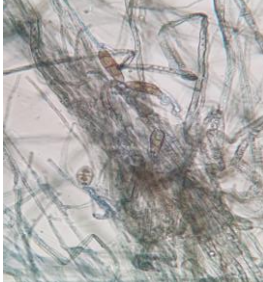
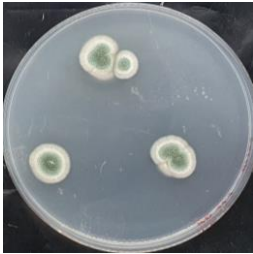
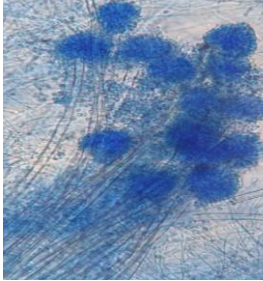
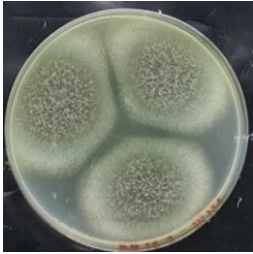
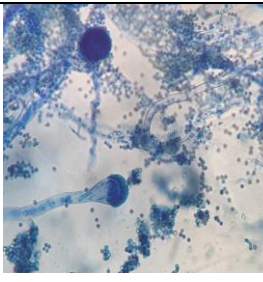
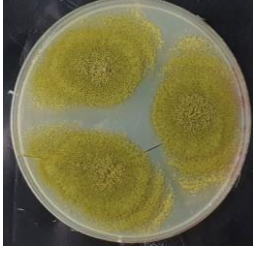
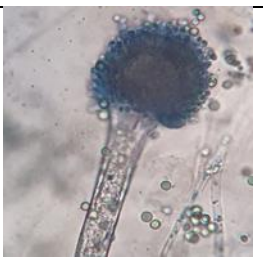
19	<b>S10_412</b>	<b>3</b>		NS10.2: 3
20	<b>S11_412</b>	<b>2</b>		NS10.2: 2
21	<b>S12_420</b>	<b>3</b>		TS1: 1 TS6: 2
22	<b>S13_420</b>	<b>3</b>		TS6: 3
23	<b>S15_420</b>	<b>0</b>		
24	<b>S16_420</b>	<b>2</b>		TS6: 2

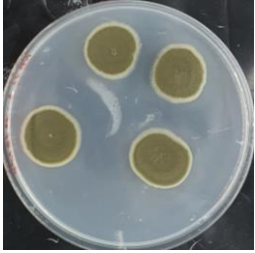
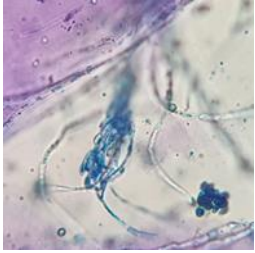

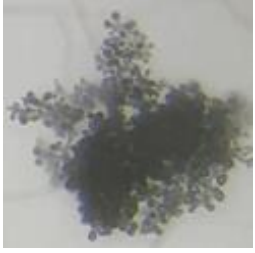
25	<b>S20_420</b>	<b>2</b>		TS1: 2
26	<b>S21_420</b>	<b>2</b>		TS1: 2
27	<b>S22_420</b>	<b>6</b>		TS1: 6

**Phụ lục 2: Đặc điểm hình thái một số chủng nấm sợi phân lập từ bề mặt hòm gỗ tại Đồng Nai và phân loại theo cuống sinh bào tử**

STT	Ký hiệu chủng	Hình ảnh khuẩn lạc	Hình ảnh cuống sinh-bào tử	Kết quả định danh
1	TS1			<i>Aspergillus awamori</i> 100%
2	TS6			<i>Aspergillus fumigatus</i> 99.88%
3	TS5			<i>Aspergillus niger</i> 99.51%
4	TĐ4.2			<i>Curvularia eragrostidis</i> 100%
5	TĐ5			<i>Aspergillus sydowii</i> 99,88%



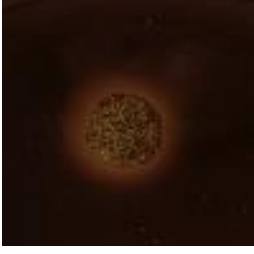




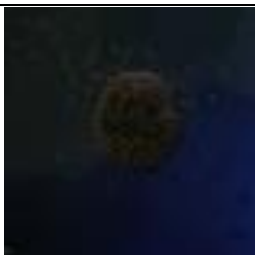

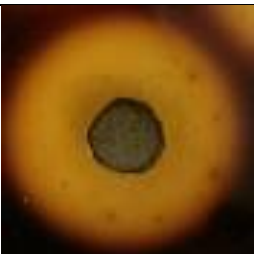



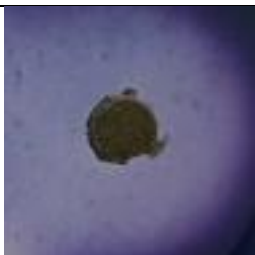











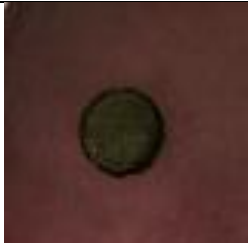

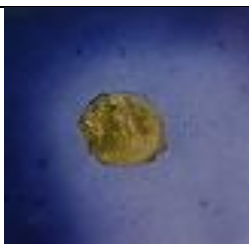





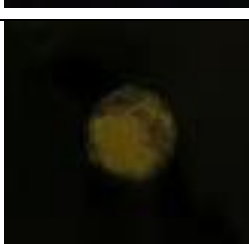
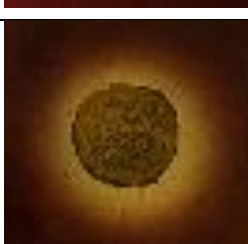




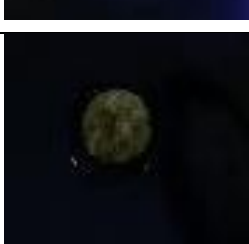
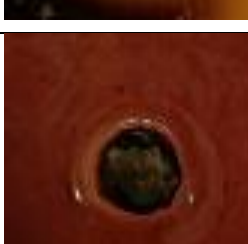
6	TĐ6.1			<i>Rhizopus oryzae</i> 100%
7	TĐ6.2			<i>Fusarium equiseti</i> 100%
8	TĐ7			<i>Curvularia umbiliciformis</i> 100%
9	TĐ11.1			<i>Aspergillus austroafricanus</i> 100%
10	TĐ12.1			<i>Aspergillus austroafricanus</i> 100%
11	TĐ12.2			<i>Aspergillus flavus</i> 100%

12	TĐ12.3			<b><i>Penicillium chrysogenum</i></b> <b>100%</b>
13	TS10.1			<b><i>Trichoderma atroviride</i></b> <b>99,89%</b>

**Phụ lục 3: Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng nấm phân lập**

**Bảng 3.1.** Hình ảnh thử nghiệm khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng nấm phân lập

STT	Kí hiệu chủng	Cellulase	Amylase	Laccase
1	TS1			
2	TS6			
3	TS5			
4	TĐ4.2			
5	TĐ5			
6	TĐ6.1			

7	TD6.2			
8	TD7			
9	TD11.1			
10	TD12.1			
11	TD12.2			
12	TD12.3			
13	TS10.1			



**Bảng 3.2.** Kết quả khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng nấm phân lập

STT	Kí hiệu chủng	Đường kính trung bình của vòng phân giải (mm)		
		Cellulase	Amylase	Laccase
1	TS1	+	-	+
2	TS6	+	+	-
3	TS5	+	-	-
4	TĐ4.2	12,25	12,56	15,75
5	TĐ5	11,09	16,58	17,03
6	TĐ6.1	16,05	+	5,39
7	TĐ6.2	6,10	+	3,02
8	TĐ7	-	-	-
9	TĐ11.1	12,15	4,11	3,23
10	TĐ12.1	-	-	-
11	TĐ12.2	+	-	4,48
12	TĐ12.3	+	3,10	4,47
13	TS10.1	+	5,58	8,05

**Ghi chú:** “-”: Không có vòng phân giải  
“+”: Có vòng phân giải <3mm

**Phụ lục 4: Trình tự gen ITS của 13 chủng nấm phân lập***Aspergillus awamori* TS1

CCCGCCAAGACGGGATTCTCACCCCTCTCTGACGGCCCGTTCCAGGGCA  
 CTTAGACGGGGGCCGCACCCAAAGCATCCTCTGCAAATTACAATGCGGA  
 CTCCGAAGGAGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCG  
 TTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAGAATG  
 GTTGAAAACGTCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTACAGAGCATGTGACA  
 AAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGG  
 GCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGC  
 TTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAG  
 GGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAAT  
 TCACATTAGTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAA  
 GAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATTCAATCAACTCAGACT  
 GCACGCTTTCAGACAGTGTTCGTGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGCC  
 CGGGGGGCAGAGGCGCCCCCGGCGGCCGACAAGCGGGCGGGCCCCGCC  
 GAAGCAACAGGGTACAATAGACACGGATGGGAGGTTGGGCCCAAAGGA  
 CCCGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTT  
 ACGACTTTTTACTTCTCTAAATGACCGGGTTTGACCAACTTTCCGGCTC  
 TGGGGGGTTCGTTGCCAACCTCCTGAGCCAGTCCGAAGGCCTCACC

*Aspergillus niger* TS5

GCCCGTTCCAGAGGCACTTAGACGGGGGCCGCACCCAAAGCATCCTCTG  
 CAAATTACAATGCGGACTCCGAAGGAGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCT  
 TGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCGGTTGGTTTCTTTTCT  
 CCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGG  
 TCAACCTGGAAAGAATGGTTGGAAAACGTCGGCAGGCGCCGGCCAATC  
 CTACAGAGCATGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGT  
 GCCGCGCTGCCTTTCGGGCCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGGCGACC  
 CAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCAT  
 GCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGAT  
 TCACTGAATTCTGCAATTACATTAGTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTC  
 ATCGATGCCGGAACCAAGAAATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGC  
 ATTCAATCAACTCAAAGTGCACGCTTTCAGACAGTGTTCGTGTTGGGGTC  
 TCCGGCGGGCACGGGCCCCGGG

*Aspergillus fumigatus* TS6

CCGTCCCAGACGGGATTCTCACCCCTCTATGACGGCCCGTTCCAGGGCAC  
 TTAGACGGGGGCTGCACCCGAAGCATCCTCTGCAAATTACAACGCGGAC  
 CCCGAAGGGGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGT  
 TACTGAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCTCCTCCGCTTATTGATATGCTTA  
 AGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTAGAAAAATAA  
 AGTTGGGTGTCGGCTGGCGCCGGCCGGGCCTACAGAGCAGGTGACAAA  
 GCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGC  
 CCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGGGGGCCCAACACACAAGCCGTGCTT  
 GAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGG

GGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTC  
 ACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGA  
 GATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTGATTACGATAATCAACTCAGACTGC  
 ATACTTTCAGAACAGCGTTCATGTTGGGGTCTTCGGCGGGCGCGGGCCC  
 GGGGGCGCAAGGCCTCCCCGGCGGCCGTTCGAAACGGCGGGCCCCGCCGA  
 AGCAACAAGGTACGATAGACACGGGTGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCC  
 CTCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTAC  
 GACTTTTACTTCCTCTAAATGACCGGGTTTGACCAACTTCCGGCTCTGG  
 GGAGTCGTTGCCAACTCCCCTGAGCCA

*Trichoderma atroviride* TS10.1

ATTGAATGGCTCAGTGAGGCGTCCGGACTGGCCCAGAGAGGTGGGCAA  
 CTACCACTCAGGGCCGGAAAGCTCTCCAAACTCGGTCATTTAGAGGAAG  
 TAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTAA  
 CCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACCATACCAAACCTGTTGCC  
 TCGGCGGGGTACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCC  
 GCCGGAGGGACCAACCAAACCTTTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTA  
 TTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAAACTTTCAACA  
 ACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA  
 AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC  
 ATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCA  
 ACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGACCTCGGGAGCCCCT  
 AAGACGGGATCCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTC  
 TCCTGCGCAGTAGTTTGCACAACCTCGCACCCGGGAGCGCGGGCGGTCCAC  
 GTCCGTAAAACACCCAACCTTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGG  
 AATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCA  
 ACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATT  
 TGAAATCTGGCCCCTAGGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTG  
 GTGAGGTGCCGCCCGAGTTCCTGGAACGGGACGCCGCAGAGGGTGAG  
 AGCCCCGTCTGGCTGGCCACC

*Curvularia eragrostidis* TD4.2

AGGAACTTGGACCGCTAGCCAAAGCCAAAGCAGCCCTCTGCAAATTACA  
 ACTCGGACTCTGAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGTTGCCGCTTC  
 ACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCCTCCGCTTATTG  
 ATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAGTG  
 AGAAGAAGGTCTTGATGGATTGCTGGCCTCTTTAGCTAGTTGCAAGCGC  
 AAAAATGTGCTGCGCTCCGAAACCAGTAGGCCGGCTGCCAATCGTTTTA  
 AGGCGAGTCTTTGGGCAAAGCCAAAGACAAAACGCCCAACACCAAGC  
 AAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATA  
 CCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTG  
 CAATTCACACTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAA  
 CCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATGATTTACATTTGTTATACTG  
 ACGCTGATTGCAACTGCATAAAAAAGGTTTATGGTGTGGTCCTGGTGGC  
 GGGCGAACCCGCCCAGGAAACAACAAGTGCGCAAAGACATGGGTGAA  
 AAATAATTCAGCTTCCCCGCCAAAACCTGGCGGTTGCAGCCTTCATATTT  
 TTGTGTAATGATCCCTCCGCAGGTTACCTACGGAGACCTTGTTACGACT

TTTACTTCCTCTAAATGACCGAGTTTGACGAACTTTCCGGCTTGGGGTGG  
TCGTTGCCAACCTCCCCGAGCCAGTCCGAACGCCTCACTGAG

*Aspergillus sydowii* TĐ5

CCCTGCCCAAGACGGGATTCTCACCCCTCTCTGACGGCCCGTTCCAGAGG  
CACTTAGACAGGGGCGCACCCGAAGCATCCTCTGCAAATTACAACCTCG  
GACCCCGGAGGGGCGCAGATTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCG  
CCGTTACTGAGGCAATCCCGGTTGGTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATAT  
GCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCACCTGAAGAAA  
AATGGTTGGAGACGTCGGCTGGCGCCCGGGCCCTAGTCGAGCGGGT  
GACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACACGGTGCCGCGCTGCCTT  
TCGGGCCCCGTCCCCCGGGGGGACGACGCCAACACACAAGCCGGGC  
TTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATGCCAG  
GGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAAT  
TCACATTACTTATCGCAGTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAA  
GAGATCCATTGTTGAAAGTTTTGACTGATTTTATATTCAGACTCAGACTG  
CATCACTCTCAGGCATGAAGTTCAGTAGTCCCCGGCGGCTCGCCCCGA  
GGGGGTTCCCCGCCGAAGCAACAGTGTTAGGTATTCACGGGTGGGAGGT  
TGGGCGCCCGGAGGCAGCCCGCACTCAGTAATGATCCTTCCGCAGGTTC  
ACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTTTACTTCCTCTAAATGACCGGGTTT  
GACCAACTTTCCGGCGCGGGGGGGTTCGTTGCCAACCCCTCCTGCGCCAGT  
CCGAAGGCCTCACCGAGCCATCAATC

*Rhizopus oryzae* TĐ6.1

GCTCAAGCCAAAGACGGGATTCTCACCCCTCTATGATGCCCTGTTCCAAA  
GGACTTATTTACTCGGCTTGCCCTGGAAAACACTTCTACAGTCTACAATCC  
GGTTTAGCTAGGCCAAACAGGTTCCAACCTTTGAGCTCTTTCTCTTCACT  
CGCCGTTACTAGGGAAATCATTGTTATTTTCTTTTTCCTCCGCTTATTGATA  
TGCTTAAGTTCAGCGGGTAATCCCACCTGACTTCAGATCATAGTTTGAA  
AGTTGCTGGATTATACTCTTGTACTTTACTTCCTGGGCGAACCAAAGAAA  
AAGATCCTGAGACCAGCGTAATATTCCTGCCTAGCAAGCCAGACAGAAA  
ATCACACACATTTTAGGTGCTCACTGTAATAAAACAGCGATGCGACCCA  
TTACCACATAAAACAAATGTTATGTGTGGGTTTGTGATGATACTGAAGCA  
GGCGTACTCTATAGAAAAACCATAGAGTGCAAGCTGCGTTCAAAGACTC  
GATGATTCACTGAATATGCAATTCACACTAGTTATCGCACTTTGCTACGT  
TCTTCATCGATGCGGAGAACCAAGAGATCCATTGTTAAAAGTTGTTTTTTA  
TTAAACTTTATAATACTGAATTTCTAGGTTTATTATGAAGGGTGCTCCTG  
AAACCAGGAGTGGCATCGATCAAACCCAGATAGGTCTACCCATGACCA  
GTCTGAGTCTCTCAGCCAAATTTTCACAGTGTAGAAGCAATCACTTACCC  
CAGAGGAAACCCTAAGAGGTAAGGCGCTTTAACATAATTAATGATCCTT  
CCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTTTACTTCCTCTAAAT  
AGCCTAGTTTGCCATAGTTCTCTGCAGGAAATGACTGTTGCCAGTCAA  
TCCTACTGATCCCATATGCTCAC

*Fusarium equiseti* TĐ6.2

TCCAACCAGACGGGGCTCTCACCCCTCTATGGCGTCCCGTTCCAGGGAAC  
TCGGAAGGCACCGCATCAAAGCATCCTCTACAAATTACAACCTCGGGCC

CGAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACT  
 AGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTT  
 CAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAACATTCAGAAGTTGGGGTT  
 TTACGGCGTGGCCGCGACGATTACCAGTAACGAGGTGTATGATTACTAC  
 GCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCAATCGATTTGGGGAACGCGGGTTA  
 CCGCGAGTCCCAACACCAAGCTGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGA  
 ACAGGCATGCCC GCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGAT  
 TCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGCTG  
 CGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGAT  
 TTATTTGTTTGT TTTACTCAGAAGTTCCACTAAAACAGAGTTTAGGGGT  
 CCTCGGGCGGGCCGTCCCGTTTTACGGGGCGCGGGCTGATCCGCCGAGG  
 CAACGTATAGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGGTAAT  
 GATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCC  
 TCTAAATGACCGAGTTTGGAGAGCTTTCGGGCCCTGAGTGGTAGTTGCC  
 CACCTCTCTGGGCCAGTCCGGACGCCTCACTGAGCCATTCAA

*Curvularia umbiliciformis* TĐ7

GCGACCACGTACGGGATTCTCACCCCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGGAA  
 CTTGGACCGCTGCCAAAGCCAAAGCGCCCTCTGCAAATTACAACCTCGGA  
 CTCTGAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGTTGCCGCTTCACTCGCCG  
 TTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGCTT  
 AAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAACGTGAGAAGGAG  
 GCTTGATGGATTGCCGTTTTGCTGATGGCAAGCGCAAAAATGTGCTGCG  
 CTGCGAAACCAGAAAGGCCGGCTGCCAATCACTTTAAGGCGAGTCTTTG  
 GGCGACCAAAGACAAAACGCCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTAC  
 AAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAAT  
 GTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACGT  
 ATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTG  
 TTGAAAGTTGTAAATGATTTACATTGTTTGTACTGACGCTGATTGCAACT  
 GCATAAAAAGGTTTATTTGGTGGTCTGGTGGCGAGCGAACCCGCCCA  
 GGAAACAACAAGTGCGCAAAAGACAAGGGTAATAAAATACTCCAGCTG  
 CGGACAGCCTTCATATTGTATTGTGAATGATCCCTCCGCAGGTTACCT  
 ACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCTCTAAATGACCGAGTTTGACG  
 AACTTTCCGGCTTGGGGTGGTTCGTTGCCAACCTCCCCGAGCCAGTCCGA  
 ACGCCTCACTGAGCCATTC

*Aspergillus austroafricanus* TĐ11.1

GACGGGATTCTCACCCCTCTCTGACGGCCCGTTCCAGGGCACTTAGACAG  
 GGGCCGCACCCGAAGCATCCTCTGCAAATTACAACCTCGGACCCCGGAGG  
 GGCCAGATTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGGGG  
 CAATCCCGGTTGGTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGC  
 GGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGAAGAAAAATGGTTGGACG  
 TCGGCTGGCGCCCGGCCGCTAAATCGAGCGGGTGACAAAGCCCCAT  
 ACGCTCGAGGACCGGACACGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGGCCCGTCCC  
 CCGGGGGGGACGACGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGATGGGCAGCA  
 ATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATGCCAGGGGGCGCAATGT  
 GCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTAT

CGCAGTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTT  
 GAAAGTTTTGACTGATTTTATATTCAGACTCAGACTGCATCACTCTCAGG  
 CATGAAGTTCAGTAGTCCCCGGCGGGCGCGCCCCCGAGAGGGGCTCCCCGC  
 CGAAGCAACAGTGTTAGGTAGTCACGGGTGGGAGGTTGGGCGCCCCGAA  
 GGCAGCCCCGACTCAGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAAC  
 CTTGTTACGACTTTTACTTCTCTAAATGACCGGGTTTGACCAACTTTCC  
 GGCGCGGGGGGGTTCGTTGCCAACCTCCTGCGCCAGTCCGAAGGCCTCA  
 CCGAGCC

*Aspergillus austroafricanus* TĐ12.1

GACGGGATTCTCACCTCTCTGACGGCCCGTTCCAGGGCACTTAGACAG  
 GGGCCGCACCCGAAGCATCCTCTGCAAATTACAACCTCGGACCCCGGAGG  
 GGCCAGATTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGGGG  
 CAATCCCGGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGC  
 GGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGAAGAAAAATGGTTGGACG  
 TCGGCTGGCGCCCGGCCGCCCTAAATCGAGCGGGTGACAAAGCCCCAT  
 ACGCTCGAGGACCGGACACGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCCGTCCC  
 CCGGGGGGGACGACGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGATGGGCAGCA  
 ATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATGCCAGGGGGGCGCAATGT  
 GCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTTAT  
 CGCAGTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTT  
 GAAAGTTTTGACTGATTTTATATTCAGACTCAGACTGCATCACTCTCAGG  
 CATGAAGTTCAGTAGTCCCCGGCGGGCGCGCCCCCGAGAGGGGCTCCCCGC  
 CGAAGCAACAGTGTTAGGTAGTCACGGGTGGGAGGTTGGGCGCCCCGAA  
 GGCAGCCCCGACTCAGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAAC  
 CTTGTTACGACTTTTACTTCTCTAAATGACCGGGTTTGACCAACTTTCC  
 GGCGCGGGGGGGTTCGTTGCCAACCTCCTGCGCCAGTCCGAAGGCCTCA  
 CCGAGCC

*Aspergillus flavus* TĐ12.2

CTCTGACGGCCCGTTCCAGGGCACTTAGACAGGGGCCGCACCCGAAGCA  
 TCCTCTGCAAATTACAATGCGGACCCCGAAGGAGCCAGCTTTCAAATTT  
 GAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCGGTTGGTTTC  
 TTTTCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGA  
 TCCGAGGTCAACCTGGAAAAAGATTGATTTGCGTTCGGCAAGCGCCGGC  
 CGGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGAC  
 GCGGTGCCGCCGCTGCCTTTGGGGCCCGTCCCCCCCCGGAGAGGGGACGA  
 CGACCCAACACACAAGCCGTGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGAC  
 AGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTC  
 GATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACACTAGTTATCGCATTTTCGCTGCG  
 TTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTG  
 ATTGCGATAACAATCAACTCAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTCGTGG  
 TGTCTCCGGCGGGCGCGGGCCCCGGGGCTGAGAGCCCCCGGCGGCCATG  
 AATGGCGGGCCCCGCGAAGCAACTAAGGTACAGTAAACACGGGTGGGA  
 GGTGGGCTCGCTAGGAACCCTACACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGT  
 TCACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTTTACTTCTCTAAATGACCGGGT

TTGACCAACTTTCCGGCCCTGGGGGGTCGTTGCCAACCCCTCCTGGGCCA  
GTCCGAAGGCCTCACCGAGCC

*Penicillium chrysogenum* TĐ12.3

CTGGCTCAGGAGGGTTGGCAACGACCCCCCAGAGCCGGAAAGTTGGTC  
AAACTCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG  
TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACC  
TCCCACCCGTGTTTATCGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTCACGG  
CCGCCGGGGGGGCATCCGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACACA  
AACGAACTCTTGTCTGAAGATTGCAGTCTGAGTACTTGACTAAATCAGT  
TAAAAC TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGC  
AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA  
GTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTC  
CGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCTCTCGCCC  
CCCGCTTCCGGGGGGCGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCG  
GTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGC  
GCCCCGCCGGCGAACACCATCAATCTTAACCAGGTTGACCTCGGATCAGG  
TAGGGATAACCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAA  
ACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCA  
AATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCCGCATTGTAATTTGCAGAGGAT  
GCTTCGGGAGCGGCCCCCATCTAAGTGCCCTGGAACGGGGCCGTCATAGA  
GGG



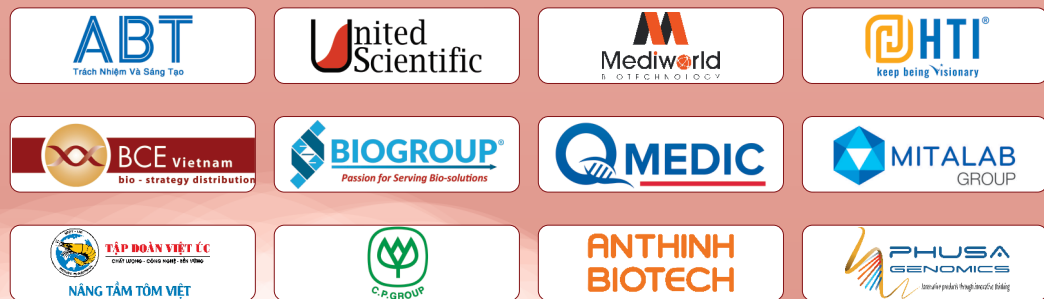
# BÁO CÁO KHOA HỌC PROCEEDINGS

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024  
NATIONAL BIOTECHNOLOGY CONFERENCE 2024

## TÀI TRỢ KIM CƯƠNG



## TÀI TRỢ VÀNG



## TÀI TRỢ BẠC



ĐẠI HỌC HUẾ  
NHIỀU TÁC GIẢ

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024  
NATIONAL BIOTECHNOLOGY CONFERENCE 2024  
Công nghệ gen; Công nghệ hóa sinh và protein; Công nghệ tế bào; Công nghệ vi sinh, thực phẩm và môi trường; Công nghệ sinh học nông nghiệp; Công nghệ sinh học y dược; Y học tái tạo và trị liệu tế bào

NXB ĐẠI HỌC HUẾ



ĐẠI HỌC HUẾ  
NHIỀU TÁC GIẢ

# BÁO CÁO KHOA HỌC PROCEEDINGS

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024  
NATIONAL BIOTECHNOLOGY CONFERENCE 2024

Thành phố Huế, ngày 25 - 26 tháng 9 năm 2024

Công nghệ gen; Công nghệ hóa sinh và protein; Công nghệ tế bào;  
Công nghệ vi sinh, thực phẩm và môi trường; Công nghệ sinh học nông nghiệp;  
Công nghệ sinh học y dược; Y học tái tạo và trị liệu tế bào



NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC HUẾ



22. SÀNG LỌC VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG SINH L-LACTIC ACID CỦA CHỦNG VI KHUẨN <i>Lactobacillus plantarum</i> P7. Lê Thị Ánh Tuyết, Hoàng Phương Hà, Nguyễn Kim Thoa, Nguyễn Thị Minh, Bùi Hương Giang, Trần Xuân Khôi, Đào Thị Ngọc Anh, Hoàng Minh Khuê, Chu Nhật Huy .....	686
23. PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH NẤM SỢI TRÊN BỀ MẶT SƠN TƯỜNG PHÒNG THỬ NGHIỆM TẠI HÒA LẠC. Nguyễn Thị Kim Thanh, Đỗ Thị Tuyền, Trần Khánh Linh, Nguyễn Thị Hiếu Thu, Nguyễn Việt Thắng, Georgiy M Bukharev, Ngô Cao Cường .....	691
24. PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH CHỦNG VI NẤM <i>Monascus</i> sp. SINH TỔNG HỢP CITRININ THẤP. Nguyễn Thị Thùy Trang, Đạo Nữ Diệu Hồng, Nguyễn Thị Dung, Bùi Lê Khả Tú, Võ Nguyễn Thanh Thảo, Nguyễn Văn Toàn, Hà Thị Loan .....	698
25. ỨNG DỤNG BỨC XẠ GAMMA (TỪ NGUỒN COBALT-60) XỬ LÝ NẤM MỐC TRÊN SẢN PHẨM NÓN THỦ CÔNG MỸ NGHỆ LÀM TỪ CỎ. Hoàng Thanh Phi Hùng, Cao Văn Chung, Nguyễn Thị Lý, Lê Thị Nhật Anh, Nguyễn Đức Huy .....	705
26. ASSESSMENT OF YEAST EFFICACY IN CONTROLLING <i>Botrytis cinerea</i> YU2403, THE CAUSE OF POST-HARVEST DECAY IN STRAWBERRIES. Nguyen Thi Tam, Nguyen Van Tu, Le Thi Loan, Nguyen Thi Thu Ngan, Tran Kim Diep, Nguyen Thi Ngoc Nhi, Vo Hoai Hieu.....	711
27. ANTI-BACTERIAL ABILITY OF ROSEMARY ESSENTIAL OIL ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ). Tran Thi Minh, Tran Phi Hoang .....	717
28. ĐẶC TÍNH PROBIOTIC CỦA BÀO TỬ VI KHUẨN <i>Shouchella clausii</i> ( <i>Bacillus clausii</i> ) BCLA. Nguyễn Hoàng Minh Đức, Nguyễn Văn Năm, Đào Thị Lương .....	721
29. NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN SẢN PHẨM THAY THẾ SỮA TỪ GẠO VÀ CHUỐI ĐỊNH HƯỚNG CHO NGƯỜI DỊ ỨNG LACTOSE. Hà Thị Dung, Nguyễn Quỳnh Giang, Trịnh Thị Nguyệt, Cao Thị Huệ.....	727
30. EFFECTS OF SUBSTITUTION OF HEAT-MOISTURE TREATED UNPOLISHED RED RICE ON PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF COMPOSITE FLOUR, <i>IN VITRO</i> DIGESTIBILITY AND QUALITY OF BREAD. Nguyen Thi Kieu Linh, Chau Minh Thuan, Mai Nguyen Tram Anh, Nguyen Ngoc Thanh Tien, Pham Van Hung.....	734
31. PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF COMPOSITE FLOUR AND QUALITY OF BREAD SUPPLEMENTED WITH HEAT-MOISTURE TREATED MUNG BEAN POWDER. Nguyen Thi Cam Nhi, Nguyen Ngoc Thanh Tien, Mai Nguyen Tram Anh, Chau Minh Thuan, Pham Van Hung.....	740
32. ẢNH HƯỞNG CỦA THỜI GIAN LÊN MEN VÀ NỒNG ĐỘ ĐƯỜNG ĐẾN CHẤT LƯỢNG VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA NƯỚC UỐNG KOMBUCHA LÁ ỔI RỪNG ( <i>Psidium guajava</i> L.). Đặng Thị Ngọc Dung, Nguyễn Minh Trung, Nguyễn Quang Vinh .....	746
33. PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG THUỘC NHÓM VI KHUẨN SINH ACID LACTIC VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM <i>Candida albicans</i> . Lê Phương Linh, Hồ Thị Quỳnh, Lê Sỹ Phan Anh, Lê Thị Hải Yến, Nguyễn Thanh Hòa.....	754
34. ĐÁNH GIÁ ĐẶC TÍNH PROBIOTICS VÀ KHÁNG KHUẨN CỦA CÁC CHỦNG <i>Lactobacillus plantarum</i> D3 VÀ <i>Lactobacillus plantarum</i> D5. Dương Diệu Linh, Nguyễn Thùy My, Lê Thị Hải Yến, Lê Sỹ Phan Anh, Nguyễn Thanh Hòa .....	760
35. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG CỦA DẦU DỪA VÀ DỊCH CHIẾT TỎI ĐỐI VỚI NẤM MEN GÂY HẠI <i>Candida tropicalis</i> NM1 PHÂN LẬP TỪ TRÁI VẢI <i>Litchi chinensis</i> Sonn. SAU THU HOẠCH. Nguyễn Lê Huy Khanh, Phạm Thị Ái Niệm, Nguyễn Thị Thu Huyền .....	765
36. ĐÁNH GIÁ HIỆN TRẠNG MÔI TRƯỜNG ĐẤT VÀ ĐẶC ĐIỂM NHÓM VI KHUẨN BẢN ĐỊA CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY DẦU TRONG ĐẤT NHIỄM DẦU VEN BIỂN VỊNH CAM RANH, KHÁNH HOÀ. Đỗ Thị Tuyền, Nguyễn Kim Thùy, Trần Thị Thanh Thủy, Nguyễn Thị Kim Thanh, Đinh Thị Thu Trang, Trịnh Ngọc Hoàng, Nguyễn Thị Thanh Lợi, Phí Quyết Tiến, Ngô Cao Cường .....	771
37. ẢNH HƯỞNG CỦA CÔNG ĐOẠN TIỀN XỬ LÝ VÀ THANH TRÙNG ĐẾN NƯỚC UỐNG LÊN MEN TỪ TRÁI GIÁC ( <i>Cayratia trifolia</i> L.). Đoàn Thị Kiều Tiên, Huỳnh Nguyễn Như Quỳnh, Huỳnh Thanh Càn, Huỳnh Thị Ngọc Mi .....	779
38. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤM <i>Aspergillus sydowii</i> TĐ5 PHÂN LẬP TỪ HÒM GỖ CỦA MỘT SỐ HOẠT CHẤT KHÁNG NẤM. Trần Khánh Linh, Nguyễn Vũ Hùng, Nguyễn Văn Đại, Quách Ngọc Tùng, Ngô Cao Cường .....	784
39. HIỆU QUẢ CỦA VIỆC BỔ SUNG NITƠ ĐẾN KHẢ NĂNG PHÂN HỦY HYDROCACBON DẦU MỖ TRONG ĐẤT/CÁT Ô NHIỄM CỦA TẬP HỢP CHỦNG NẤM MEN. Nguyễn Thị Diễm Quỳnh, Nguyễn Thị Yên, Nguyễn Minh Phương, Trần Hương Ly, Đinh Văn Tài, Kiều Thị Quỳnh Hoa .....	790
40. NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG PVA-GEL TỔNG HỢP TRONG XỬ LÝ NƯỚC THẢI CHẾ BIẾN THỦY SẢN. Phan Thế Anh, Nguyễn Thị Đông Phương, Nguyễn Hoàng Trung Hiếu .....	796

## ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤM *ASPERGILLUS SYDOWII* TĐ5 PHÂN LẬP TỪ HÒM GỖ CỦA MỘT SỐ HOẠT CHẤT KHÁNG NẤM

Trần Khánh Linh<sup>1,2</sup>, Nguyễn Vũ Hùng<sup>4</sup>, Nguyễn Văn Đại<sup>4</sup>, Quách Ngọc Tùng<sup>2,3</sup>, Ngô Cao Cường<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga, Bộ Quốc phòng

<sup>2</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Việt Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup>Viện Công nghệ sinh học, Việt Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>4</sup>Công ty TNHH MTV Cơ điện và Vật liệu nỏ 31

### TÓM TẮT

Nấm sợi *Aspergillus sydowii* được biết tới là một trong những tác nhân chính gây ra hiện tượng mục rữa hay phá hủy gỗ và các sản phẩm làm từ gỗ. Nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng ức chế nấm *A. sydowii* của các hoạt chất preventol,  $\alpha$ -bromocinnamaldehyde ( $\alpha$ -BCA), đồng sulfat ( $\text{CuSO}_4$ ) và chế phẩm AM-QS (chứa 3 hoạt chất trên với tỷ lệ 1:2:2). Chủng nấm TĐ5 được phân lập từ hòm gỗ bị mục nát được định danh là *A. sydowii* bằng phương pháp quan sát hình thái và phân tích trình tự gen ITS. Đặc biệt, nấm *A. sydowii* TĐ5 sinh enzyme ngoại bào như cellulase, amylase và laccase với đường kính vòng phân giải lần lượt là  $15,6 \pm 0,3$  mm,  $17,3 \pm 0,2$  mm,  $20,8 \pm 0,5$  mm, tương ứng. Thử nghiệm khả năng ức chế nấm cho thấy các hoạt chất preventol,  $\alpha$ -BCA,  $\text{CuSO}_4$  và chế phẩm AM-QS đều có khả năng ức chế sự nảy mầm của bào tử nấm *A. sydowii* TĐ5 với giá trị MIC lần lượt là 0,04 mg/L, 10 mg/L, 600 mg/L và 1%. Trong đó, chế phẩm AM-QS thể hiện khả năng ức chế nấm vượt trội so với các đơn chất thành phần. Nghiên cứu này cung cấp cơ sở khoa học cho ứng dụng các hoạt chất trên trong việc bảo quản gỗ và các sản phẩm từ gỗ.

*Từ khóa:* *Aspergillus sydowii*, đồng sulfat, enzyme ngoại bào, kháng nấm, preventol,  $\alpha$ -bromocinnamaldehyde.

### MỞ ĐẦU

Vật liệu gỗ được sử dụng trong đa lĩnh vực như xây dựng, nội thất, sản xuất giấy và nhiều sản phẩm khác. Đặc biệt là trong quân đội, gỗ được gia công thành các hòm gỗ chuyên bảo quản các trang thiết bị, vật tư, khí tài, các chi tiết cũng như ống giấy bảo quản. Trong điều kiện khí hậu nhiệt đới ở Việt Nam rất thuận lợi cho vi sinh vật nói chung và nấm sợi nói riêng phát triển. Một số chi nấm thường xuất hiện trên vật liệu gỗ là *Aspergillus*, *Penicillium* và *Trichoderma* (Trần Ngọc Trang *et al.*, 2021). Khi nấm sợi phát triển trên một số vật liệu như gỗ, bìa carton hay giấy, chúng sẽ sinh tổng hợp các enzyme ngoại bào phân hủy thành phần của vật liệu gỗ là các polymer phức tạp như hemicellulose, cellulose và lignin thành dạng dinh dưỡng đơn giản và dễ hấp thụ như đường và acid amin để có thể sinh trưởng và phát triển (Trần Ngọc Trang *et al.*, 2021). Điều này gây ra hiện tượng mục rữa, thay đổi cấu trúc, đặc tính ban đầu của vật liệu.

Các hóa chất có chứa ion đồng như đồng sunfat, oxit đồng, đồng naphthenat,... là các chất ức chế nấm điển hình tác động vào quá trình hô hấp của tế bào nấm do có ái lực với các nhóm hóa học khác nhau trong tế bào của nấm, đặc biệt là với các nhóm thiol, dẫn đến sự phá hủy chức năng không đặc hiệu của protein và enzyme (Reinprecht *et al.*, 2008). Ngoài ra, cơ chế tương tự cũng được tìm thấy ở các hợp chất asen, 2- phenylphenol (preventol), pentachlorophenol và các hợp chất phenolic khác (Reinprecht *et al.*, 2008). Hiện nay, xu hướng tìm đến các hoạt chất diệt vi sinh vật như vi khuẩn, nấm đảm bảo an toàn, thân thiện với môi trường có nguồn gốc tự nhiên đang được quan tâm. Cinnamaldehyde, thành phần chính trong tinh dầu quế và các dẫn xuất của nó ( $\alpha$ -bromocinnamaldehyde,  $\alpha$ -chlorocinnamaldehyde, và  $\alpha$ -methylcinnamaldehyde) có hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase mạnh, gây độc và gây đột biến tế bào nấm (Cui *et al.*, 2015). Tuy nhiên, chưa có nhiều thử nghiệm đánh giá khả năng ức chế nấm gây hại trên các vật liệu hòm gỗ sử dụng trong quân đội.

Nghiên cứu này tập trung đến đánh giá đặc tính sinh học của chủng nấm TĐ5 phân lập từ hòm gỗ bị phân hủy. Đồng thời, các thử nghiệm hoạt tính ức chế *A. sydowii* TĐ5 bởi  $\alpha$ -BCA,  $\text{CuSO}_4$  và chế phẩm AM-QS cũng được thực hiện. Kết quả nghiên cứu này tạo tiền đề phát triển các nghiên cứu khác nhằm nâng cao độ bền của gỗ trong điều kiện nhiệt đới tại Việt Nam và cũng như khí tài sử dụng trong quân đội.

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Chủng giống

Chủng nấm TĐ5 được phân lập từ mẫu hòm gỗ thu thập tại tỉnh Đồng Nai và được lưu giữ tại Trung tâm Nhiệt đới Việt Nga, Bộ Quốc phòng. Chủng nấm được bảo quản và hoạt hóa trên môi trường Czapek–Dox (Ngo *et al.*, 2021).

Preventol,  $\alpha$ -BCA và  $\text{CuSO}_4$  dạng tinh thể được mua từ hãng Sigma-Aldrich. Chế phẩm dung dịch AM-QS được tạo thành bởi 3 đơn chất preventol,  $\alpha$ -BCA,  $\text{CuSO}_4$  theo tỷ lệ 1:2:2. Một số hóa chất dùng trong môi trường nuôi cấy có xuất xứ Trung Quốc, Việt Nam.

## Phương pháp

### Nghiên cứu đặc điểm phân loại của chủng nấm sợi

Tiến hành hoạt hóa lại chủng nấm lên môi trường thạch Czapek–Dox, sau 5 ngày nuôi ở  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  đem ra quan sát hình thái khuẩn lạc. Xác định hình dạng tế bào bằng cách làm tiêu bản soi dưới kính hiển vi quang học Zeiss Axiocam 503 Color Camera Unit với độ phóng đại 400 lần. Để phân loại đến loài, chủng nấm TD5 được khuếch đại gen vùng bảo thủ ITS bằng cặp mồi ITS1 và ITS4 thông qua phản ứng PCR (Ngo *et al.*, 2021). Sản phẩm PCR tinh sạch sau đó được giải trình tự tại Công ty Macrogen (Hàn Quốc). Cây phát sinh loài dựa trên trình tự ITS được xây dựng bằng phần mềm MEGA 11.

### Xác định khả năng sinh enzym ngoại bào

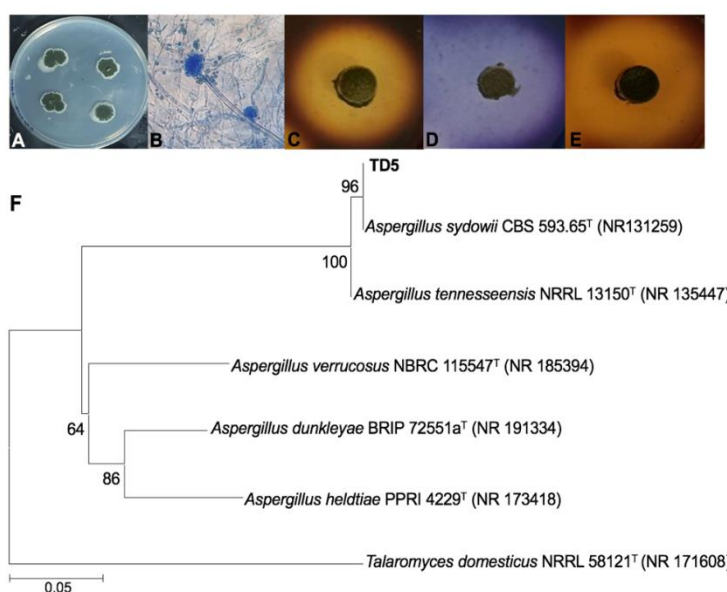
Phương pháp thoi thạch được sử dụng để kiểm tra khả năng sinh các enzym ngoại bào như cellulase, amylase và laccase của chủng nấm thử nghiệm (Abdallah *et al.*, 2019; Adegoke *et al.*, 2019; Anita *et al.*, 2013). Chủng nấm TD5 được nuôi cấy trên đĩa Czapek–Dox và sau khoảng 4-5 ngày tiến hành đục thoi thạch đường kính 4 mm, đặt thoi lên các đĩa chứa các cơ chất tương ứng 1% carboxymethyl cellulose (CMC), 0,5% tinh bột và 0,05% guaiacol. Các đĩa đặt trong tủ lạnh 4-6 giờ và sau đó nuôi cấy trong tủ ẩm ở nhiệt độ  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  trong 24 giờ. Hoạt tính enzym được xác định bằng đường kính vòng phân giải cơ chất đặc hiệu.

### Đánh giá khả năng kháng nấm của các hoạt chất thử nghiệm

Khảo sát khả năng ức chế thông qua việc xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC của các hoạt chất lên bào tử nấm bằng kính hiển vi điện tử được tiến hành theo mô tả trước đây (Xu *et al.*, 2007). Mật độ bào tử nấm được xác định bằng buồng đếm hồng cầu và điều chỉnh nồng độ dịch về mật độ bào tử là  $1 \times 10^5$  CFU/mL. Các phiến kính lõm vô trùng được chuẩn bị và bổ sung 30  $\mu\text{l}$  môi trường Czapek–Dox đã pha sẵn hoạt chất với các nồng độ khác nhau trộn đều với 2  $\mu\text{l}$  dịch bào tử ở nồng độ  $1 \times 10^5$  CFU/mL. Các mẫu thử nghiệm được bổ sung với các nồng độ hoạt chất kháng nấm khác nhau như sau:  $\text{CuSO}_4$  (0 - 600mg/L), preventol (0 - 0,05 mg/L),  $\alpha$ -BCA (0 - 30mg/L) và chế phẩm AM-QS (0 - 2%). Phiến kính đã cấy đặt trên giấy lọc đặt trong 1 đĩa Petri và ủ ở  $30^\circ\text{C}$ . Theo dõi khả năng nảy mầm của bào tử sau 24h, và 48h bằng kính hiển vi điện tử. Các bào tử được xác định là nảy mầm nếu chiều dài ống mầm bằng hoặc lớn hơn chiều dài bào tử. Nồng độ ức chế tối thiểu MIC được xác định là nồng độ hoạt chất tối thiểu ức chế trên 90% sự phát triển của bào tử nấm. Phần trăm ức chế nảy mầm của bào tử nấm (SGI) được tính theo công thức:  $(\text{GC-GT})/\text{GC} \times 100$ . Trong đó, với GC, GT lần lượt là số lượng bào tử nảy mầm của mẫu đối chứng và mẫu chứa hoạt chất.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Phân loại của chủng nấm thử nghiệm TD5



**Hình 1. Đặc điểm hình thái (A,B), khả năng sinh cellulase, amylase, laccase (C,D,E) và cây phát sinh loài dựa theo phân tích trình tự ITS của chủng nấm TD5 và một số chủng nấm dùng để tham chiếu**

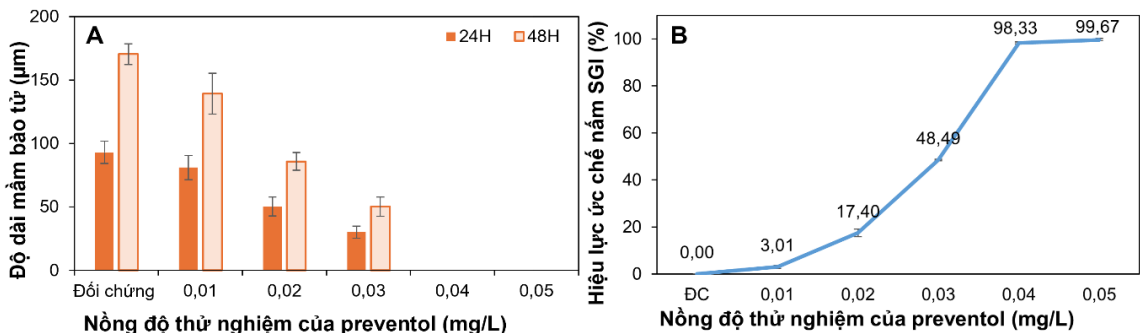
Khuẩn lạc chủng TĐ5 dạng tỏa tròn, bên trong màu xanh rêu, viền ngoài màu trắng trên môi trường Czapek–Dox. Bề mặt khuẩn lạc dạng nhung mịn hoặc xốp nhẹ, không sinh giọt tiết và có tạo sắc tố xanh ra môi trường (Hình 1A). Quan sát dưới kính hiển vi cho thấy hệ sợi có vách ngăn (Hình 1B). Cuống nhẵn, đầu cuống có bông hình cầu hoặc chùy ngắn, khắp bề mặt đính nhiều thể bình 2 lớp: lớp 1 hình con quay và lớp 2 hình elip. Bào tử tròn, có gai, màu lục, đính từng chùm dây trên mỗi thể bình. Dựa vào đặc điểm hình thái, chủng TĐ5 được xác định thuộc chi *Aspergillus* (Lâm Thị Việt Hà *et al.*, 2009). Phân tích trình tự vùng ITS cho thấy chủng TĐ5 có độ tương đồng cao và tạo thành 1 nhóm riêng biệt với *Aspergillus sydowii* với giá trị bootstrap đạt 96% (Hình 1F). Trình tự ITS của chủng TĐ5 được đăng kí trên cơ sở dữ liệu Genbank với mã số truy cập OR135783.1.

**Đánh giá khả năng sinh enzym ngoại bào của chủng nấm TĐ5**

Nghiên cứu thử nghiệm trên 3 loại cơ chất khác nhau CMC, tinh bột và guaiacol nhằm đánh giá khả năng phân hủy gỗ của chủng TĐ5. Kết quả cho thấy chủng này có khả năng sinh cả cellulase, amylase và laccase với đường kính vòng phân giải lần lượt là  $15,6 \pm 0,3$  mm,  $17,3 \pm 0,2$  mm,  $20,8 \pm 0,5$  mm, tương ứng (Hình 1C,D,E). Anita đã chỉ ra rằng *Aspergillus* là một trong các chi nấm sinh tổng hợp cellulase mạnh (Anita *et al.*, 2013). Bên cạnh đó, nhóm nghiên cứu của Yomna K Abdallah xác định *Aspergillus sydowii* là nguồn sản xuất laccase (Abdallah *et al.*, 2019). Điều này phù hợp với nguồn phân lập *A. sydowii* TĐ5 là từ hòm gỗ bị mục.

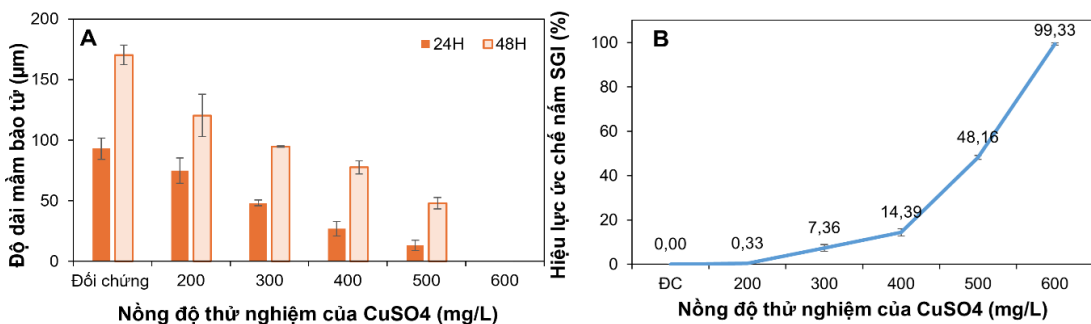
**Khả năng ức chế chủng TĐ5 của preventol, đồng sulfat và  $\alpha$ -bromocinamaldehyde**

Mẫu đối chứng không chứa chất ức chế cho thấy sự phát triển mạnh sau 24 h, theo dõi độ dài sợi nấm đạt  $93,00 \pm 8,77$   $\mu$ m và tăng gần gấp đôi sau 48 h, chứng tỏ bào tử nấm nảy mầm và phát triển bình thường trong điều kiện thí nghiệm (Hình 3) (Hình 2). Khi khảo sát khả năng ức chế sự nảy mầm của bào tử bằng preventol, đồ thị thể hiện rõ xu hướng giảm độ dài mầm bào tử và tăng hiệu lực ức chế nảy mầm khi nồng độ preventol tăng. Các hình ảnh trên kính hiển vi cho thấy sự giảm số lượng bào tử nảy mầm và độ dài mầm bào tử theo độ tăng nồng độ preventol. Ở nồng độ 0,05 mg/L, hầu như không có bào tử nào nảy mầm. MIC của preventol đối với nấm sau 48 giờ là 0,04 mg/L tương ứng với hiệu lực ức chế SGI là 98,33%. Kết quả này gần như là tương đồng khi so với dữ liệu của Sabatini ghi nhận với nồng độ ức chế tối thiểu đối với *Aspergillus niger* là 0,25 – 0,5 mg/L (Sabatini *et al.*, 2021).



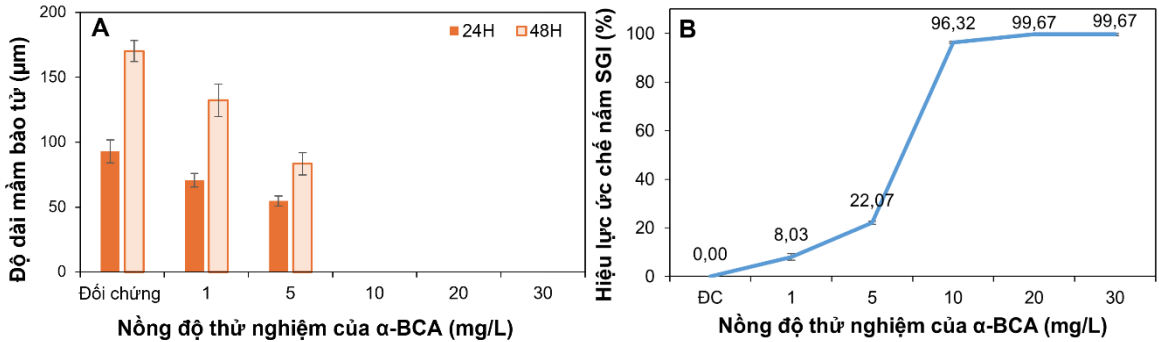
Hình 2. Tác động của preventol lên sự nảy mầm của bào tử (A) và hiệu lực kháng nấm của preventol sau 48 giờ (B)

Với chất thử nghiệm là đồng sulfat, kết quả cho thấy MIC ở 600 mg/L, tại đây hiệu lực kháng nấm SGI đạt 99,33% (Hình 3). Kết quả này cho thấy nồng độ đồng sulfat trong thí nghiệm cao hơn nhiều lần so với thử nghiệm kháng nấm *Alternaria citri* sử dụng hạt nano CuO (80 mg/L) (Sardar *et al.*, 2022). Sự khác biệt này có thể đến từ kích thước của hạt và đối tượng thử nghiệm. Tuy vậy đồng sulfat vẫn cho khả năng ức chế nảy mầm bào tử với sự chênh lệch sự phát triển của sợi nấm qua thời gian và nồng độ CuSO<sub>4</sub>.



Hình 3. Tác động của CuSO<sub>4</sub> lên sự nảy mầm của bào tử (A) và hiệu lực kháng nấm của CuSO<sub>4</sub> sau 48 giờ (B)

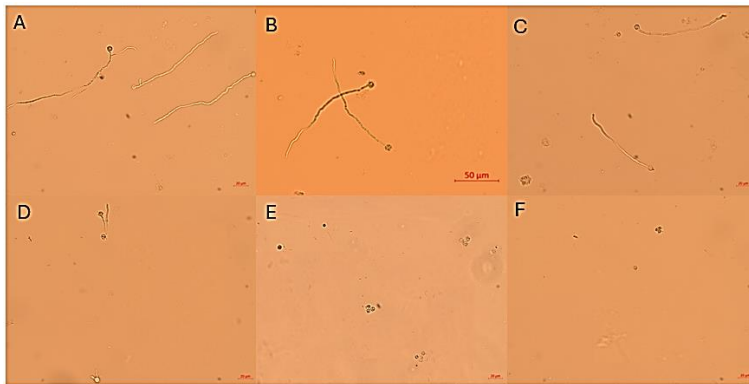
Đối với hoạt chất  $\alpha$ -BCA, với dải nồng độ 1, 5, 10, 20 và 30 mg/L, so với sự phát triển của sợi nấm ở mẫu đối chứng, độ dài của sợi nấm cũng đã có sự thay đổi rõ rệt khi có mặt chất ức chế. Ghi nhận sau 48 h kiểm tra thấy độ dài sợi nấm giảm từ  $132,40 \pm 12,47$   $\mu\text{m}$  xuống đến gần như không có sự nảy mầm của bào tử ở nồng độ 10 mg/L với hiệu lực ức chế đạt trên 90%, xác định được MIC của  $\alpha$ -BCA là 10 mg/L (Hình 4). Thử nghiệm 6 dẫn xuất của cinnamaldehyde trên nấm *Penicillium digitatum* cho thấy duy nhất 250 mg/L 4-methoxy cinnamaldehyde thể hiện hoạt tính ức chế nấm cao nhất với hiệu lực SGI đạt 92,87% (Gan *et al.*, 2020). Nhóm nghiên cứu cũng quan sát được hiện tượng phồng lên không đều và làm rỗng các tế bào sợi nấm, màng tế bào bị vỡ dần làm rò rỉ thể vùi tế bào chất dẫn đến chết tế bào khi có sự tác động của dẫn xuất này (Gan *et al.*, 2020).



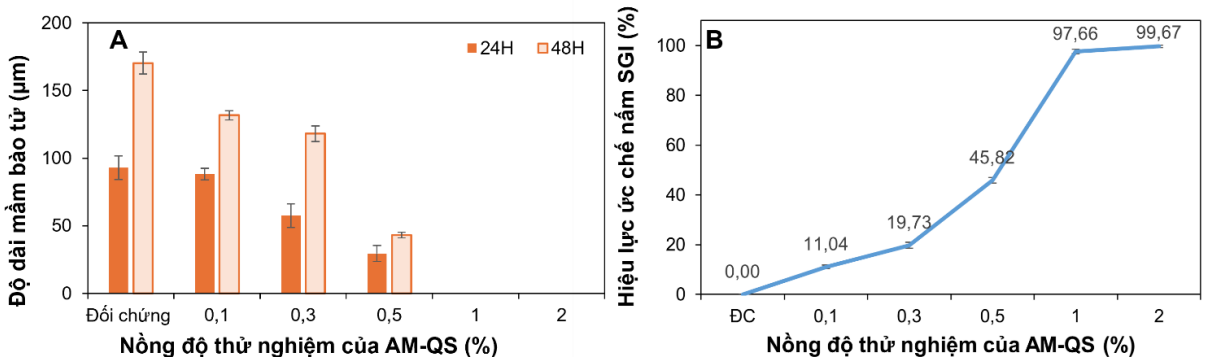
Hình 4. Tác động của  $\alpha$ -BCA lên sự nảy mầm của bào tử (A) và hiệu lực kháng nấm của  $\alpha$ -BCA sau 48 giờ (B)

#### Khả năng ức chế nấm của chế phẩm AM-QS

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá hoạt tính ức chế nấm TD5 gây hại của chế phẩm AM-QS chứa hỗn hợp 3 chất  $\text{CuSO}_4$ , preventol và  $\alpha$ -BCA. Kết quả Hình 5 cho thấy bào tử chủng nấm TD5 bị ức chế mạnh bởi chế phẩm AM-QS ở nồng độ từ 0,5 – 2% (Hình 5). Tại nồng độ AM-QS là 0,5%, hiệu lực ức chế đạt 90%. Tại nồng độ 1% AM-QS ức chế tới 97,66% sự nảy mầm của bào tử chủng nấm TD5, ở các nồng độ cao hơn 1% AM-QS ghi nhận khả năng ức chế hoàn toàn bào tử nấm thử nghiệm.



Hình 5. Khả năng nảy mầm của bào tử tại các nồng độ ức chế của chế phẩm AM-QS sau 48h. A-F lần lượt tương ứng với mẫu thử nghiệm tại AM-QS 0; 0,1; 0,3; 0,5; 1; 2 %



Hình 6. Tác động của  $\alpha$ -BCA lên sự nảy mầm của bào tử (A) và hiệu lực kháng nấm của  $\alpha$ -BCA sau 48 giờ (B)

Có thể nói, chế phẩm AM-QS thể hiện khả năng ức chế nấm vượt trội so với các đơn chất thành phần. Điều này có thể là do sự hiệp đồng tác dụng giữa các hoạt chất, tạo ra hiệu quả ức chế mạnh mẽ hơn. Cụ thể là sự kết hợp của preventol,  $\alpha$ -BCA và đồng sulfat đã tạo ra một phổ tác động rộng hơn, ảnh hưởng đến nhiều quá trình sống của nấm, bao gồm cả sự nảy mầm của bào tử và sự phát triển của sợi nấm.

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã chứng minh nấm *Aspergillus sydowii* TĐ5 có khả năng sinh các enzym ngoại bào cellulase, amylase, laccase, và là nguyên nhân chính gây ra hiện tượng mục rữa gỗ. Đồng thời, nghiên cứu cũng đã đánh giá khả năng kháng nấm của các hoạt chất preventol-0,04 mg/L,  $\alpha$ -bromocinnamaldehyde-10 mg/L, đồng sulfat-600 mg/L và chế phẩm AM-QS-1% đến sự nảy mầm của bào tử nấm *Aspergillus sydowii* TĐ5. Trong đó, chế phẩm AM-QS tăng khả năng ức chế nấm khoảng 100 lần so với các đơn chất thành phần. Kết quả này là cơ sở khoa học quan trọng cho việc ứng dụng các hoạt chất trên trong công tác bảo quản các sản phẩm gỗ nói chung và hòm gỗ bảo quản khí tài nói riêng.

**Lời cảm ơn:** Công trình này được thực hiện nhờ sự tài trợ kinh phí của đề tài cấp Bộ Quốc phòng "Nghiên cứu chế tạo chế phẩm đặc chủng AM-QS chống nấm mốc cho vật liệu gốc xenlulo ứng dụng trong công tác bảo quản vũ khí trang bị", mã số 2022.11.41.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdallah YK, Estevez AT, Tantawy DEDM, Ibraheem AM, Khalil NM (2019). Employing laccase-producing *Aspergillus sydowii* NYKA 510 as a cathodic biocatalyst in self-sufficient lighting microbial fuel cell. *J Microbiol Biotechnol*, 29 (12): 1861-1872.
- Adegoke S, Odibo FJP (2019). Production, purification and characterization of  $\alpha$ -amylase of *Aspergillus sydowii* IMI 502692. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 20: 1050-1058.
- AnitaBB, Ramya D (2013). Biodegradation of Carboxymethyl Cellulose using *Aspergillus flavus*.
- Lâm Thị Việt Hà, Nguyễn Bảo Lộc, Nguyễn Thu Mai (2009). Phân lập và định danh sơ bộ một số loài *Aspergillus* trên hạt đậu phộng ở chợ Xuân Khánh- tp Cần Thơ. *Tạp chí Khoa học* 2009, 11: 301-309.
- Sabatini L, Ciandrini E, Campana R (2021). Antifungal Activity of Vinegar on Different Types of Artistic Rear Canvases. *EC Microbiology*, 17: 03-10.
- Ngo CC, Nguyen QH, Nguyen TH, Quach NT, Dudhagara P, Vu THN, Le TTX, Le TTH, Do TTH, Nguyen VDJAS (2021). Identification of fungal community associated with deterioration of optical observation instruments of museums in Northern Vietnam. *Applied Sciences*, 11 (12): 5351.
- Reinprecht L (2008). Ochrana Dreva (Wood Protection). *Handbook, Technical University in Zvolen - Slovakia*.
- Sardar M, Ahmed W, Al Ayoubi S, Nisa S, Bibi Y, Sabir M, Khan MM, Ahmed W, Qayyum AJS (2022). Fungicidal synergistic effect of biogenically synthesized zinc oxide and copper oxide nanoparticles against *Alternaria citri* causing citrus black rot disease. *Saudi J Biol Sci*, 29 (1): 88-95.
- Trần Ngọc Trang, Lê Thị Song, Lê Cao Chiến (2021). Nghiên cứu đánh giá khả năng kháng nấm mốc cho vật liệu xây dựng. *Tạp chí Vật liệu và Xây dựng*, 11 (6).
- Xu J, Zhao X, Han X, Du YJPB, Physiology (2007). Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi in vitro. *Pestic Biochem Phys*, 87 (3): 220-228.
- Cui Y, Liang G, Hu YH, Shi Y, Cai YX, Gao HJ, Chen QX, Wang Q (2015). Alpha-Substituted Derivatives of Cinnamaldehyde as Tyrosinase Inhibitors: Inhibitory Mechanism and Molecular Analysis. *J Agr Food Chem*.
- Gan Z, Huang J, Chen J, Nisar MF, Qi W (2020). Synthesis and Antifungal Activities of Cinnamaldehyde Derivatives against *Penicillium digitatum* Causing Citrus Green Mold. *J Food Quality*.

## EVALUATION ON ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST *ASPERGILLUS SYDOWII* TD5 ISOLATED FROM ROTTING WOODEN CRATE OF BIOACTIVE COMPOUNDS

Tran Khanh Linh<sup>1,2</sup>, Nguyen Vu Hung<sup>4</sup>, Nguyen Van Dai<sup>4</sup>, Quach Ngoc Tung<sup>2,3</sup>, Ngo Cao Cuong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Joint Vietnamese - Russia Tropical Science and Technology Research Center

<sup>2</sup>Graduate University of Science and Technology - Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi

<sup>3</sup>Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>4</sup>31 Electro mechanism and Explosive One Member Ltd., Co.

### SUMMARY

Filamentous fungus *Aspergillus sydowii* is known to be one of the main biological agents with the potential to decay or decompose wood and wood-based products. This study aims to evaluate antifungal potential against *A. sydowii* of the 4 compounds such as preventol,  $\alpha$ -bromocinnamaldehyde ( $\alpha$ -BCA), copper sulfate ( $\text{CuSO}_4$ ) and AM-QS product as a mixture of 3 mentioned compounds. The fungal strain TD5 isolated from rotting wooden crates was identified as *A. sydowii* by ITS gene sequence analysis. In particular, *A. sydowii* TD5 produced cellulase, amylase, and laccase with hydrolysis zones of  $15.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ,  $17.3 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ,  $20.8 \pm 0.5 \mu\text{m}$ , respectively. The antifungal tests showed that preventol,  $\alpha$ -BCA,  $\text{CuSO}_4$  and AM-QS product were able to inhibit the spore germination of *A. sydowii* TD5 with MIC values of 0.04 mg/l, 10 mg/l, 600 mg/l, and 1%, respectively. In particular, the AM-QS product showed superior antifungal ability against *A. sydowii* TD5 compared to the other compounds. This study provides a scientific basis for the application of the antifungal compounds for the preservation of wood and wood-based products.

**Keywords:** Antifungal, *Aspergillus sydowii*, copper sulfate, extracellular enzyme, preventol,  $\alpha$ -bromocinnamaldehyde.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0982010336; Email: ngocaocuong2011@gmail.com



P-ISSN 1859-4794 \* E-ISSN 2615-9929

TẬP 66, SỐ 5, THÁNG 5 NĂM 2024  
VOLUME 66, NUMBER 5, MAY 2024

TẠP CHÍ  
**KHOA HỌC  
& CÔNG NGHỆ**  
Vietnam Journal of Science and Technology - MOST VIỆT NAM





## HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

### Chủ tịch

Châu Văn Minh - Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, Việt Nam

### Thành viên

Nguyễn Việt Anh - Trường Đại học Xây dựng, Việt Nam

Bùi Chí Bửu - Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam, Việt Nam

Vũ Dũng - Hội Tâm lý học Việt Nam, Việt Nam

Trần Thọ Đạt - Trường Đại học Kinh tế Quốc dân, Việt Nam

Nguyễn Đình Đức - Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Vũ Minh Giang - Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Trương Nam Hải - Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, Việt Nam

Trần Thanh Hải - Trường Đại học Mở - Địa chất, Việt Nam

Phạm Huy Khang - Trường Đại học Giao thông Vận tải, Việt Nam

Phạm Gia Khánh - Hội Ghép tạng Việt Nam, Việt Nam

Hồ Đắc Lộc - Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Nguyễn Thị Mỹ Lộc - Trường Đại học Giáo dục, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Bành Tiến Long - Đại học Bách khoa Hà Nội, Việt Nam

Lê Quan Nghiệm - Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Mai Trọng Nhuận - Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Trần Hữu Phúc - Hội đồng Giáo sư Nhà nước, Việt Nam

Nguyễn Thanh Phương - Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

Nguyễn Thanh Thủy - Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Phạm Hùng Việt - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

### Tổng biên tập

Nguyễn Thị Hương Giang - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

### Phó Tổng biên tập

Phạm Thị Minh Nguyệt - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

### Ban biên tập

Phí Công Thường - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Vũ Văn Hùng - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Ninh Văn Diện - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Lê Thị Bắc - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Tăng Xuân Bình - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Lê Thị Tuyết Hạnh - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Trương Thị Thảo Dương - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

## EDITORIAL BOARD

### Chairman

Chau Van Minh - Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam

### Members

Nguyen Viet Anh - National University of Civil Engineering, Vietnam

Bui Chi Bui - Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam, Vietnam

Vu Dung - Vietnam Association of Social Psychology, Vietnam

Tran Tho Dat - National Economics University, Vietnam

Nguyen Dinh Duc - University of Engineering and Technology, VNU, Hanoi, Vietnam

Vu Minh Giang - VNU, Hanoi, Vietnam

Truong Nam Hai - Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam

Tran Thanh Hai - Hanoi University of Mining and Geology, Vietnam

Pham Huy Khang - University of Transport and Communications, Vietnam

Pham Gia Khanh - Vietnam Society of Organ Transplantation, Vietnam

Ho Duc Loc - Ho Chi Minh City University of Technology, Vietnam

Nguyen Thi My Loc - University of Education, VNU, Hanoi, Vietnam

Banh Tien Long - Hanoi University of Science and Technology, Vietnam

Le Quan Nghiem - University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, Vietnam

Mai Trong Nhuon - VNU, Hanoi, Vietnam

Tran Huu Phuc - The State Council for Professorship, Vietnam

Nguyen Thanh Phuong - Can Tho University, Vietnam

Nguyen Thanh Thuy - University of Engineering and Technology, VNU, Hanoi, Vietnam

Pham Hung Viet - University of Science, VNU, Hanoi, Vietnam

### Editor-in-Chief

Nguyen Thi Huong Giang - Ministry of Science and Technology, Vietnam

### Deputy Editor-in-Chief

Pham Thi Minh Nguyet - Ministry of Science and Technology, Vietnam

### Managing Editors

Phi Cong Thuong - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Vu Van Hung - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Ninh Van Dien - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Le Thi Bac - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Tang Xuan Binh - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Le Thi Tuyet Hanh - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Truong Thi Thao Duong - Ministry of Science and Technology, Vietnam

## TÒA SOẠN

113 Trần Duy Hưng - Cầu Giấy - Hà Nội - Việt Nam

Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794

Email: [khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn](mailto:khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn)

Tạp chí điện tử: [b.vjst.vn](http://b.vjst.vn)

## GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

Số 459/GP-BTTTT ngày 20/7/2021

Số 50/GP-BTTTT ngày 01/02/2023

Giá: 18000<sup>d</sup>

## EDITORIAL OFFICE

113 Tran Duy Hung Str. - Cau Giay Dist. - Hanoi - Vietnam

Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794

Email: [khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn](mailto:khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn)

E-journal: [b.vjst.vn](http://b.vjst.vn)

## PUBLICATION LICENCE

No. 459/GP-BTTTT 20<sup>th</sup> July 2021

No. 50/GP-BTTTT 1<sup>st</sup> February 2023

# Hiệu quả hiệp đồng kháng nấm gây hại vật liệu gỗ của hoạt chất preventol, $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde và đồng sunfat

Nguyễn Vũ Hùng<sup>1</sup>, Trần Khánh Linh<sup>2,3</sup>, Nguyễn Thị Thanh Lợi<sup>3,4</sup>, Lê Trọng Tài<sup>5</sup>, Ngô Cao Cường<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Công ty TNHH MTV Cơ điện và Vật liệu số 31, phường Bãi Bông, TP Phố Yên, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam

<sup>2</sup>Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga, Bộ Quốc phòng, 63 Nguyễn Văn Huyền, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

<sup>3</sup>Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

<sup>4</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

<sup>5</sup>Cục Phát triển Công nghệ và Đổi mới Sáng tạo, Bộ Khoa học và Công nghệ, 113 Trần Duy Hưng, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 8/12/2023; ngày chuyển phân biện 12/12/2023; ngày nhận phân biện 29/12/2023; ngày chấp nhận đăng 4/1/2024

## Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm đánh giá khả năng kháng các chủng nấm gây hại gỗ mạnh (*in vitro*) của 3 đơn hoạt chất preventol,  $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde ( $\alpha$ -BCA) và đồng sunfat, đồng thời đánh giá hiệu quả hiệp đồng của công thức chế phẩm AM-QS chứa hỗn hợp 3 đơn chất này. Ở dạng đơn chất, preventol (1 mg/l) ức chế 90% đường kính nấm và ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của các chủng nấm ở nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là 5 mg/l. Đối với  $\alpha$ -BCA, đường kính khuẩn lạc nấm giảm 93,5% ở nồng độ 10 mg/l và giá trị MIC được xác định là 20 mg/l. Với đồng sunfat, đường kính khuẩn lạc nấm giảm 94,9% ở 10 mg/l và MIC là 20 mg/l. Ở dạng kết hợp, chế phẩm AM-QS ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của các chủng nấm ở nồng độ 2%, tương đương 0,1 mg/l (preventol), 0,4 mg/l ( $\alpha$ -BCA) và 0,4 mg/l (đồng sunfat). Như vậy, hiệu quả hiệp đồng kháng nấm của chế phẩm AM-QS với nồng độ mỗi chất sử dụng giảm 50 lần so với khi thử nghiệm với từng đơn chất. Việc ứng dụng kết hợp các đơn chất kháng nấm có thể giúp tăng cường hiệu quả bảo vệ vật dụng bằng gỗ hay những vật liệu có nguồn gốc từ gỗ.

**Từ khóa:**  $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde, đồng sunfat, hiệu quả hiệp đồng, kháng nấm, preventol.

**Chỉ số phân loại:** 4.6

## 1. Đặt vấn đề

Trong thực tế, nấm mốc dễ xâm nhiễm trên gỗ hay các vật liệu có nguồn gốc cellulose (giấy, sách báo...) [1] gây mục nát, hư hỏng, giảm tuổi thọ và mất giá trị thẩm mỹ của công trình và các hiện vật trưng bày. Nhiều nấm mốc được tìm thấy thuộc các chi như *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Penicillium* và *Trichoderma* [2]. Một số enzyme sinh ra trong quá trình trao đổi chất như amylase, cellulase, protease, laccase giúp nấm mốc sinh trưởng trên vật liệu gỗ, trong đó cellulase là một trong những enzyme chính phân hủy cellulose tạo nguồn carbon cho nấm [3].

Các giải pháp nhằm bảo quản các vật dụng bằng gỗ dựa trên phương pháp vật lý và hóa học đã được ứng dụng. Tuy nhiên, các hoạt chất hóa học và các chế phẩm của chúng được sử dụng phổ biến hơn vì vừa có hiệu quả cao, vừa dễ thực hiện. Các nhóm hóa chất được sử dụng như: phenol, aldehyde, isothiazolinones và alcohol. Preventol là một hợp chất hữu cơ, dạng rắn, màu trắng là dẫn xuất của phenol có chức năng diệt nấm và bào tử của nấm thuộc chi *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Curvularia*... Cơ chế hoạt động kháng nấm của preventol bằng cách thâm nhập qua màng tế bào chất của nấm nhờ liên kết với thành phần ergosterol của màng tế bào, tạo thành lỗ nhỏ trên màng nhằm dẫn các chất trong nội bào ra ngoài, tích tụ nội bào ở nồng độ cao của hóa chất sử dụng và gây phá hủy màng

[4]. Hoạt chất  $\alpha$ -BCA là một trong những dẫn xuất halogen của cinnamaldehyde, thành phần chính trong tinh dầu quế có hoạt tính kháng nấm mốc phổ rộng, ít gây độc cho người sử dụng. Chất  $\alpha$ -BCA được báo cáo không chỉ ức chế các loại nấm mốc như *Candida albicans*, *Aspergillus niger* và *Penicillium chrysogenum*, mà còn ức chế được nhiều loài vi khuẩn như *Bacillus subtilis*, *Sarcia lutea*, *Staphylococcus aureus* [5, 6]. Cơ chế hoạt động kháng nấm của  $\alpha$ -BCA nhờ vào khả năng thâm nhập qua màng tế bào và bề mặt bào tử, phản ứng với cả amino acid của phân tử protein và nhóm purine và pyrimidine của phân tử ADN, ARN [7, 8]. Hợp chất đồng sunfat hút ẩm, được sử dụng như thuốc kháng nấm hoặc diệt các loại sâu bệnh, diệt cỏ. Hoạt động ức chế sự hình thành nấm mốc của đồng sunfat thông qua tác động ức chế quá trình hô hấp của tế bào hay quá trình đường phân [9]. Mặc dù đồng sunfat ít được sử dụng dạng đơn chất để bảo quản gỗ do dễ bị rửa trôi, có thể làm mất màu gỗ, song rất có hiệu quả trong các ứng dụng khi được kết hợp với các hợp chất đối kháng khác có tính cố định (ít bị rửa trôi) [10].

Hiện nay, thuốc hoặc các phân tử thể hiện tính hiệp đồng khi kết hợp với nhau, nghĩa là làm tăng cường một hoặc nhiều tác dụng của những loại thuốc đó hay tạo ra một hiệu ứng mới mà chỉ riêng nó không tạo ra được [5]. Chiến lược phát triển thuốc kết hợp được ứng dụng rộng rãi để điều trị bệnh với mục tiêu đạt được hiệu quả điều trị hiệp đồng,

\*Tác giả liên hệ: Email: cuongnc@vrtc.org.vn, ngoacaocuong2011@gmail.com

# Synergistic antifungal effect of preventol, $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde, and copper sulfate compounds against wood harmful fungi

Vu Hung Nguyen<sup>1</sup>, Khanh Linh Tran<sup>2,3</sup>,  
Thi Thanh Loi Nguyen<sup>3,4</sup>, Trong Tai Le<sup>5</sup>, Cao Cuong Ngo<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Electro Mechanism and Explosive One Member Company Limited,  
Bai Bong Ward, Pho Yen City, Thai Nguyen Province, Vietnam

<sup>2</sup>Joint Vietnamese - Russia Tropical Science and Technology Research Center,  
63 Nguyen Van Huyen Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

<sup>3</sup>Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology,

18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

<sup>4</sup>Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology,

18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

<sup>5</sup>State Agency for Technology and Innovation, Vietnam Ministry of Science and Technology,

113 Tran Duy Hung Street, Trung Hoa Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

Received 8 December 2023; revised 29 December 2023; accepted 4 January 2024

## Abstract:

The objective of the study is to evaluate the antifungal ability against wood harmful fungi (*in vitro*), of three active compounds: preventol,  $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde ( $\alpha$ -BCA), copper sulfate, and to evaluate the synergistic effect of a formulation AM-QS containing a mixture of these 3 compounds. As a single substance, preventol (1 mg/l) inhibited 90% of the fungal diameter and reached complete inhibition of the growth of fungal strains at the minimum inhibitory concentration (MIC) of 5 mg/l. For  $\alpha$ -BCA, the fungal colony diameter decreased by 93.5% at a concentration of 10 mg/l, and the MIC value was determined to be 20 mg/l. With copper sulfate, colony diameter was reduced by 94.9% at 10 mg/l and the MIC was 20 mg/l. In combination form, the AM-QS completely inhibited the growth of fungal strains at concentrations of 2% equivalent to 0.1 mg/l (preventol), 0.4 mg/l ( $\alpha$ -BCA), and 0.4 mg/l (copper sulfate). Thus, the synergistic antifungal effect of AM-QS preparation with the concentration of each substance used is reduced by 50 times compared to when tested with every single substance. Applying a combination of single antifungal substances could help to increase the effectiveness of protecting wooden objects or materials derived from wood.

**Keywords:**  $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde, antifungal, copper sulfate, preventol, synergistic effect.

**Classification number:** 4.6

giảm liều lượng và độc tính, giảm thiểu hoặc trì hoãn việc gây kháng thuốc [11]. Hiệu quả kháng nấm của hỗn hợp chất kháng nấm đã chỉ ra: tác dụng chống nấm mốc của các hóa chất được tăng cường và có hiệu quả cao hơn khi sử dụng riêng lẻ bởi không có hóa chất nào có thể phòng chống được tất cả các loại nấm mốc, giảm được nồng độ của các chất sử dụng so với đơn chất riêng lẻ. Điều này sẽ hạn chế dư lượng của hóa chất tồn tại trong môi trường đồng thời nâng cao hiệu quả sử dụng trong phòng chống nhiều loại nấm khác nhau [12].

Đối với gốc aldehyde, nghiên cứu về sự kết hợp giữa cinnamaldehyde và các chất kháng vi sinh vật khác đã chỉ ra khả năng chống lại cả các chủng nấm kháng và không kháng thuốc, chẳng hạn như sự kết hợp giữa cinnamaldehyde và fluconazole hoặc AmB (Amphotericin B) [13]. Các công thức hỗn hợp chất có thể chứa các thành phần chất có nguồn gốc tự nhiên và các hợp chất tổng hợp. L. Cai và cs (2020) [14] đã chỉ ra công thức hỗn hợp của chitosan và cinnamaldehyde ở các tỷ lệ mol khác nhau đã ức chế sự sinh trưởng nấm *A. niger* khác nhau từ 16,7% (ở tỷ lệ 0,5:1) đến 95,8% (ở tỷ lệ 3:1).

Việc đánh giá hiệu quả hiệp đồng kháng các loài nấm mốc gây hại chính của các chất kháng nấm khác nhau sẽ là cơ sở khoa học cho việc tạo ra những công thức hỗn hợp chất phòng trừ nấm hiệu quả và hạn chế những ảnh hưởng do dư thừa hóa chất được sử dụng. Trong nghiên cứu này, thử nghiệm khả năng ức chế các chủng nấm sợi gây hại gỗ với từng đơn hoạt chất preventol,  $\alpha$ -BCA và đồng sunfat và đánh giá hiệu quả hiệp đồng kháng nấm của chế phẩm AM-QS được kết hợp từ 3 hoạt chất trên với tỷ lệ thành phần được dựa vào giá trị ức chế tối thiểu của mỗi đơn chất ban đầu.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Nguyên, vật liệu

Preventol,  $\alpha$ -BCA và đồng sunfat dạng tinh thể (Sigma-Aldrich, Thermo scientific độ tinh khiết trên 98%). Chế phẩm AM-QS được tạo thành dưới dạng dung dịch chứa thành phần 3 đơn chất (preventol,  $\alpha$ -BCA và đồng sunfat), sao cho mỗi đơn chất đạt ngưỡng ức chế tối thiểu. Các chủng nấm chiếm ưu thế về số lượng phân lập trong các mẫu thu thập từ 3 miền Bắc - Trung - Nam (thuộc K602 - Thái Nguyên, K856 - Quảng Trị và K752 - Đồng Nai) được định danh và đăng ký mã số trên GenBank sử dụng trong các nghiên cứu. Môi trường Czapek-Dox dùng cho nuôi cấy và thử nghiệm ức chế nấm [15].

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Đặc điểm sinh học của các chủng nấm

Cây tùng chùng nấm đã thuần khiết trên đĩa thạch chứa môi trường Czapek-Dox, cắm lamên nghiêng, đặt đĩa thạch trong tủ nuôi ở nhiệt độ 28-30°C. Sau 72-120 giờ, lamên được lấy ra nhuộm màu và quan sát hình thái cuống sinh bào tử và bào tử dưới kính hiển vi quang học [16].



2.2.2. Xác định hoạt tính enzyme ngoại bào của các chủng nấm

Hoạt tính enzyme ngoại bào amylase, cellulase và laccase của các chủng nấm được xác định bằng phương pháp nuôi cấy nấm trên đĩa thạch Czapek-Dox chứa cơ chất tương ứng. Đặt miếng thạch nấm có đường kính 6 mm lên đĩa thạch Czapek-Dox được bổ sung cơ chất tương ứng 0,5% tinh bột, 1% CMC (Carboxymethyl cellulose), 0,05% Guaiacol. Đặt các đĩa nuôi cấy nấm vào tủ ẩm 30°C trong 24 giờ. Các chủng nấm thể hiện hoạt tính enzyme sẽ xuất hiện vòng sáng xung quanh khuẩn lạc sau khi hiện màu bằng dung dịch Lugol 1% [17]. Đo đường kính vòng phân giải (mm) trên đĩa thạch.

2.2.3. Đánh giá khả năng kháng nấm của các hợp chất thử nghiệm

Chuẩn bị dung dịch gốc ban đầu preventol,  $\alpha$ -BCA và đồng sunfat ở nồng độ 500 mg/l. Bổ sung từng dung dịch chất thử nghiệm vào môi trường Czapek-Dox sao cho nồng độ chất preventol trong thạch đạt 0,5, 1, 5, 10 và 25 mg/l; chất  $\alpha$ -BCA trong thạch 1, 5, 10, 20 và 50 mg/l; đồng sunfat trong thạch 2, 4, 6, 8, 10 và 20 mg/l. Đặt miếng thạch nấm thử nghiệm đường kính 6 mm ở tâm đĩa môi trường đã bổ sung chất kháng nấm. Nuôi cấy ở điều kiện 28±2°C trong 5 ngày. Kết quả kháng nấm được đánh giá bằng cách đo đường kính (mm) khuẩn lạc nấm sợi phát triển trên đĩa thạch. Mẫu đối chứng được tiến hành tương tự, môi trường không bổ sung chất kháng nấm. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần [18, 19].

2.2.4. Đánh giá khả năng kháng nấm của hỗn hợp chất thử nghiệm AM-QS

Chế phẩm AM-QS chứa 3 đơn chất preventol,  $\alpha$ -BCA và đồng sunfat ở nồng độ ức chế hoàn toàn sự phát triển của nấm sợi (từ kết quả thử nghiệm đơn chất). Tiến hành thử nghiệm AM-QS tương tự như với đơn chất, bổ sung AM-QS vào môi trường thạch với tỷ lệ 0,1, 0,5, 1, 2 và 5%. Đặt miếng thạch nấm thử nghiệm đường kính 6 mm ở tâm đĩa môi trường đã bổ sung chế phẩm kháng nấm. Nuôi cấy ở điều kiện 28±2°C trong 5 ngày. Kết quả kháng nấm được đánh giá bằng cách đo đường kính (mm) khuẩn lạc nấm sợi phát triển trên đĩa thạch. Mẫu đối chứng được tiến hành tương tự trong môi trường không bổ sung chất kháng nấm. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần [18, 19].

2.3. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần. Kết quả được tính toán bằng phần mềm Excel 2010 và trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± sai số chuẩn.

3. Kết quả và bàn luận

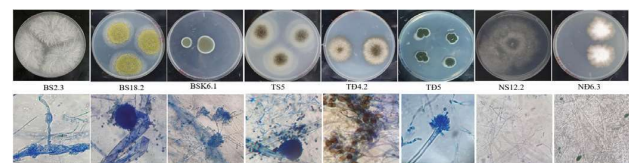
3.1. Đặc điểm các chủng nấm dùng trong thử nghiệm

Từ bộ sưu tập chủng nấm được phân lập trên bề mặt vật liệu gỗ từ 3 kho K603, K752 và kho K890 đã chọn được 8 chủng nấm gây hại điển hình có khả năng sinh các enzyme ngoại bào (amylase, cellulase và laccase) hoạt tính mạnh

nhất, có các đặc điểm sinh học được mô tả trong bảng 1 và hình 1. Các chủng nấm được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử, thuộc các chi *Aspergillus* (4 chủng: *A. flavus* BS18.2, *A. gracilis* BSK6.1, *A. niger* TS5, *A. sydowii* TD5), chi *Paraeuteypella* (1 chủng *P. citricola* BS2.3), chi *Curvularia* (1 chủng *C. eragrostidis* TD4.2), *Pestalotiopsis* (1 chủng *P. vismiae* NS12.2) và chi *Camarosporium* (1 chủng *C. brabeji* ND6.3).

Bảng 1. Đặc điểm sinh học của 8 chủng nấm được sử dụng trong nghiên cứu.

Chủng nấm và các đặc điểm sinh học	Hoạt tính enzyme (mm)		
	Amylase	Cellulase	Laccase
<i>Paraeuteypella citricola</i> BS2.3 (OR135779): Khuẩn lạc tỏa tròn, màu trắng, bề mặt bóng xò, tơ xốp. Không có giọt tiết, không sinh sắc tố. Bào tử trần, đa bào có vách ngăn, hình trứng/hình thoi.	16±1,34	22±1,67	26±1,72
<i>Aspergillus flavus</i> BS18.2 (OR135780): Khuẩn lạc tỏa tròn, màu vàng rêu, viền trắng và thưa, bề mặt dạng bột, xốp nhẹ. Không có giọt tiết, không sinh sắc tố. Cuống sinh bào tử trần, không màu, không phân nhánh, đỉnh phình to thành bong bóng cầu hoặc elip, bề mặt tủa đều các thể bình 1, 2 tầng. Bào tử hình cầu hoặc trứng, dạng trần.	10±0,95	18±0,78	16±0,59
<i>Aspergillus gracilis</i> BSK6.1 (OR135781): Khuẩn lạc tỏa tròn, vùng xanh lục xám, bột mịn. Không có giọt tiết, không tạo sắc tố. Cuống sinh bào tử trần, phân nhánh, đỉnh có bong nhỏ, đỉnh chùm thể bình dạng ngắn đều hướng lên song song dạng chổi. Bào tử tròn, dạng trần.	29±0,92	24±1,0	32±1,04
<i>Aspergillus niger</i> TS5 (OR135784): Khuẩn lạc có hệ sợi trắng dày mịn, bề mặt xốp bông, làm tẩm bào tử màu đen than. Không có giọt tiết, không sinh sắc tố. Cuống sinh bào tử không phân vách, trần, nhẵn, đầu cuống có bong phình to, đỉnh nhiều thể bình 2 tầng. Bào tử hình cầu, trần, đỉnh từng chùm.	7±0,87	20±0,98	16±1,30
<i>Curvularia eragrostidis</i> TD4.2 (OR135782): Khuẩn lạc phân vùng, từ màu đen xám đậm đến màu ghi trắng, bề mặt bóng, xò. Không có giọt tiết, không sinh sắc tố. Giá bào tử dạng trần, đơn, màu đỏ nâu. Bào tử áo dạng đơn, trần, 3 vách ngăn, ở đỉnh sợi, hình elip hoặc trứng.	11±1,23	16±1,45	19±1,10
<i>Aspergillus sydowii</i> TD5 (OR135783): Khuẩn lạc dạng tỏa tròn, màu lục rêu, viền trắng mịn, bề mặt dạng bột mịn hoặc xốp nhẹ. Không có giọt tiết, sinh sắc tố xanh. Cuống sinh bào tử không phân vách, trần, nhẵn, không màu, đầu cuống có bong phình to. Bào tử hình cầu, trần, đỉnh từng chùm dây trên mỗi thể bình.	17±0,89	15±1,04	20±0,97
<i>Pestalotiopsis vismiae</i> NS12.2 (OR135786): Khuẩn lạc dạng tỏa tròn, màu trắng, bóng mịn dạng len và hơi thưa mỏng ở tâm. Không có giọt tiết, không sinh sắc tố.	1±0,78	13±0,88	18±1,35
<i>Camarosporium brabeji</i> ND6.3 (OR135785): Khuẩn lạc trắng ở tâm, vàng nâu ở viền ngoài. Có các rãnh kéo từ tâm đến biên. Khuẩn lạc mọc tỏa các phía, không tròn đều. Mặt khuẩn lạc dạng bông mịn, xốp nhẹ, lõi ở tâm. Không có giọt tiết, không sinh sắc tố.	10±0,69	13±1,56	18±1,63



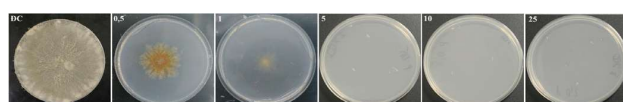
Hình 1. Hình thái khuẩn lạc (hình trên) và bào tử (hình dưới) của 8 chủng nấm phân lập thuần khiết từ vật liệu gỗ được sử dụng trong nghiên cứu.

### 3.2. Khả năng kháng nấm của preventol, $\alpha$ -BCA và đồng sunfat (in vitro)

Hoạt chất ức chế nấm preventol khi được thử nghiệm ở 5 nồng độ khác nhau từ 0,5, 1, 5, 10 đến 25 mg/l trên 8 chủng nấm gây hại vật liệu cellulose mạnh cho thấy sự ức chế sinh trưởng nấm. Sau 5 ngày sinh trưởng, các chủng nấm đều phát triển tốt ở mẫu đối chứng với đường kính khuẩn lạc khoảng 85-91 mm. Ở nồng độ thử nghiệm 0,5 mg/l, các chủng nấm đều có hiện tượng giảm rõ rệt đường kính khuẩn lạc dao động trong khoảng 21-25 mm. Khi tăng nồng độ lên 1 mg/l, nấm phát triển rất chậm, đường kính khuẩn lạc trung bình của các chủng nấm giảm trong khoảng 6,6-12,4 mm (giảm 90%). Từ 5 mg/l trở lên đã không ghi nhận sự hình thành khuẩn lạc của cả 8 chủng nấm thử nghiệm. Như vậy, tại nồng độ tối thiểu (MIC 5 mg/l), preventol đã ức chế hoàn toàn sự phát triển của cả 8 chủng nấm gây hại (bảng 2). Minh họa thử nghiệm của preventol trên chủng nấm gây hại *Camarosporium brabeji* ND6.3 ở hình 2.

**Bảng 2.** Khả năng kháng nấm của preventol ở nồng độ 0,5, 1, 5, 10 và 25 mg/l.

Các chủng nấm	Đường kính khuẩn lạc nấm ở các nồng độ (mm)					
	Đối chứng	0,5	1	5	10	25
<i>Paraeutypella citricola</i> BS2.2	91,7±0,46	21,4±0,51	8,4±0,53	0	0	0
<i>Aspergillus flavus</i> BS18.2	90,3±0,29	23,7±0,87	9,6±0,55	0	0	0
<i>Aspergillus gracilis</i> BSK6.1	89,5±0,50	22,9±0,45	6,6±0,81	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i> TSS	90,9±0,85	25,7±0,87	12,4±0,55	0	0	0
<i>Curvularia eragrostidis</i> TD4.2	87,6±0,53	21,1±1,05	6,6±1,07	0	0	0
<i>Aspergillus sydowii</i> TD5	85,5±0,50	22,3±0,70	8,4±0,69	0	0	0
<i>Pestalotiopsis vismiae</i> NS12.2	88,1±0,90	24,1±1,01	8,5±0,47	0	0	0
<i>Camarosporium brabeji</i> ND6.3	85±0,82	23,9±1,03	9,6±0,40	0	0	0



**Hình 2.** Thử nghiệm khả năng kháng nấm của preventol ở chủng *Camarosporium brabeji* ND6.3 với các nồng độ 0,5, 1, 5, 10 và 25 mg/l.

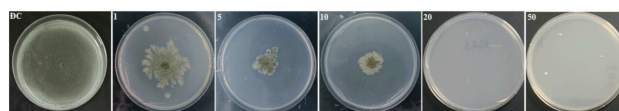
Nghiên cứu của J.W. Eckert và cs (1979) [20] đã chỉ ra độc tính mạnh của o-phenylphenol và các dẫn xuất của nó lên chủng nấm *Diplodia natalensis* và *Penicillium digitatum*. Sự thủy phân 2 dẫn xuất este, 2-biphenyl acetate và 2-biphenyl propionate, trong dịch nuôi cấy 2 chủng nấm trên dẫn đến sự tích lũy o-phenylphenol trong môi trường nuôi cấy và trên sợi nấm gây độc cho nấm. Công bố của H.N. Tumah (2005) [21] đã chỉ ra, 2-phenylphenol 1% có khả năng diệt một số chủng nấm sau 15 phút tiếp xúc với hoạt chất ở nồng độ 7  $\mu$ g/ml đối với chủng *C. albicans*, 15  $\mu$ g/ml với chủng *A. versicolor* và *A. corymbifera* và 30  $\mu$ g/ml với chủng *P. verrucosum* var. *cyclopium*.

Đối với chất kháng nấm  $\alpha$ -BCA, trong dải nồng độ được thử nghiệm từ 1, 5, 10, 20 đến 50 mg/l, ở mẫu đối chứng cả 8 chủng nấm đều phát triển mạnh và đạt kích thước khuẩn lạc khoảng 83-93 mm sau 5 ngày thử nghiệm. Khi các nồng độ

chất ức chế tăng dần 1-10 mg/l, ghi nhận kích thước khuẩn lạc trung bình giảm dần tương ứng 31,8 mm xuống còn 5,7 mm (giảm 93,5%). Từ nồng độ 20 mg/l không thấy sự hình thành khuẩn lạc nấm trên đĩa thạch trong thời gian nuôi cấy (bảng 3). Như vậy tại MIC 20 mg/l, hoạt chất kháng nấm  $\alpha$ -BCA đã ức chế hoàn toàn sự phát triển của cả 8 chủng nấm gây hại. Minh họa thử nghiệm của  $\alpha$ -BCA trên chủng nấm gây hại *Aspergillus sydowii* TD5 được thể hiện ở hình 3.

**Bảng 3.** Khả năng kháng nấm của  $\alpha$ -BCA ở các nồng độ 1, 5, 10, 20 và 50 mg/l.

Các chủng nấm	Đường kính khuẩn lạc nấm ở các nồng độ (mm)					
	Đối chứng	1	5	10	20	50
<i>Paraeutypella citricola</i> BS2.2	93,2±0,76	32,1±1,05	21,1±1,01	5±0,8	0	0
<i>Aspergillus flavus</i> BS18.2	92,1±0,90	29,7±1,22	24,3±1,04	5,2±1,04	0	0
<i>Aspergillus gracilis</i> BSK6.1	86,4±0,71	30,1±1,10	22,8±0,91	5,7±0,64	0	0
<i>Aspergillus niger</i> TSS	92,8±0,76	34,9±0,83	25,7±0,64	8,1±0,97	0	0
<i>Curvularia eragrostidis</i> TD4.2	87±1,50	31,8±0,80	17±1,00	5,8±0,72	0	0
<i>Aspergillus sydowii</i> TD5	86,3±0,79	33±0,90	22,4±1,42	5±0,75	0	0
<i>Pestalotiopsis vismiae</i> NS12.2	84,4±1,12	32,1±0,90	19,4±0,49	5,7±0,64	0	0
<i>Camarosporium brabeji</i> ND6.3	82,9±0,81	30,8±1,04	18,2±1,15	4,7±0,51	0	0



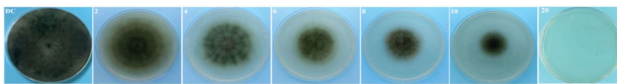
**Hình 3.** Thử nghiệm khả năng kháng nấm của  $\alpha$ -BCA trên chủng *Aspergillus sydowii* TD5 ở nồng độ 1, 5, 10, 20 và 50 mg/l.

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra khả năng kháng nấm mạnh của cinnamaldehyde [22-24]. Z. Gan và cs (2020) [22] đã chỉ ra tiềm năng kháng nấm bệnh *P. digitatum* của cinnamaldehyde và 6 chất dẫn xuất của nó thông qua sự có mặt của vòng kháng nấm. Trong đó, dẫn xuất 4-methoxy cinnamaldehyde có hoạt tính kháng nấm cao nhất với đường kính 32,3±0,35 mm, tiếp theo là cinnamaldehyde (31,4±0,57 mm), 2,4-dimethoxy cinnamaldehyde (29,4±0,57 mm), 4-methyl cinnamaldehyde (21,4±0,7 mm), 4-chloro cinnamaldehyde (20,5±0,71 mm), 4-bromo cinnamaldehyde (17,5±0,71 mm), and 4-nitro cinnamaldehyde (16,8±0,29 mm).

Khả năng ức chế các chủng nấm của đồng sunfat được thực hiện với 6 nồng độ từ 2, 4, 6, 8, 10 và 20 mg/l. Ở mẫu đối chứng cả 8 chủng nấm đều phát triển mạnh và đạt kích thước khuẩn lạc khoảng 86-93 mm sau 5 ngày thử nghiệm. Khi nồng độ đồng sunfat tăng lên từ 2, 4, 6, 8 và 10 mg/l, chất ức chế đã tác động lên sự sinh trưởng của sợi nấm làm giảm đường kính trung bình khuẩn lạc nấm xuống còn 4,5 mm (10 mg/l) tương ứng 94,9%. Tại nồng độ được thử nghiệm cao nhất 20 mg/l đã ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của nấm (bảng 4). Như vậy tại dải nồng độ thử nghiệm, đồng sunfat đã ức chế hoàn toàn sinh trưởng của 8 chủng nấm mốc ở nồng độ 20 mg/l. Minh họa thử nghiệm của đồng sunfat trên chủng nấm gây hại *Curvularia eragrostidis* TD4.2 được thể hiện ở hình 4.

**Bảng 4.** Khả năng kháng nấm của đồng sunfat ở nồng độ 2, 4, 6, 8, 10 và 20 mg/l.

Các chủng nấm	Đường kính khuẩn lạc nấm ở các nồng độ (mm)						
	Đối chứng	2	4	6	8	10	20
<i>Paratyphella citricola</i> BS2.2	89,9±1,91	62,4±1,34	52,2±0,92	35,4±0,35	22,6±1,77	3,8±0,21	0
<i>Aspergillus flavus</i> BS18.2	92,2±1,85	61,7±2,21	57,4±0,51	24,1±1,01	21,5±0,5	3,5±0,5	0
<i>Aspergillus gracilis</i> BSK6.1	86,8±0,59	60,3±0,79	51,6±2,35	36,3±0,38	24,3±0,64	5,3±0,7	0
<i>Aspergillus niger</i> TS5	92,6±0,71	70,7±1,54	54,7±1,1	36,7±0,7	24,9±1,01	6,1±1,05	0
<i>Curvularia eragrostidis</i> TD4.2	86,2±1,04	62,6±1,42	51,5±1,55	32,5±0,5	18,6±0,55	4,4±0,55	0
<i>Aspergillus sydowii</i> TD5	88,8±1,08	60,1±0,81	47±1,05	35,4±0,55	23,5±0,5	4±0,56	0
<i>Pestalotiopsis vismiae</i> NS12.2	88,6±2,23	62,2±0,21	53,4±0,71	33±0,55	22±1,00	4,4±0,31	0
<i>Camarosporium brabeji</i> ND6.3	85,9±0,42	64,1±0,46	52,1±0,81	32,5±1,32	24,5±0,70	4,1±0,42	0



**Hình 4.** Thử nghiệm khả năng kháng nấm của đồng sunfat ở chủng *Curvularia eragrostidis* TD4.2 với các nồng độ 2, 4, 6, 8, 10 và 20 mg/l.

Nghiên cứu của E.O. Oziengbe và cs (2012) [9] đã chỉ ra khả năng ức chế nấm bệnh thán thư trên cây xoài của đồng sunfat. Dưới điều kiện *in vitro*, chủng nấm bệnh *Colletotrichum gloeosporioides* bị ức chế sinh trưởng đáng kể đến 78,2% và sự nảy mầm của bào tử nấm 66,3% so với đối chứng, ở nồng độ 0,8 mg/l đồng sunfat. Với xu hướng sử dụng công nghệ nano, tác giả E.I. Laclette và cs (2022) [18] đã chỉ ra rằng, nano đồng (Cu-NP) có khả năng ức chế nấm sợi gây bệnh cho thực vật *Fusarium kuroshium*. Cu-NP ở các nồng độ khác nhau đã ức chế hơn 80% sự phát triển của *F. kuroshium* và thậm chí còn hiệu quả hơn so với thuốc diệt nấm thương mại.

### 3.3. Khả năng ức chế nấm gây hại gỗ của chế phẩm AM-QS (*in vitro*)

Căn cứ vào kết quả kháng nấm của từng đơn chất (giá trị MIC), chế phẩm AM-QS chứa 3 chất gồm preventol,  $\alpha$ -BCA và đồng sunfat được thử nghiệm ở 5 nồng độ khác nhau từ 0,1, 0,5, 1, 2 và 5%, tương ứng với nồng độ (mg/l) của mỗi thành phần đơn chất được quy đổi ở bảng 5. Kết quả đối kháng nấm của hỗn hợp chất AM-QS chỉ ra, ở nồng độ 0,1% sự sinh trưởng của nấm bắt đầu bị ức chế, đường kính khuẩn lạc nấm chỉ đạt 18-24,7 mm. Khi tăng lên nồng độ 1%, đường kính khuẩn lạc nấm giảm xuống mức thấp nhất khoảng 2,1-4,4 mm (tương ứng 96,6%). Từ nồng độ 2% và cao hơn, nấm bị ức chế hoàn toàn, không hình thành khuẩn lạc trên đĩa thạch (bảng 6 và hình 5), trong khi các chủng nấm ở mẫu đối chứng phát triển bình thường với đường kính khuẩn lạc đạt 85,8-90,8 mm sau 5 ngày nuôi cấy. Minh họa thử nghiệm của chế phẩm AM-QS trên chủng nấm gây hại *Pestalotiopsis vismiae* NS12.2 ở hình 5. Như vậy, ở nồng độ 2% của AM-QS tương đương nồng độ của từng đơn chất là 0,1 mg/l preventol, 0,4 mg/l  $\alpha$ -BCA và 0,4 mg/l đồng sunfat, các chủng nấm bị ức chế sinh trưởng hoàn toàn. Như vậy, so với khi sử dụng từng đơn chất, nồng độ thực tế của mỗi đơn chất trong hỗn hợp đã giảm 50 lần. Hiệu quả

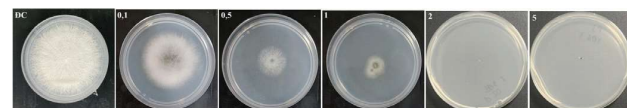
hiệp đồng ức chế của các đơn chất trong chế phẩm AM-QS được thể hiện một cách rõ rệt so với sử dụng từng đơn chất.

**Bảng 5.** Giá trị nồng độ mg/l của mỗi đơn chất trong chế phẩm AM-QS.

AM-QS (mg/l)	AM-QS (%)				
	0,1	0,5	1	2	5
Preventol	0,005	0,025	0,050	0,100	0,25
$\alpha$ -BCA	0,020	0,100	0,200	0,400	1,00
Đồng sunfat	0,020	0,100	0,200	0,400	1,00

**Bảng 6.** Khả năng kháng nấm của AM-QS ở các nồng độ 0,1, 0,5, 1, 2 và 5%.

Các chủng nấm	Đường kính khuẩn lạc nấm ở các nồng độ (mm)					
	Đối chứng	0,1	0,5	1	2	5
<i>Paratyphella citricola</i> BS2.2	90,8±0,68	20,8±0,57	11,9±0,99	2,5±0,55	0,00	0,00
<i>Aspergillus flavus</i> BS18.2	89,8±0,97	21,7±0,75	13,8±0,86	2,6±0,74	0,00	0,00
<i>Aspergillus gracilis</i> BSK6.1	88,7±0,70	21,7±0,65	10,2±0,80	3,4±0,35	0,00	0,00
<i>Aspergillus niger</i> TS5	90,8±0,76	24,7±0,64	13±0,80	4,4±0,59	0,00	0,00
<i>Curvularia eragrostidis</i> TD4.2	86,4±1,31	18±1,10	8,2±0,25	4,2±0,76	0,00	0,00
<i>Aspergillus sydowii</i> TD5	85,8±0,76	21,1±0,85	9,7±0,61	2,3±0,35	0,00	0,00
<i>Pestalotiopsis vismiae</i> NS12.2	86,6±1,25	18,2±0,40	7,6±0,60	2,6±0,53	0,00	0,00
<i>Camarosporium brabeji</i> ND6.3	87,1±1,10	20,9±1,21	7,8±0,76	2,1±0,15	0,00	0,00



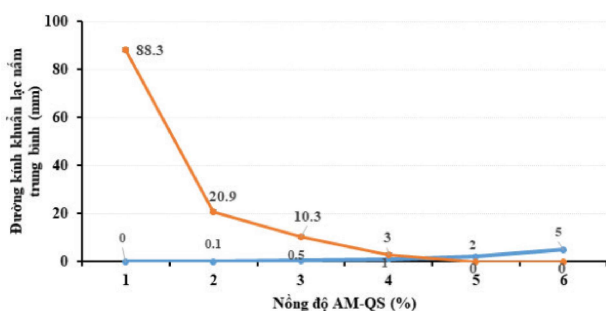
**Hình 5.** Hình ảnh thử nghiệm khả năng kháng nấm của AM-QS với chủng *Pestalotiopsis vismiae* NS12.2 ở các nồng độ 0,1, 0,5, 1, 2 và 5%.

Công bố của H.N. Tumah (2005) [21] đã chỉ ra, sự kết hợp giữa Triclosan 0,5% với 2-phenylphenol 0,5% đã làm tăng hiệu quả hiệp đồng của 2 hoạt chất lên 3 chủng nấm *C. albicans*, *A. versicolor* và *A. corymbifera* chỉ ở nồng độ 1,5  $\mu$ g/ml hỗn hợp và với *P. verrucosum* var. *cyclopium* chỉ ở nồng độ 3  $\mu$ g/ml. Hiệu quả hiệp đồng của 2 chất đã làm tăng khả năng diệt nấm lên khoảng 5-10 lần đồng thời giảm nồng độ của mỗi hoạt chất sử dụng. Điều này có thể làm giảm thiểu tác dụng phụ có thể có của 2 hoạt chất. Nghiên cứu khác của L. Cai và cs (2020) [14] về công thức kháng nấm *Postia placenta*, *Gloeophyllum trabeum* gây hại trên gỗ thông, chứa hỗn hợp methyl- $\beta$ -cyclodextrin và cinnamaldehyde đã cho thấy hiệu quả đáng kể dựa vào sự kết hợp của các hoạt chất. Khối lượng gỗ bị mất đi sau xử lý với hỗn hợp cinnamaldehyde và 50% dung dịch methyl- $\beta$ -cyclodextrin chỉ là 5,5% với nấm gây hại *P. placenta* và chỉ 6,86% do nấm gây hại *G. trabeum* so với đối chứng khoảng 35%. Hỗn hợp chất của Nano-CuO và dịch chiết lá *Nerium oleander* có khả năng ức chế nấm *Trametes hirsuta*, *Postia placenta* gây hại trên gỗ cao su (*Hevea brasiliensis*). Khối lượng gỗ bị mất đi sau xử lý với công thức hỗn hợp chất là 24,75% do nấm gây hại *T. hirsuta* so với gỗ không được xử lý 28,28%, và mất đi 13,19% do nấm gây hại *P. placenta* so với gỗ không được xử lý 51,59% [25].

Nhằm quan sát tổng thể khả năng ức chế nấm gây hại cellulose mạnh của hỗn hợp 3 đơn chất trên, một đường xu hướng biểu thị giá trị trung bình đường kính khuẩn lạc của



8 chủng nấm thử nghiệm theo nồng độ chế phẩm AM-QS thử nghiệm được xây dựng. Từ đồ thị cho thấy, đường kính trung bình khuẩn lạc nấm có xu thế giảm mạnh, bắt đầu từ 88,3 mm giảm xuống còn 20,9 mm (nồng độ thử nghiệm 0,1%) và tiếp tục giảm đến giá trị 0 mm khi nồng độ chế phẩm AM-QS tăng lên đến 2% (hình 6).



Hình 6. Đường xu hướng biểu diễn kích thước khuẩn lạc nấm theo nồng độ chế phẩm AM-QS từ 0,1, 0,5, 1, 2 đến 5%.

#### 4. Kết luận

Nghiên cứu đã đánh giá khả năng ức chế 8 chủng nấm gây hại gỗ mạnh của 3 đơn hoạt chất preventol,  $\alpha$ -BCA và đồng sunfat, đồng thời cũng đánh giá hiệu quả hiệp đồng của một công thức chế phẩm AM-QS kháng nấm chứa hỗn hợp 3 đơn chất trên. Hoạt chất preventol ở nồng độ 1 mg/l ức chế 90% đường kính khuẩn lạc nấm và ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của các chủng nấm ở MIC là 5 mg/l. Đối với  $\alpha$ -BCA, đường kính khuẩn lạc nấm giảm 93,5% ở nồng độ 10 mg/l và giá trị MIC là 20 mg/l. Đồng sunfat ức chế sinh trưởng nấm giảm 94,9% ở 10 mg/l và MIC là 20 mg/l. Chế phẩm AM-QS có khả năng ức chế sinh trưởng nấm tăng 50 lần so với dạng đơn chất, trong đó nồng độ ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của các chủng nấm là 2% tương đương 0,1 mg/l (preventol), 0,4 mg/l ( $\alpha$ -BCA) và 0,4 mg/l (đồng sunfat).

#### LỜI CẢM ƠN

Bài báo được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài “Nghiên cứu chế tạo chế phẩm đặc chủng AM-QS chống nấm mốc cho vật liệu gốc xenlulo ứng dụng trong công tác bảo quản vũ khí trang bị” (mã số 2022.11.41) do Bộ Quốc phòng quản lý. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] C.C. Ruiz, R. Avendaño, E.E. Leyva, et al. (2018), "Two new cellulolytic fungal species isolated from a 19<sup>th</sup> century art collection", *Sci. Rep.*, **8**(1), DOI: 10.1038/s41598-018-24934-7.

[2] F.E. Bergadi, F. Laachari, S. Elabed, et al. (2013), "Cellulolytic potential and filter paper activity of fungi isolated from ancient manuscripts from the Medina of Fez", *Ann. Microbiol.*, **64**, pp.815-822, DOI: 10.1007/s13213-013-0718-6.

[3] A.C. Pinheiro, S.O. Sequeira (2020), "Mycological studies in cultural heritage", *Reference Module in Life Sciences*, Elsevier, DOI: 10.1016/B978-0-12-809633-8.21003-0.

[4] A. Russel (2003), "Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **52**(5), pp.750-763, DOI: 10.1093/jac/dkg422.

[5] T.C. Chou (2006), "Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies", *Pharmacol. Rev.*, **58**(3), pp.621-681, DOI: 10.1124/pr.58.3.10.

[6] Y. Akimoto, S. Nito, G. Urakubo (1988), "Studies on the metabolic fate of alpha-bromocinnamaldehyde (an antifungal agent) in rat", *Eisei Kagaku*, **34**(4), pp.303-312, DOI: 10.1248/jhs1956.34.303.

[7] J.H. Haines, S.A. Kohler (1986), "An evaluation of ortho-phenyl phenol as a fungicidal fumigant for archives and libraries", *Journal of The American Institute for Conservation*, **25**(1), pp.49-55, DOI: 10.2307/3179414.

[8] T.K. Mazu, B.A. Bricker, H.F. Rozas, et al. (2016), "The mechanistic targets of antifungal agents: An overview", *Mini Rev. Med. Chem.*, **16**(7), pp.555-578, DOI: 10.2174/1389557516666160118112103.

[9] E.O. Oziengbe, J.O. Osazee (2012), "Antifungal activity of copper sulphate against *Colletotrichum Gloeosporioides*", *Journal of Asian Scientific Research*, **2**(12), pp.835-839.

[10] A. Unger, A. Schniewind, W. Unger (2001), *Conservation of Wood Artifacts: A Handbook*, Springer Berlin, Heidelberg, DOI: 10.1007/978-3-662-06398-9.

[11] J.H. Kim, N.C. Faria, M.L. Martins, et al. (2012), "Enhancement of antimycotic activity of amphotericin B by targeting the oxidative stress response of *Candida* and *Cryptococcus* with natural dihydroxybenzaldehydes", *Front. Microbiol.*, **3**, DOI: 10.3389/fmicb.2012.00261.

[12] M. Woźniak (2022), "Antifungal agents in wood protection - A review", *Molecules*, **27**(19), DOI: 10.3390/molecules27196392.

[13] Z. Bi, S. Fang, Q. Gao, et al. (2021), "Improvement of mould resistance of wood with cinnamaldehyde chitosan emulsion", *Wood Sci. Technol.*, **56**, pp.187-204, DOI: 10.1007/s00226-021-01349-8.

[14] L. Cai, H. Lim, D.D. Nicholas, et al. (2020), "Bio-based preservative using methyl- $\beta$ -cyclodextrin essential oil complexes for wood protection", *Int. J. Biol. Macromol.*, **147**, pp.420-427, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.056.

[15] C.C. Ngo, Q.H. Nguyen, T.H. Nguyen, et al. (2021), "Identification of fungal community associated with deterioration of optical observation instruments of museums in Northern Vietnam", *Appl. Sci.*, **11**(12), DOI: 10.3390/app11125351.

[16] K.A. Seifert, W. Gams (2011), "The genera of Hyphomycetes - 2011 update", *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, **27**, pp.119-129, DOI: 10.3767/003158511X617435.

[17] A. Balla, A. Silini, H.C. Silini, et al. (2022), "Screening of cellulolytic bacteria from various ecosystems and their cellulases production under multi-stress conditions", *Catalysts*, **12**(7), DOI: 10.3390/catal12070769.

[18] E.I. Lacleste, J. Blaz, C.A.P. Torres, et al. (2022), "Antifungal effect of copper nanoparticles against *Fusarium kuroshium*, an obligate symbiont of *Eurwallacea kuroshio* ambrosia beetle", *Fungi (Basel)*, **8**(4), DOI: 10.3390/fj8040347.

[19] M. Balouiri, M. Sadiki, S.K. Ibsouda (2016), "Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review", *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **6**(2), pp.71-79, DOI: 10.1016/j.jpba.2015.11.005.

[20] J.W. Eckert, O.F. Esuruoso, J. Carey (1979), "Fungitoxicity of derivatives of o-phenylphenol", *The American Phytopathological Society*, **69**(10), pp.1092-1095.

[21] H.N. Tumah (2005), "Synergistic effect of the combination triclosan with 2-phenylphenol against *Pseudomonas aeruginosa* and fungi", *Saudi Med. J.*, **26**(5), pp.723-727.

[22] Z. Gan, J. Huang, J. Chen, et al. (2020), "Synthesis and antifungal activities of cinnamaldehyde derivatives against *Penicillium digitatum* causing citrus green mold", *Journal of Food Quality*, **2020**, DOI: 10.1155/2020/8898692.

[23] T.H. Kang, E.I. Hwang, B.S. Yun, et al. (2007), "Inhibition of chitin synthases and antifungal activities by 2'-benzoyloxycinnamaldehyde from *Pleuropteris ciliinervis* and its derivatives", *Biol. Pharm. Bull.*, **30**(3), pp.598-602, DOI: 10.1248/bpb.30.598.

[24] K.H. Bang, B.S. Min, Y.H. Lee (1998), "Antifungal activity of cinnamaldehyde derivatives", *The Korean Journal of Mycology*, **26**(4), pp.525-530.

[25] K.S. Shiny, S. Nair, N. Mamatha, et al. (2022), "Decay resistance of wood treated with copper oxide nanoparticles synthesised using leaf extracts of *Lantana camara* L. and *Nerium oleander* L.", *Wood Material Science & Engineering*, **17**(6), pp.727-733, DOI: 10.1080/17480272.2021.1934728.

# TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

Volume 66 - Number 5 - May 2024

**Phân tích biểu hiện một số cytokine và yếu tố tăng trưởng tế bào trong dịch não tủy của bệnh nhân rối loạn cơ tròn, viêm tủy cắt ngang và liệt.**

Thân Thị Trang Uyên, Trinh Phương Đông, Nguyễn Thu Huyền, Hoàng Hương Diễm, Nguyễn Thanh Liêm

**Hiệu quả nuôi ăn qua sonde bằng súp nhỏ giọt cho người bệnh tại Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An.**

Nguyễn Đức Phúc, Nguyễn Quỳnh Anh

**Mối liên quan giữa kháng thể kháng Topoisomerase I với tổn thương một số cơ quan trong bệnh xơ cứng bì hệ thống tại Bệnh viện Da liễu Trung ương.**

Đỗ Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Hoa, Nguyễn Thị Kim Tiên

**Nghiên cứu chế tạo kit LAMP chẩn đoán sán lá gan nhỏ *Clonorchis sinensis* nhiễm trên người.**

Phạm Thị Hà Trang, Trương Văn Hạnh, Trần Thanh Dương, Hoàng Đình Cảnh

**Đánh giá tác dụng giảm đau của cao đặc chiết xuất từ Bim bịp, Ngũ trảo, Thanh táo và Lá lốt trên thực nghiệm.**

Nguyễn Thị Phương Thủy, Hứa Hoàng Oanh

**Phân lập, tuyển chọn và đánh giá đặc tính các chủng *Bacillus* tiềm năng ứng dụng cho chế phẩm probiotic.**

Đào Gia Bách, Đoàn Thị Thùy Linh, Lưu Thị Thủy Ngân, Lê Thị Hội

**Các tiếp cận quản lý danh sách người bệnh chờ ghép thận.**

Hoàng Giang, Trịnh Hồng Sơn, Phạm Việt Cường

**Mô hình bệnh tật tại Khoa Y học Cổ truyền một số bệnh viện huyện tỉnh Quảng Bình.**

Nguyễn Tuấn Linh, Đoàn Quang Huy

**Ảnh hưởng của một số loại phân hữu cơ đến sinh trưởng, năng suất và chất lượng dưa chuột (*Cucumis sativus* L.) trồng tại Vinh Phúc trong điều kiện nhà lưới.**

Phan Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Ngọc Đình, Lê Thị Tuyết Châm

**Ảnh hưởng của thời vụ đốn nuôi hom, bón phân và tỉa cành đến năng suất hom giống Sờ cam (*Camellia oleifera* Abel).**

Lê Tấn Khang, Phạm Văn Ngân, Nguyễn Văn Lam, Nguyễn Phương Tùng, Đinh Thị Ngọc, Lê Thành Phương, Nông Quang Thiện

**Nhân giống *in vitro* cây lan Hoàng thảo U lồi (*Dendrobium wardianum*).**

Nguyễn Thị Lại, Nguyễn Thị Bình, Nguyễn Thị Ngọc Bích, Phạm Minh Khoa

**Xác định đa dạng di truyền bằng chỉ thị phân tử và khả năng tái sinh chồi *in vitro* của các giống dâu tây tại Lâm Đồng.**

Nguyễn Bá Nam, Lương Vũ Mai Quỳnh, Lê Trinh Huy Trà, Lê Ngọc Triệu, Nguyễn Văn Bình, Phan Hoàng Đại, Lê Thế Biên, Trần Hiếu, Hoàng Thanh Tùng, Dương Tấn Nhựt

**Hiệu quả hiệp đồng kháng nấm gây hại vật liệu gỗ của hoạt chất preventol,  $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde và đồng sunfat.**

Nguyễn Vũ Hùng, Trần Khánh Linh, Nguyễn Thị Thanh Lợi, Lê Trọng Tài, Ngô Cao Cường

**Đánh giá khả năng lên men của *Saccharomyces cerevisiae* HG1.3 và điều kiện bảo quản rượu vang trái giác.**

Đoàn Thị Kiều Tiên, Nguyễn Hồ Anh Trung, Huỳnh Nguyễn Thúy Quỳnh, Huỳnh Thị Ngọc Mi, Nguyễn Ngọc Thanh, Huỳnh Xuân Phong

**Nghiên cứu ảnh hưởng kích thước mẫu cấy tới khả năng tái sinh chồi trực tiếp rong sụn *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) ở Việt Nam.**

Lê Thanh Tùng, Phạm Thị Mát

**1** Analysis of expression level of several cytokines and growth factors in cerebrospinal fluids extracted from spina bifida, transverse myelitis, and paralysis.

Thi Trang Uyen Than, Phuong Dong Trinh, Thu Huyen Nguyen, Huong Diem Hoang, Thanh Liem Nguyen

**7** Effectiveness of enteral tube feeding by gravity drip soup for patients at Nghe An General Friendship Hospital.

Duc Phuc Nguyen, Quynh Anh Nguyen

**12** Association between anti-Topoisomerase I antibody and organ damage in systemic sclerosis at the National Hospital of Dermatology and Venerology.

Thi Thu Hien Do, Thi Hoa Nguyen, Thi Kim Tien Nguyen

**18** Study on producing a LAMP kit for diagnosis of small liver fluke *Clonorchis sinensis* infection in humans.

Thi Ha Trang Pham, Van Hanh Truong, Thanh Duong Tran, Dinh Canh Hoang

**24** Analgesic effects of semi-solid extract from four medicinal herbs (*Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau, *Vitex negundo* L., *Justicia gendarussa* L., *Piper lolot* L.) in mice.

Thi Phuong Thủy Nguyễn, Hoàng Oanh Hua

**29** Isolation, selection, and evaluation of characteristics of potential *Bacillus* strains for probiotic products.

Gia Bach Dao, Thi Thuy Linh Doan, Thi Thuy Ngan Luu, Thi Hoi Le

**34** Approaches to managing the list of patients waiting for kidney transplantation.

Giang Hoang, Hong Son Trinh, Viet Cuong Pham

**40** Disease models of traditional medicine departments of some district hospitals in Quang Binh province.

Tuan Linh Nguyen, Quang Huy Doan

**43** Effects of some types of organic fertilisers on growth, yield and quality of *Cucumis sativus* L. grown in Vinh Phuc province under greenhouse conditions.

Thi Thu Hien Phan, Thi Ngọc Đình Nguyễn, Thi Tuyết Châm Lê

**48** Effect of cutting propagation time, fertilizer applied and pruning technique on productivity of tea-oil-plant (*Camellia oleifera* Abel).

Tat Khang Le, Van Ngan Pham, Van Lam Nguyen, Phuong Tung Nguyen, Thi Ngọc Đình, Thanh Phuong Le, Quang Thien Nong

**52** *In vitro* propagation of the *Dendrobium wardianum*.

Thi Lai Nguyen, Thi Binh Nguyen, Thi Ngọc Bích Nguyễn, Minh Khoa Phạm

**57** Genetic diversity analysis using molecular markers and *in vitro* shoot regeneration of strawberry cultivars in Lam Dong.

Ba Nam Nguyen, Vu Mai Quynh Luong, Trinh Huy Tra Le, Ngọc Triệu Lê, Van Binh Nguyen, Hoang Dai Phan, The Bien Le, Hieu Tran, Thanh Tung Hoang, Tan Nhut Duong

**64** Synergistic antifungal effect of preventol,  $\alpha$ -bromo-cinnamaldehyde, and copper sulfate compounds against wood harmful fungi.

Vu Hung Nguyen, Khanh Linh Tran, Thi Thanh Loi Nguyen, Trong Tai Le, Cao Cuong Ngo

**70** Evaluation of the fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae* HG1.3 and condition for threelaf cayratia wine preservation.

Thi Kieu Tien Doan, Ho Anh Trung Nguyen, Nguyễn Thúy Quỳnh Huỳnh, Thi Ngọc Mi Huỳnh, Ngọc Thanh Nguyễn, Xuân Phong Huỳnh

**75** Study on the effect of explant size on direct shoot regeneration capability of seaweed *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in Vietnam.

Thanh Tung Le, Thi Mat Pham



1 Structure of fungal community and culturable fungi  
2 on the discolored surfaces of pine storage boxes in the  
3 tropical region in Dong Nai, Vietnam

4 Ngo Cao Cuong<sup>1</sup>, Nguyen Vu Hung<sup>2</sup>, Tran Khanh Linh<sup>1,4</sup>, Nguyen Thi Thanh Loi<sup>3,4</sup>, Quach Ngoc  
5 Tung<sup>3,4</sup>, Do Thi Tuyen<sup>1</sup>, Dao T.N. Anh<sup>5\*</sup>

6

7 <sup>1</sup>Joint Vietnamese - Russia Tropical Science and Technology Research Center, Nguyen Van Huyen  
8 Street, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

9 <sup>2</sup>31 Electro mechanism and Explosive One Member Ltd., Co., Dai Cat, Pho Yen, Thai Nguyen,  
10 Vietnam

11 <sup>3</sup>Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau  
12 Giay, Hanoi, Vietnam

13 <sup>4</sup>Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18  
14 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

15 <sup>5</sup>Faculty of Animal Science, Vietnam National University of Agriculture, Trau Quy, Gia Lam, Hanoi,  
16 Vietnam

17

18 **\*Corresponding author:**

19 Dao T.N. Anh

20 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4403-833X>

21 Email: [daoanh@vnua.edu.vn](mailto:daoanh@vnua.edu.vn)

22 Tel: +84 368171085

23 Add: Faculty of Animal Science, VietNam National University of Agriculture, Trau Quy, Gia Lam,  
24 Hanoi, Vietnam

25

26

27 Number of figures: 7

28 Number of tables: 1

29

30

31

32

33

34

35

## 36 Abstract

37 Wood and wood-based materials are commonly used for storage, but their surfaces are prone to  
38 biodegradation by microorganisms, especially fungi. This study focuses on the microbial  
39 communities on pine wood storage boxes treated with an anti-termite and mold solution in a  
40 tropical region in Dong Nai, Vietnam. We isolated 13 fungal strains from these surfaces and  
41 classified them into six genera: *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Penicillium*, and  
42 *Trichoderma*. Enzyme activity tests revealed that strains *Curvularia eragrostidis* TD4.2 and  
43 *Aspergillus sydowii* TD5 were the most effective producers of cellulase, amylase, and laccase.  
44 Shotgun metagenomics analysis of the biological sample of the discolored surface of pine  
45 storage boxes indicated that Ascomycota was the dominant phylum, with Dothideomycetes and  
46 Sordariomycetes as the prevalent class. *Aureobasidium* (0.33%) and *Chaetomium* (1.1%) were  
47 the most abundant genera in the Dothideomycetes and Sordariomycetes, respectively. This  
48 research illustrates the complexity of microbial communities on wood surfaces, providing  
49 insights into the fungal dynamics affecting wooden storage materials in tropical climates.

50 **Keywords:** wood surface microbes, wood-decaying fungi, fungal diversity, discolored wood,  
51 pine wood

## 52 Resumo

53 Madeiras e materiais à base de madeira são amplamente utilizados para armazenamento, mas  
54 suas superfícies são suscetíveis à biodegradação por microrganismos, especialmente fungos.  
55 Este estudo foca nas comunidades microbianas presentes em caixas de armazenamento de  
56 madeira de pinho tratadas com uma solução anti-termite e antifúngica na região tropical de  
57 Dong Nai, Vietnã. Isolamos 13 linhagens de fungos dessas superfícies, classificadas em seis  
58 gêneros: *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Penicillium* e *Trichoderma*. O gênero  
59 predominante foi *Aspergillus*. Testes de atividade enzimática revelaram que as linhagens  
60 *Curvularia eragrostidis* TD4.2 e *Aspergillus sydowii* TD5 foram as mais eficazes na produção

61 de celulase, amilase e lacase. A análise metagenômica shotgun da amostra biológica da  
62 superfície descolorida das caixas de armazenamento de pinho indicou que Ascomycota era o  
63 filo dominante, com Dothideomycetes e Sordariomycetes como classes prevalentes.  
64 *Aureobasidium* (0,33%) e *Chaetomium* (1,1%) foram os gêneros mais abundantes dentro das  
65 classes Dothideomycetes e Sordariomycetes, respectivamente. Esta pesquisa destaca a  
66 complexidade das comunidades microbianas nas superfícies de madeira, fornecendo insights  
67 sobre a dinâmica fúngica que afeta materiais de armazenamento de madeira em clima tropical.

68 **Palavras-chave:** microrganismos da superfície da madeira, fungos decompositores de madeira,  
69 diversidade fúngica, madeira descolorida, madeira de pinho

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

## 81 Introduction

82 Wood products are widely used in various applications of life. Despite almost all these  
83 products being protected by chemical or biological treatments, incidents of treated wood  
84 damage are often highly problematic. Degradation was caused by the mutual action of  
85 environmental factors (abiotic) and biotic attacks (Rowell, 2005). Biodegradation of treated  
86 wooden constructions caused by fungi, including soft rot, molds, and staining fungi, may result  
87 in economic losses, reduced product quality, and even endanger human health indoors.

88 Fungal biodegradation of wood has been intensively studied for several decades. Soft rot fungi  
89 have been found on naturally weathered wood surfaces indoors and outdoors, even wood treated  
90 with preservatives and various climatic regions. Two phyla, Ascomycota and Basidiomycota,  
91 colonized on naturally weathered wood surfaces with a higher number of CFU (colony forming  
92 units) in less antimicrobial wood and higher humidity or amount of rain (Buchner et al., 2019).

93 The ratio of each composition varied depending on wood species, wood decaying stage, and  
94 environmental conditions (Kielak et al., 2016). Fungal isolation studies from wood debris  
95 showed that basidiomycetes were dominant in the earlier stages of wood decay and that many  
96 ascomycetes, such as soft-rot microfungi, occurred in the later stages (Crawford et al., 1983;  
97 Fukasawa et al., 2009; Lumley et al., 2001). Research by Fukasawa (2011) indicated that fungal  
98 species belonging to Basidiomycota, Ascomycota and Zygomycota isolated from wood debris  
99 decayed wood where five species *Bjerkandera adusta*, *Mycena haematopus*, *Omphalotus*  
100 *guepiniformis*, *Trametes hirsuta*, *Trametes versicol* (Basidiomycota) caused the highest decay,  
101 followed by four species *Scytalidium lignicola*, *Tnchoderma hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningi*  
102 (Ascomycota) and finally Zygomycota (Fukasawa et al., 2011). Various atmospheric conditions  
103 had different influences on wood products, in which higher densities of fungi and bacteria were  
104 found respectively in the exposed indoor and outdoor products, and also microbial agents varied  
105 with the wood type (Dan & Nwachukwu, 2020). Under tropical climates, especially in high  
106 humidity, fungi could be feasible to grow and propagate, resulting in the decay of the wood

107 (Darmawan et al., 2019). Even in extreme environments such as the Antarctic, for the first time  
108 discovered that wood degradation occurred with the presence of two types of specialized  
109 lignocellulolytic microbes, soft rot fungi and tunneling bacteria (Björdal & Dayton, 2020),  
110 where fungal decay dominates and their hyphae penetrate the outer 2–4 mm of the wood  
111 surface.

112 Various wood treatment solutions have been widely used to protect wood from fungal  
113 colonization, including chemical, physical, and biological methods. However, many researchers  
114 reported fungal attacks on the treated wood products (Bridžiuvienė & raudonienė, 2013; Ma et  
115 al., 2013; Pfeffer et al., 2012; van Nieuwenhuijzen et al., 2017). Their findings showed a fungal  
116 diversity on treated wood types such as genere *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*,  
117 *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Superstratomyces*, or species *Trichoderma* sp., *Epicoccum* sp.,  
118 *Penicillium commune*, *Aspergillus niger*, *Paecilomyces variotii*, *Mucor plumbeus*, *Trametes*  
119 *versicolor*, *Gloeophyllum trabeum*, *Aureobasidium pollulans*. Thus, the fungi began to resist  
120 various preservatives or adapt to environmental conditions. A self-protection mechanism can  
121 be due to the production of oxalic acid, extracellular mucilaginous material, or unspecific  
122 ligninolytic extracellular enzymes that help degrade (Clausen & Green, 2003; Kim et al., 2007;  
123 Szewczyk & Długoński, 2009).

124 So far, most research has been based on the culture method and has identified different  
125 fungal and bacterial genera or species in decaying wood in different environments (Johnston et  
126 al., 2016). However, the cultural proportion was far lower than the whole microbial community,  
127 in which the ratio of uncultured microorganisms accounts for a large part (Amann et al., 1990).  
128 Metagenomics is the unculture-based analysis of a mixture of microbial genomes (termed the  
129 metagenome) using an approach to expression or sequencing (Riesenfeld et al., 2004; Schloss &  
130 Handelsman, 2003).

131 Fungal extracellular enzymes play a crucial role in degrading wood and lignocellulose  
132 materials structured by polymer components such as cellulose, hemicellulose, and lignin. Fungi  
133 possess genes encoding laccase, peroxidases, and glycoside hydrolases that work together to  
134 break down wood components (Arnstadt et al., 2016). Besides, other polysaccharide-degrading  
135 enzymes, including catalytic activities for decaying hemicellulose, starch and glycogen, mutant,  
136 chitin, and  $\beta$ -glucans were predicted in *P. chrysosporium* (Martinez et al., 2004). Studies have  
137 also explored the ecological aspects of wood decomposition by saprotrophic fungi, such  
138 as *Fomes fomentarius*, in coarse wood substrates. Significant differences in enzyme production  
139 by *F. fomentarius* have been observed between different wood types, with varying activities  
140 of cellulose and xylan-degrading enzymes depending on the wood species (Větrovský et al.,  
141 2011). Moreover, fungal communities in wood substrates can influence enzyme production and  
142 decomposition processes, highlighting the complex interactions between fungi, bacteria, and  
143 wood substrates (Větrovský et al., 2011). Microfungi such as *Penicillium chrysogenum*,  
144 *Fusarium solani*, and *F. oxysporum* also showed a degree of lignin decomposition (Kirk & Farrell,  
145 1987). In shotgun metagenomics research, results of fungal gene-encoding enzyme analysis  
146 targeted to degrade the oak wood polymers found cellulose-targeting enzymes at different  
147 decaying classes (early, intermediate, and late) (Pioli et al., 2023). Additionally, starch-  
148 degrading enzymes in fungi were higher at middle decay stages, and the study found abundance  
149 *Aspergillus oryzae* in the dataset, suggesting a possible role in the increased glucoamylase  
150 production, while two fungi of *Zymoseptoria tritici*, *Cercospora beticola* identified at late decay  
151 with increase in  $\alpha$ -amylases and a glucoamylase (Pioli et al., 2023).

152 To improve effective strategies for fungal prevention in treated wood boxes used in item  
153 storage in tropical region Vietnam, a better understanding of the fungal composition as well as  
154 the colonized abilities of the causal agents will be essential. The present study was initiated by  
155 a mold issue affecting the surface of treated wood storage boxes placed in indoor conditions.  
156 Despite the wooden boxes being treated with wood preservatives, fungal growth was observed

157 over time, evidenced by wood discoloration and the presence of dark mycelium. Thus, this  
158 study aimed to identify the structure of the fungal community and culturable fungi on treated  
159 wood box surfaces by shotgun metagenomics analysis and traditional isolation, respectively. In  
160 addition, a biochemical property of enzyme activity important for fungi in wood colonization  
161 was determined.

## 162 **Materials and methods**

### 163 **Materials**

164 Pinewood storage boxes in warehouse K750, Dong Nai, Vietnam (10° 57' 0" N, 106° 52' 26" E)  
165 were the objects of the study (Fig 1). Pine wood is harvested and processed into custom parts  
166 for packaging in Vietnam. The wood is planed on both sides and cleaned using an air blower.  
167 The wood treatment process is carried out by placing the wood in a tank and gradually releasing  
168 the prepared treatment solution until the wood is fully submerged. The wood is soaked  
169 continuously for 3 hours, then removed and left to dry on racks before being dried at 105°C for  
170 15 minutes. The treatment solution for anti-termite and mold protection contained 80%  
171  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 15%  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , 3%  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , and 2% additives. Material on the surface of wood  
172 storage boxes was collected and used as a source for fungi isolation and evaluation of the  
173 microbial structure using shotgun metagenomics.

174 Chemicals for enzyme testing, such as guaiacol, carboxymethyl cellulose, and soluble starch,  
175 were purchased from Sigma (Sigma Aldrich, Germany). DNA extraction from isolated strains  
176 and specimens was carried out using DNA Extraction Kit (Norgen, Canada) and DNeasy  
177 PowerSoil Pro kit (Qiagen), respectively.

### 178 **Sampling method**

179 A sterile cotton swab was used to wipe the surface of the mold-infected material. The tip of the  
180 swab was collected and placed into a sterile tube, which was kept cold during transport to the

181 laboratory. Each fungal-infected spot on the wood was swabbed using 2 swabs over an area of  
182 approximately 3x3 cm. A total of 20 swabs were taken, corresponding to 10 locations on the mold-  
183 infected wooden box. Samples were collected from five wooden boxes and homogenized for use in  
184 the study.

### 185 Fungal strain isolation

186 The biological samples on the swabbed cotton tips were homogenized in sterilized physiological  
187 saline with 0.005% Tween 80 and shaken at 200 rpm for 30 minutes. 100  $\mu$ L of the homogenized  
188 solution was taken and spread evenly on the Czapek-Dox petri dish supplemented with a mixture  
189 of antibiotics (100 mg/L ampicillin and 100 mg/L tetracycline). The czapek-Dox medium contains  
190 saccharose 30 g.L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub> 0.5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g.L<sup>-1</sup>; KCl 0.5 g.L<sup>-1</sup>; NaNO<sub>3</sub> 2 g.L<sup>-1</sup>; FeNO<sub>3</sub> 0.01  
191 g.L<sup>-1</sup>; agar 15 g.L<sup>-1</sup>; water up to 1000 mL; pH 7,3. The inoculated plates were cultivated at 30 °C  
192 for 3 - 5 days in the dark. Fungal colonies appeared on the plates were subcultured and purified to  
193 obtain pure fungal strains, Czapek-Dox medium was used during the purification process (Ngo et  
194 al., 2021).

### 195 Fungal morphology characterization

196 Isolated fungi were inoculated on a Czapek-Dox medium agar plate by inoculating needle and then  
197 incubated at 28-30 °C for 3-5 days; the fungal colony morphology was recorded and described by  
198 surface color, form, elevation, and margin shape. The reproductive spores and sporulation after 72  
199 hours of cultivation were observed under an optical microscope (Seifert et al., 2011).

### 200 Fungal classification

201 The ITS1-5.8S-ITS2 region (ITS region) sequence was adopted to classify isolated fungi  
202 phylogenetically. Fungal DNA was extracted using the Fungi/Yeast DNA Extraction Kit (Norgen,  
203 Canada). ITS region was amplified with primer pair ITS1F (5'- CTT GGT CAT TTA GAG GAA  
204 GTA A - 3') and ITS4R (5' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3'). ITS regions were sequenced



205 on an ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) at 1<sup>st</sup> BASE  
206 Company (Singapore). Raw sequences were processed with BioEdit software (ver. 6.0.7, USA) to  
207 achieve fungal-isolated ITS sequences. GenBank (NCBI) database and BLAST tool on NCBI  
208 (www.ncbi.nlm.nih.gov) were applied to identify relative ITS sequences to which fungal isolates in  
209 this study. The phylogenetic tree was constructed using MEGA software (ver.10, USA) with a  
210 neighbor-joining algorithm.

## 211 Extracellular enzyme activity detection

212 Extracellular enzymes such as cellulase, amylase, and laccase, which are involved in the  
213 lignocellulose and polymeric carbohydrate metabolism in the wood, were detected by the ability to  
214 utilize the corresponding substrates of fungi growing on Czapek-Dox agar plates. Czapek-Dox agar  
215 plates were supplemented with the substrate as 1% carboxymethyl cellulose (CMC), 0.5% starch,  
216 and 0.05% guaiacol for cellulase, amylase, and laccase, respectively (Deep et al., 2014). A 6 mm  
217 diameter fungal agar plug was placed on a Czapek-Dox plate with supplemented substrate, each  
218 plate placed seven fungal plugs. The testing plates were transferred to a 30 °C incubator for the next  
219 24 hours. Fungal strains that exhibited enzyme activities showed a halo ring around the plug after  
220 staining with 1% Lugol's solution. The diameter of the clear zone around the well is measured using  
221 a ruler in millimeters. The measurement was done by taking the average of two perpendicular  
222 diameters for more accurate results. The test was carried out in triplicate.

## 223 Shotgun metagenomics

### 224 *DNA extraction*

225 The tips of 10 swabs are cut and placed in 10 mL of sterile distilled water with 2% Tween 80 in a  
226 sterilized tube to release the fungal hyphae from the swabs. The mixture is vortexed at maximum  
227 speed for 2 minutes, repeated 3 times. The swabs are removed, and the solution is centrifuged at  
228 13,000 rpm to collect the biomass. The subsequent steps are carried out according to the DNeasy  
229 PowerSoil Pro Kit Handbook 2023 (Qiagen). DNA metagenome was accumulated to meet the

230 requirements for quality and quantity for next-generation sequencing (NGS) and stored at -80 °C  
231 before sequencing.

### 232 *Metagenome sequencing*

233 The extracted DNA was used to generate a library using the NEBnext Ultra II library preparation  
234 kit and NEBnext Multiplex Oligos Dual (NEBnext) with four main steps, including cleaving by  
235 fragments, adapter ligation, indexing, and cloning by PCR. The library generation procedure was  
236 carried out according to the manufacturer's instructions. The library product DNA was attached to  
237 adapters and indexes between 300 - 400 bp in size. The library was then sequenced using next-  
238 generation sequencing (NGS) on the Illumina system (USA).

### 239 *Bioinformatics analysis*

240 The quality control of the sequencing data was done using *fastp*. Key steps included adapter  
241 trimming, quality filtering, trimming low-quality bases, removing short reads (<50 bp), and  
242 eliminating duplicate reads. These measures ensured high data accuracy and reliability for  
243 downstream analyses. Purified reads were used to analyze the microbial structure and predict  
244 population function using SqueezeMeta (ver. 1.4.0), a comprehensive workflow ideal for handling  
245 the complexity of metagenomic data. The analysis performed in SqueezeMeta v1.4.0 is summarized  
246 as follows: the input reads are assembled into longer sequences called contigs. Next, the location of  
247 the coding genes and the rRNA sequence on the contig is determined. These genes are aligned with  
248 a database to evaluate the microbial composition and function of the community. In addition, the  
249 alignment data were used to calculate the number of sequences aligned with a gene in the database  
250 and the depth of gene coverage, therefore estimating the relative proportion of microorganisms.

### 251 *Data analysis*

252 The experiments were triplicate; data was calculated and evaluated using GraphPad Prism (Ver  
253 6.01). ANOVA analysis was applied where relevant.

## 254 Result and discussion

### 255 Isolation of culturable fungi from the surface of pine wood storage boxes

256 From the fungal-harboring surface of wood storage boxes, 13 fungi were isolated. Isolated  
257 fungi were distinguished from each other by colony morphology first and then the  
258 characteristics of reproductive structures. Typical colony morphologies of isolated fungi on  
259 Czapek-Dox medium after five days of cultivation are 1) powdery and dark brown to black,  
260 entire circular; 2) light brown, filamentous margin and form; 3) pastel pink, undulate margin  
261 and cottony aerial hyphae; 4) velvety green shade with white margin (Fig 2). In this study, only  
262 the Czapek-Dox medium was used as the base medium to cultivate culturable fungi; the number  
263 and diversity of isolates were relatively high compared to the status of the boxes in which just  
264 black and green mold were dominant, as seen by bared eyes.

265 All 13 isolates were classified based on their morphology and sequences of ITS region. They  
266 belong to six genera, including *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Penicillium*, and  
267 *Trichoderma*. The best hit with the highest identity after aligning 13 ITS sequences with the  
268 GenBank database is detailed in Table 1. Seven out of 13 are *Aspergillus*, a dominant genus  
269 among culturable fungi on the surface of wood boxes. The phylogenetic relationship based on  
270 ITS sequences of fungal isolates is demonstrated in Fig 3.

### 271 Production of extracellular enzymes by fungal isolates

272 Extracellular enzymes such as cellulase, amylase, and laccase are involved in wood-decaying,  
273 with target substrates being the main components of wood structure, including cellulose, starch,  
274 and lignin. The enzyme-producing ability of 13 fungal isolates was determined using an agar-  
275 plug diffusion plate with corresponding substrates. The isolated fungi showed the ability to  
276 produce these three types of enzymes at different levels; some isolates produced all three  
277 enzymes, while others did not produce any activity. However, some isolates produced 1 or 2 of

278 the three tested enzymes. A representative illustration of the activity-tested plates is shown in  
279 Fig 4, and the transparent halo-ring diameter index is visualized in Fig 5.

280 *Curvularia eragrostidis* TD4.2 and *Aspergillus sydowii* TD5 were two strains that exhibited the  
281 ability to produce high levels of all three types of enzymes, including cellulase, amylase, and  
282 laccase; the activities of their enzymes were higher than the rest. Meanwhile, *Aspergillus*  
283 *austroafricanus* TD11.1 and *Rhizopus oryzae* TD6.1 produced cellulase significantly higher  
284 than amylase and laccase. By contrast, *Trichoderma atroviride* TS10.1 showed more amylase  
285 and laccase activity than cellulase. There were two isolates *Curvularia umbiliciformis* TD7 and  
286 *Aspergillus austroafricanus* TD12.1 of which none of all three tested enzymes was detected.  
287 The difference in the enzyme production ability of fungal isolates belonging to the same genus  
288 *Curvularia* (*Curvularia eragrostidis* TD4.2 and *Curvularia umbiliciformis* TD7), shows that  
289 the enzyme production ability under the surveyed conditions is characteristic that depends on  
290 each specific strain. A similar occurrence was also observed with *Aspergillus* strains;  
291 *Aspergillus sydowii* TD5 displayed outstanding enzyme activities, while other strains of this  
292 genus showed no enzymatic activity (*Aspergillus austroafricanus* TD12.1) or very low  
293 activities. Considering the ratio of fungal isolates that produce each enzyme, it was found that  
294 most strains were capable of secreting cellulase (11/13 isolates). However, only 8 out of 13  
295 isolates showed amylase activity (Fig 5).

## 296 Structure of fungal community on the surface of wood storage boxes

297 The DNA sample obtained from the biological sample collected from the surface of the wood  
298 storage box was used to evaluate the community structure. The shotgun metagenomics  
299 approach was applied, and all genetic material in the DNA sample was sequenced. The  
300 sequencing yielded 6,185,888 raw reads, of which 65.74% were unclassified reads. The high  
301 percentage of unclassified reads in metagenomic data indicates significant microbial diversity  
302 that is currently undocumented. Among classified reads, 33.79% were eukaryotic reads, and the

303 number of prokaryotic reads is very low. Bacteria and archaea only account for 0.74% of the  
304 total obtained reads, in which the phylum with the largest number is Acidobacteria (0.3075),  
305 followed by Proteobacteria and Firmicutes. In contrast, with the eukaryotic group, there were  
306 17 phyla identified, the dominant phylum was Ascomycota, with the largest proportion of  
307 30.19%, and the number of reads belonging to eukaryotes whose phylum was not identified  
308 was 3% (Fig 6).

309 Ascomycota was the dominant phylum on the surface of the wood box, and the most prominent  
310 class was Dothideomycetes. This class accounts for 20.05% of the total obtained reads and  
311 58.5% of the classified reads. There are significant differences between the top two classes in  
312 Ascomycota as the second dominant class Sordariomycetes was 2.06%. In addition, up to  
313 7.59% of total reads were unclassified in the Ascomycota phylum. Reads were unclassified into  
314 genera in Dothideomycetes held a large number, they consisted of 10.99% Unclassified  
315 Dothideomycetes, 5.36 % Unclassified Mycosphaerellales and 2.23% for other families.  
316 Identified genera that accounted for more than 0.1% were *Aureobasidium*, *Rachicladosporium*,  
317 *Hortaea*, *Venturia* and *Periconia*, the highest belonged to *Aureobasidium* with 0.33%.  
318 *Chaetomium* (1.1%) was the most dominant genus in Sordariomycetes. Genera *Fusarium* and  
319 *Trichoderma* existed in Sordariomycetes. Although the culturable fungal isolates were  
320 classified into these genera, *Fusarium* and *Trichoderma* possessed a small percentage of 0.2  
321 and 0.018 %, respectively (Fig 7).

## 322 Discussion

323 Pine wood is a popular industrial type widely used to produce storage boxes, containers, and  
324 pallets. Before being processed into finished products, pine wood is typically treated using  
325 various methods to prevent fungal and insect damage (Khademibami & Bobadilha, 2022).  
326 However, these wooden containers often suffer from discoloration or blue stain, which  
327 diminishes their aesthetic value, impacts the quality of the stored products, reduces their  
328 usability, and even leads to decaying the wood material. This discoloration is typically caused

329 by microorganisms, with the main fungal genera frequently mentioned as molds, including  
330 *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fusarium* (Rahman & Fuad, 2002; Schmidt, 2006; Singh & Chauhan,  
331 2013). Several studies have identified these genera within the group of decaying fungi on wood;  
332 they belong to soft-rot fungi, which can deteriorate wood by virtue of their cellulolytic enzymes  
333 (Zabel & Morrell, 2020). These fungal genera have also been identified in microbial samples taken  
334 from the pine wood storage boxed surface in this study. Of the 13 fungal strains isolated, they  
335 were classified into six genera of filamentous fungi within the Ascomycota phylum. *Aspergillus*  
336 is the predominant genus, with 7 out of the 13 isolated strains belonging to this genus. The  
337 ability to produce enzymes involved in wood degradation varies among the isolated strains.  
338 *Curvularia eragrostidis* TD4.2 and *Aspergillus sydowii* TD5 produced cellulase, amylase, and  
339 laccase with relatively high activity. The strain with the highest activity for all three types of  
340 enzymes was *Aspergillus sydowii* TD5. Additionally, the remaining *Aspergillus* strains  
341 exhibited lower enzyme activity, except for *Aspergillus austroafricanus* TD11.1, which  
342 demonstrated superior cellulase activity compared to the other two enzymes.

343         This study's pine wood storage boxes were chemically treated with fungal resistance.  
344 However, in the tropical climate of Dong Nai, Vietnam, the effectiveness of this treatment in  
345 preventing fungal colonization is limited, and discoloration can still occur, even though the  
346 wood is stored in a well-ventilated, enclosed space. Identifying the microbial composition on  
347 the surface of these stained boxes can provide information to improve wood treatment methods  
348 and storage practices during use for better effectiveness (Cao et al., 2024; Darmawan et al.,  
349 2019). Microbial community structure obtained through shotgun metagenomics has revealed  
350 significant differences from the initial findings based on isolation and classification methods of  
351 the isolated strains. The sample collection process only recorded locations with changes in color  
352 and the development of fungal hyphae forming cotton-like structures, however, when analyzing  
353 the microbial community, we discovered bacteria, viruses, actinomycetes, etc. Unclassified  
354 reads accounted for more than 65% of the total genetic information in the sample, indicating

355 unknown biodiversity on the surface of the sample as well as the limited information in the  
356 database related to the specific source in this study. Genera *Fusarium*, *Trichoderma*,  
357 *Aspergillus*, and *Curvularia* were all present in the study samples; however, their identification  
358 rates varied significantly. Although *Aspergillus* is a genus with many isolated strains, it only  
359 accounted for 0.0427% and could not be classified at the species level. In contrast, *Fusarium*  
360 represented a relatively high percentage of 0.209%, with several species such as *F. clavum*, *F.*  
361 *coffeatum*, and *F. flagelliforme*. In the wooden church in Romani, similar fungal genera,  
362 including *Aspergillus*, *Penicillium*, *Stachybotrys*, *Scopulariopsis*, *Arthrinium*, *Mucor*, and  
363 *Geotrichum*, were identified in both wood surface samples and microaeroflora (Ilies et al.,  
364 2018).

365 Conversely, although *Rhizopus* was isolated from biological samples from wood surfaces, it  
366 was not detected in the obtained sequence data. In addition to the well-studied representative  
367 filamentous fungi mentioned above, the non-cultured sample revealed that *Chaetomium*  
368 *globosum* accounted for 1.0386% of the fungal community on the discoloration surface. This  
369 species is the most predominant among the identified fungi in this sample. *Chaetomium*  
370 *globosum* is an endophytic fungus that can degrade wood and wood products indoors and  
371 outdoors. It also has the potential to produce mycotoxins that can cause allergies and  
372 opportunistic diseases (Abdel-Azeem et al., 2020; Fogle et al., 2008). When this species is  
373 detected, replacing and treating the wood storage boxes and adjusting the storage conditions  
374 are necessary. In a warm and humid climate like Dong Nai, Vietnam, the strong development  
375 of *Chaetomium globosum* is inevitable. Pinewood infected with this species has been treated  
376 with antifungal chemicals but has not shown effective results. This study suggests the need to  
377 treat wood with other mold-resistant agents, especially for soft-rot fungi, such as using essential  
378 oils, coating agents, or a combination of several fungicides (Biles et al., 2012; Broda, 2020)  
379 while climate and storage conditions are challenging to change.

380 At the kingdom level, the results show that bacteria and archaea accounted for a small  
381 proportion, while fungi from the phylum Ascomycota were the predominant group. This was  
382 quite different from microbial community composition in pine wood samples collected from  
383 dead trees in different stages of decomposition, which were dominated by bacterial abundance  
384 of *Acidobacteria*, *Alpha-*, *Beta-*, *Gammaproteobacteria*, *Firmicutes* and *Actinobacteria*,  
385 whereas fungal abundance almost entirely consisted of two phyla, *Basidiomycota* and  
386 *Ascomycota* with 95–100% of sequences, respectively (Kielak et al., 2016). The three  
387 predominant classes are Dothideomycetes, Sordariomycetes, and Eurotiomycetes, with all  
388 isolated fungal genera belonging to these classes. Based on both results from culturable and  
389 non-culturable diversity analysis, it can be observed that soft-rot fungi were the primary cause  
390 of discoloration stains on the surface of pine wood storage boxes. This group of soft-rot fungi  
391 primarily degrades cellulose and hemicellulose using a diverse cellulolytic enzyme system  
392 (Saini & Sharma, 2021). Also, it can produce laccase to degrade lignin, similar to other  
393 lignocellulose decaying fungi. This is consistent with the lignocellulolytic enzyme production  
394 of the isolated fungal strains (Fig. 5). Diversity of microbial community structure in decaying  
395 wood is also in relation to wood traits such as carbon content (Pioli et al., 2023). Pioli's research  
396 also combined the results from the metagenomic analysis with in vitro bioassays based on  
397 bacterial and fungal isolates. However, only a few cultivated strains of fungi and bacteria  
398 matched the metagenomic database for a reliable comparison of intra- and inter-kingdom co-  
399 occurrences (Pioli et al., 2023).

400 Identifying and understanding these groups of microorganisms will guide the development of  
401 methods to mitigate their harmful effects through wood treatment processes or the use of  
402 preservatives tailored to each target microbial group. There are various wood preservation  
403 methods, such as adjusting temperature and humidity, sterilization with ozone, irradiation,  
404 drying, and high-pressure steaming. However, the method applied depends on the size and value  
405 of the wooden items. For small, high-value items, adjusting temperature and humidity may be



406 suitable. In the humid tropical climate of Vietnam, drying, steaming, and irradiation methods  
407 only temporarily inhibit microorganisms and do not ensure long-term effectiveness. Therefore,  
408 the use of chemicals is a suitable solution for larger and more numerous items, with the  
409 requirement that they must be safe for humans and the environment. Based on the results  
410 obtained, another research is required, such as testing appropriate preservative solutions against  
411 Ascomycota fungi, particularly *Chaetomium globosum*.

## 412 Conclusion

413 The biological sample from the discoloration area on the surface of pine wood storage boxes  
414 shows diversity and predominance of soft-rot fungi. The phylum Ascomycota is the most  
415 prevalent, with the predominant classes being Dothideomycetes, Sordariomycetes, and  
416 Eurotiomycetes. *Chaetomium globosum* was the most dominant species in the non-cultured  
417 sample. Several fungi isolated from the pine wood surface, such as *Curvularia eragrostidis* and  
418 *Aspergillus sydowii*, demonstrated the ability to produce lignocellulolytic enzymes such as  
419 amylase, cellulase, and laccase.

## 420 Acknowledgments

421 This work was supported by the project "Characteristics of microbial deterioration on materials  
422 and equipment and the development of protective measures for them under tropical climate  
423 conditions" funded by the UBPH, project code T1.3 2022-2023 Additional support was  
424 provided by the Ministry of Defense project "Development of specialized am-qs formulations  
425 for mold resistance in cellulose-based materials for weapon storage applications," project code  
426 2022.11.41.

## 427 References

- 428 Abdel-Azeem, A. M., Blanchette, R. A., & Held, B. W. (2020). *Chaetomium* as potential soft rot  
429 degrader of woody and papery cultural heritage. *Recent Developments on Genus Chaetomium*,  
430 395–419.
- 431 Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., & Stahl, D. (1990). Combination  
432 of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial  
433 populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1919–1925.

- 434 Arnstadt, T., Hoppe, B., Kahl, T., Kellner, H., Krüger, D., Bauhus, J., & Hofrichter, M. (2016). Dynamics of  
435 fungal community composition, decomposition and resulting deadwood properties in logs of  
436 *Fagus sylvatica*, *Picea abies* and *Pinus sylvestris*. *Forest Ecology and Management*, *382*, 129–142.
- 437 Biles, C. L., Wright, D., Fuego, M., Guinn, A., Cluck, T., Young, J., Martin, M., Biles, J., & Poudyal, S.  
438 (2012). Differential Chlorate Inhibition of *Chaetomium globosum* Germination, Hyphal Growth,  
439 and Perithecia Synthesis. *Mycopathologia*, *174*(5–6), 475–487. [https://doi.org/10.1007/s11046-](https://doi.org/10.1007/s11046-012-9572-5)  
440 [012-9572-5](https://doi.org/10.1007/s11046-012-9572-5)
- 441 Björdal, C. G., & Dayton, P. K. (2020). First evidence of microbial wood degradation in the coastal  
442 waters of the Antarctic. *Scientific Reports*, *10*(1), 12774.
- 443 BRIDŽIUVIENĖ, D., & RAUDONIENĖ, V. (2013). Fungi surviving on treated wood and some of their  
444 physiological properties. *Materials Science*, *19*(1), 43–50.
- 445 Broda, M. (2020). Natural compounds for wood protection against fungi—A review. In *Molecules* (Vol.  
446 *25*, Issue 15). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25153538>
- 447 Buchner, J., Irle, M., Belloncle, C., Michaud, F., & Macchioni, N. (2019). Fungal and bacterial colonies  
448 growing on weathered wood surfaces. *Wood Material Science & Engineering*, *14*(1), 33–41.
- 449 Cao, J., Liu, X., Wang, J., Chen, H., Liu, D., Li, J., & Mai, B. (2024). Analysis of microbial diversity and its  
450 degradation function in wooden piles at Shahe ancient bridge site in Xi'an and protection  
451 measures. *Heritage Science*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/s40494-024-01157-w>
- 452 Clausen, C. A., & Green, F. (2003). Oxalic acid overproduction by copper-tolerant brown-rot  
453 basidiomycetes on southern yellow pine treated with copper-based preservatives. *International*  
454 *Biodeterioration & Biodegradation*, *51*(2), 139–144.
- 455 Crawford, D. L., Pometto, A. L., & Crawford, R. L. (1983). Lignin Degradation by *Streptomyces-*  
456 *Viridosporus* - Isolation and Characterization of a New Polymeric Lignin Degradation  
457 Intermediate. *Applied and Environmental Microbiology*, *45*(3), 898–904.
- 458 Dan, P. H., & Nwachukwu, J. Q. (2020). Effect of microbes and atmospheric parameters on wood  
459 products utilization in Uyo, Akwa Ibom state, Nigeria. *Journal of Research in Forestry, Wildlife*  
460 *and Environment*, *12*(2).
- 461 Darmawan, W., Herliyana, E. N., Gayatri, A., Hasanusi, A., & Gerardin, P. (2019). Microbial growths and  
462 checking on acrylic painted tropical woods and their static bending after three years of natural  
463 weathering. *Journal of Materials Research and Technology*, *8*(4), 3495–3503.
- 464 Fogle, M. R., Douglas, D. R., Jumper, C. A., & Straus, D. C. (2008). Growth and mycotoxin production  
465 by *Chaetomium globosum* is favored in a neutral pH. *International Journal of Molecular Sciences*,  
466 *9*(12), 2357–2365. <https://doi.org/10.3390/ijms9122357>
- 467 Fukasawa, Y., Osono, T., & Takeda, H. (2009). Microfungus communities of Japanese beech logs at  
468 different stages of decay in a cool temperate deciduous forest. *Canadian Journal of Forest*  
469 *Research*, *39*(8), 1606–1614.
- 470 Fukasawa, Y., Osono, T., & Takeda, H. (2011). Wood decomposing abilities of diverse lignicolous fungi  
471 on nondecayed and decayed beech wood. *Mycologia*, *103*(3), 474–482.
- 472 Ilies, D. C., Onet, A., Wendt, J. A., Ilieș, M., Timar, A., Ilies, A., Baias, Ș., & Herman, G. V. (2018). Study  
473 on microbial and fungal contamination of air and wooden surfaces inside of a historical Church  
474 from Romania. *Journal of Environmental Biology*, *39*(6), 980–984.

- 475 Johnston, S. R., Boddy, L., & Weightman, A. J. (2016). Bacteria in decomposing wood and their  
476 interactions with wood-decay fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(11), fiw179.
- 477 Khademibami, L., & Bobadilha, G. S. (2022). Recent Developments Studies on Wood Protection  
478 Research in Academia: A Review. In *Frontiers in Forests and Global Change* (Vol. 5). Frontiers  
479 Media S.A. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2022.793177>
- 480 Kielak, A. M., Scheublin, T. R., Mendes, L. W., Van Veen, J. A., & Kuramae, E. E. (2016). Bacterial  
481 community succession in pine-wood decomposition. *Frontiers in Microbiology*, 7, 231.
- 482 Kim, J.-J., Kang, S.-M., Choi, Y.-S., & Kim, G.-H. (2007). Microfungi potentially disfiguring CCA-treated  
483 wood. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 60(3), 197–201.
- 484 Kirk, T. K., & Farrell, R. L. (1987). Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin1, 2.  
485 *Ann. Rev. Microbiol*, 41, 465–505.
- 486 Lumley, T. C., Gignac, L. D., & Currah, R. S. (2001). Microfungus communities of white spruce and  
487 trembling aspen logs at different stages of decay in disturbed and undisturbed sites in the boreal  
488 mixedwood region of Alberta. *Canadian Journal of Botany*, 79(1), 76–92.
- 489 Ma, X., Jiang, M., Wu, Y., & Wang, P. (2013). Effect of Wood Surface Treatment on Fungal Decay and  
490 Termite Resistance. *BioResources*, 8(2).
- 491 Martinez, D., Larrondo, L. F., Putnam, N., Gelpke, M. D. S., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K. G.,  
492 Ramaiya, P., Detter, J. C., & Larimer, F. (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading  
493 fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnology*, 22(6), 695–700.
- 494 Pfeffer, A., Hoegger, P. J., Kues, U., & Miltz, H. (2012). Fungal colonisation of outside weathered  
495 modified wood. *Wood Science and Technology*, 46, 63–72.
- 496 Pioli, S., Clagnan, E., Chowdhury, A. A., Bani, A., Borruso, L., Ventura, M., Tonon, G., & Brusetti, L.  
497 (2023). Structural and functional microbial diversity in deadwood respond to decomposition  
498 dynamics. *Environmental Microbiology*, 25(11), 2351–2367.
- 499 Rahman, M. A., & Fuad, A. (2002). Biodeterioration of Wood By Fungi. *Forestry and Wood Technology*  
500 *Discipline Khulna University Khulna: Khulna, Bangladesh*, 20–38.
- 501 Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). Metagenomics: genomic analysis of  
502 microbial communities. *Annu. Rev. Genet.*, 38(1), 525–552.
- 503 Rowell, R. M. (2005). *Handbook of wood chemistry and wood composites*. CRC press.
- 504 Saini, S., & Sharma, K. K. (2021). Fungal lignocellulolytic enzymes and lignocellulose: a critical review  
505 on their contribution to multiproduct biorefinery and global biofuel research. *International*  
506 *Journal of Biological Macromolecules*, 193, 2304–2319.
- 507 Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2003). Biotechnological prospects from metagenomics. *Current*  
508 *Opinion in Biotechnology*, 14(3), 303–310.
- 509 Schmidt, O. (2006). Wood discoloration. *Wood and Tree Fungi: Biology, Damage, Protection, and Use*,  
510 119–133.
- 511 Singh, P., & Chauhan, M. (2013). Influence of environmental factors on the growth of building  
512 deteriorating fungi: *Aspergillus flavus* and *Penicillium chrysogenum*. *International Journal of*  
513 *Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(1), 425.

514 Szewczyk, R., & Długoński, J. (2009). Pentachlorophenol and spent engine oil degradation by *Mucor*  
 515 *ramosissimus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(2), 123–129.

516 van Nieuwenhuijzen, E. J., Houbraeken, J. A. M. P., Punt, P. J., Roeselers, G., Adan, O. C. G., & Samson,  
 517 R. A. (2017). The fungal composition of natural biofinishes on oil-treated wood. *Fungal Biology*  
 518 *and Biotechnology*, 4, 1–13.

519 Větrovský, T., Voříšková, J., Šnajdr, J., Gabriel, J., & Baldrian, P. (2011). Ecology of coarse wood  
 520 decomposition by the saprotrophic fungus *Fomes fomentarius*. *Biodegradation*, 22, 709–718.

521 Zabel, R. A., & Morrell, J. J. (2020). Chapter Eight - Chemical changes in wood caused by decay fungi.  
 522 In R. A. Zabel & J. J. Morrell (Eds.), *Wood Microbiology (Second Edition)* (pp. 215–244). Academic  
 523 Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819465-2.00008-5>

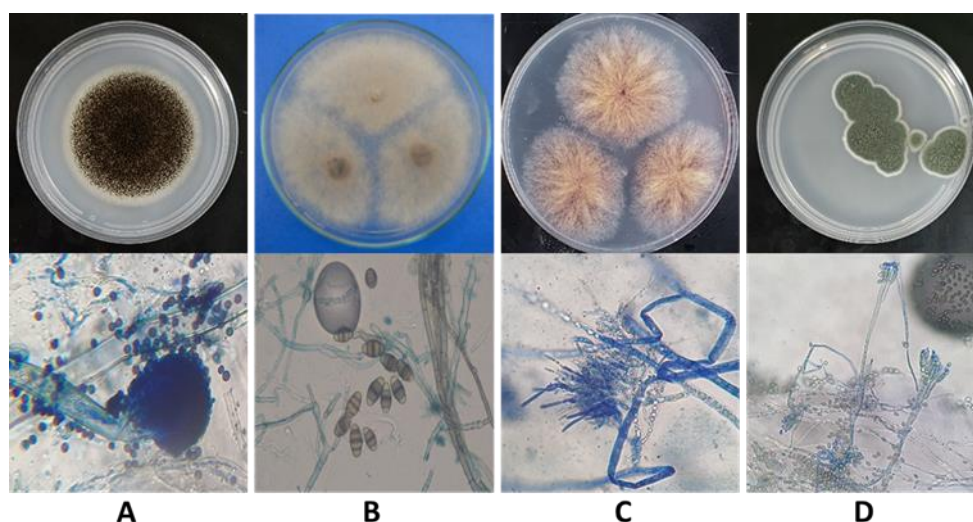
524



525

526 **Fig 1.** Pine wood storage boxes from warehouse K750, Dong Nai, Vietnam

527

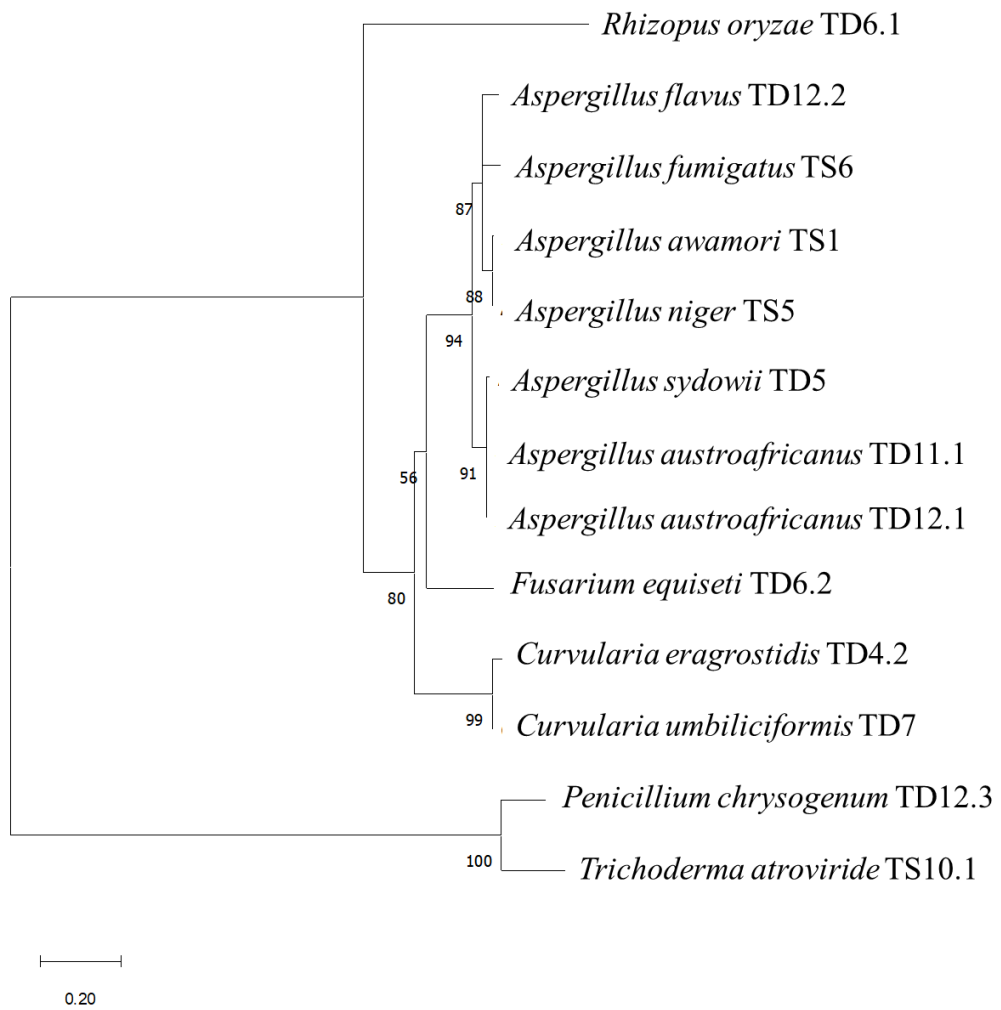


528

529 **Fig 2.** Morphology of isolated fungi from the surface of wood storage boxes. A) *Aspergillus niger*

530 TS5; B) *Curvularia eragrostidis* TD4.2; C) *Fusarium equiseti* TD6.2; D) *Penicillium chrysogenum*

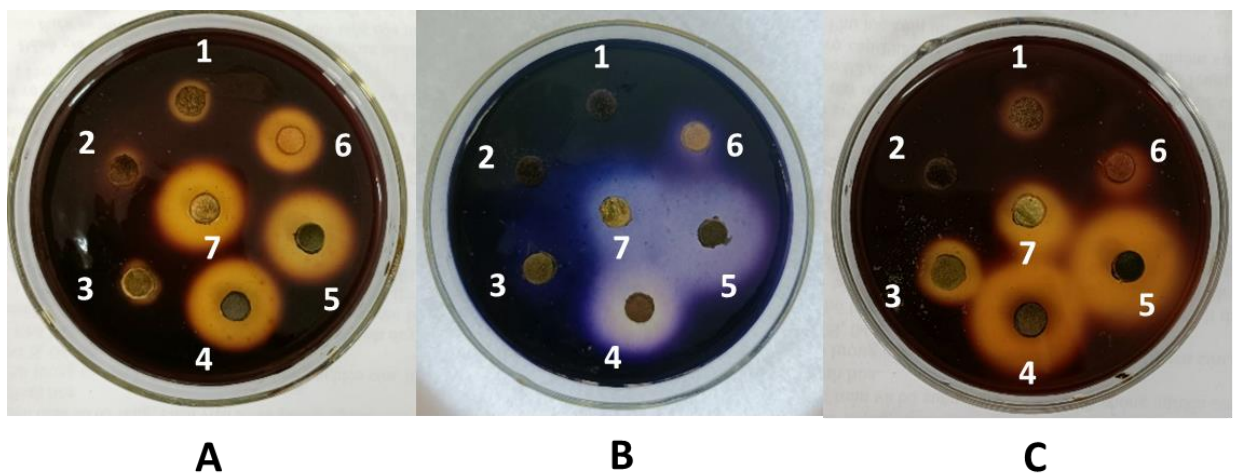
531 TD12.3.



532

533 **Fig 3.** Phylogenetic relationship between isolated fungi from the surface of wood storage boxes. The  
534 number in the branch indicates the bootstrap value with 1000 bootstrap replications.

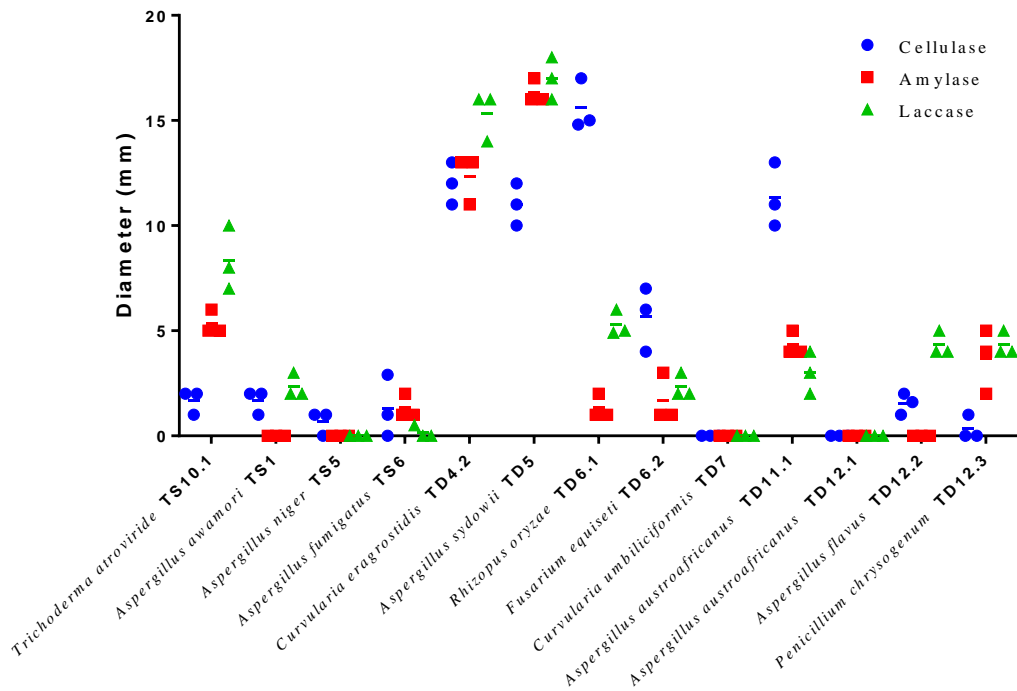
535



536

537 **Fig 4.** Enzyme activity-tested plates. A) Cellulase; B) Amylase; C) Laccase. Positions on the plates:  
 538 1) *Aspergillus awamori* TS1; 2) *Aspergillus niger* TS5; 3) *Penicillium chrysogenum* TD12.3; 4)  
 539 *Curvularia eragrostidis* TD4.2; 5) *Aspergillus sydowii* TD5; 6) *Fusarium equiseti* TD6.2; 7) *Aspergillus*  
 540 *austrorfricanus* TD11.1.

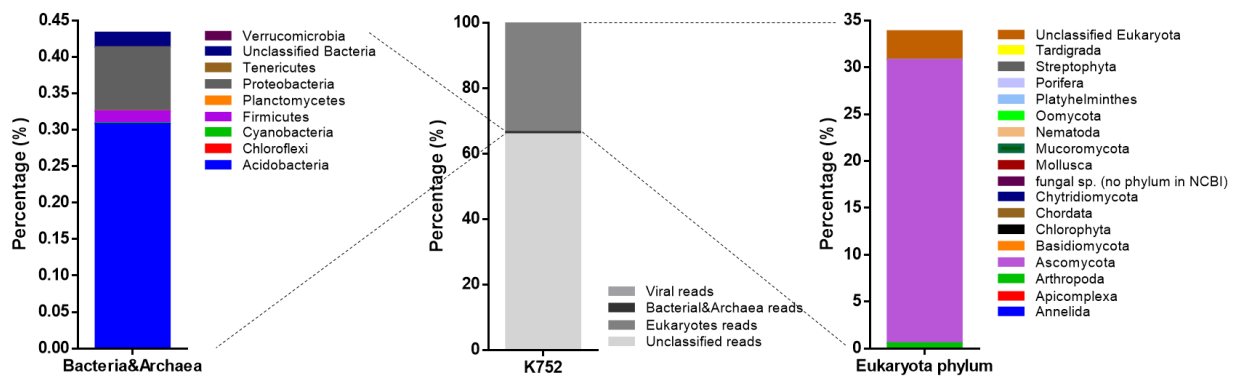
541



542

543 **Fig 5.** Enzyme activity comparison between isolated fungi. The scatter dot graph presents enzyme  
 544 diffused activity as the diameter of the halo zone. Two-way ANOVA,  $p < 0.0001$ .

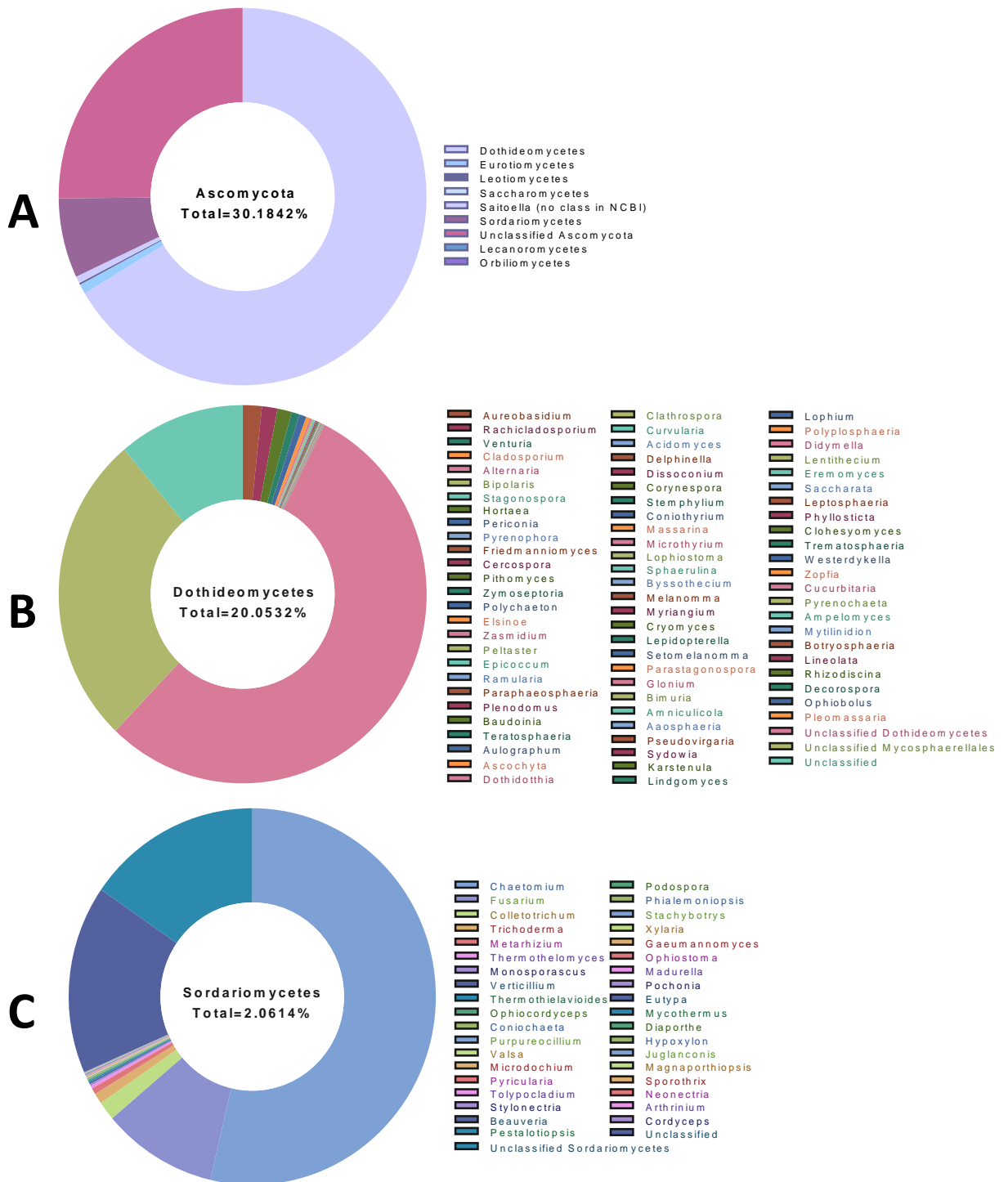
545



546

547 **Fig 6.** Community structure at domain and phylum levels of biological community on the surface of  
 548 pine wood storage boxes in the tropical region.

549



550

551 **Fig 7.** Taxonomic profiling of dominant groups at Ascomycota phylum (A); Dothideomycetes class

552 (B); Sordariomycetes class (C) .

553



**Table 1.** Best hit in GenBank database of 13 fungal isolates

<b>Fungal isolates</b>	<b>GenBank accession</b>	<b>Best hit</b>	<b>Identity (%)</b>
<i>Trichoderma atroviride</i> TS10.1	OR939722.1	<i>Trichoderma atroviride</i> strain P1	99.89
<i>Aspergillus fumigatus</i> TS6	OR939721.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> strain DTO 402-H1	100
<i>Aspergillus niger</i> TS5	OR135784.1	<i>Aspergillus niger</i> strain DUCC5709	99.51
<i>Aspergillus awamori</i> TS1	OR939719.1	<i>Aspergillus awamori</i> strain TD1	100
<i>Penicillium chrysogenum</i> TD12.3	OR939718.1	<i>Penicillium chrysogenum</i> isolate rm22	100
<i>Aspergillus flavus</i> TD12.2	OR939717.1	<i>Aspergillus flavus</i> strain NRRL 3357	100
<i>Aspergillus austroafricanus</i> TD12.1	OR939716.1	<i>Aspergillus austroafricanus</i> strain IBT 32289	100
<i>Aspergillus austroafricanus</i> TD11.1	OR939715.1	<i>Aspergillus austroafricanus</i> strain IBT 32289	100
<i>Curvularia umbiliciformis</i> TD7	OR939713.1	<i>Curvularia mebaldsii</i> strain BRIP12900	97.11
<i>Fusarium equiseti</i> TD6.2	OR939712.1	<i>Fusarium sulawesiense</i> strain NRRL 66472	100
<i>Rhizopus oryzae</i> TD6.1	OR939711.1	<i>Rhizopus delemar</i> strain DTO 466-C7	100
<i>Aspergillus sydowii</i> TD5	OR135783.1	<i>Aspergillus sydowii</i> strain DTO:245-H7	99.72
<i>Curvularia eragrostidis</i> TD4.2	OR135782.1	<i>Curvularia bannonii</i> strain CN024C4	99.64

555

556





Tìm kiếm trong thư



Soạn thư

Hộp thư đến

Có gắn dấu sao

Đã tạm ẩn

Quan trọng

Đã gửi

Thư nháp 10

Danh mục

**Mạng xã hội** 63**Nội dung cập nhật** 9

Diễn đàn

**Quảng cáo** 625

Hiện thêm

Nhãn

Conversation History

Dietmoitrongtin2013@g...

Lịch sử Hội thoại

Notes

## Your submission has been accepted to Brazilian Journal of Biology

Hộp thư đến x

**Brazilian Journal of Biology** <noreply.ojs2@scielo.org>  
đến tôi

The following email was sent to Anh T.N. Dao from Brazilian Journal of Biology regarding Structure of fungal community and culturable fu tropical region in Dong Nai, Vietnam.

You are receiving a copy of this notification because you are identified as an author of the submission. Any instructions in the message b action is required of you at this time.

Dear Anh T.N. Dao,

I am pleased to inform you that we have decided to accept your submission without further revision. After careful review, we found your s the discolored surfaces of pine storage boxes in the tropical region in Dong Nai, Vietnam, to meet or exceed our expectations. We are ex thank you for choosing our journal as a venue for your work.

Your submission is now forthcoming in a future issue of Brazilian Journal of Biology and you are welcome to include it in your list of publi successful submission and we want to congratulate you on reaching this stage.

Your submission will now undergo copy editing and formatting to prepare it for publication.

You will shortly receive further instructions.

If you have any questions, please contact me from your [submission dashboard](#).

Kind regards,

Brazilian Journal of Biology

**Esta mensagem pode conter informação confidencial, sendo seu sigilo protegido por lei. Se você não for o destinatário ou a p copiar ou divulgar as informações nela contidas ou tomar qualquer ação baseada nessas informações. Se você recebeu esta n**