

PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH NẤM SỢI TRÊN BỀ MẶT SƠN TƯỜNG PHÒNG THỬ NGHIỆM TẠI HÒA LẠC

Nguyễn Thị Kim Thanh^{1*}, Đỗ Thị Tuyền^{1,2}, Trần Khánh Linh^{1,2}, Nguyễn Thị Hiếu Thu¹, Nguyễn Việt Thắng¹, Georgiy M Bukharev¹, Ngô Cao Cường¹

¹Trung tâm Nhiệt đới Việt Nga - Bộ Quốc phòng

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Sự phát triển của nấm sợi trên bề mặt sơn tường có ảnh hưởng lớn đến tính thẩm mỹ, cấu trúc và chất lượng của bức tường. Sơn tường có bổ sung bioxide được thử nghiệm trong phòng kín tại Hòa Lạc nhằm đánh giá hiệu quả kháng nấm. Mục tiêu của nghiên cứu là phân lập và nghiên cứu đặc điểm các chủng nấm sợi gây hại, sinh trưởng trên sơn tường có bổ sung bioxide và đối chứng không có bioxide ở phòng thử nghiệm Hòa Lạc. Đánh giá hệ nấm sợi phân lập từ 8 mẫu thu thập trên bề mặt sơn phòng thử nghiệm cho thấy trên mỗi mẫu phân lập được 1-4 chủng, mật độ nấm sợi phân lập trên đĩa trung bình dao động từ 0,92-34,48 CFU/cm², trong đó, số chủng và mật độ nấm sợi trung bình trên mẫu sơn tường có bổ sung bioxide thấp hơn so với mẫu đối chứng không bổ sung bioxide. Tổng số 7 chủng nấm sợi khác nhau đã được phân lập. Dựa vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc, cuống sinh bào tử, bào tử và so sánh tương đồng với các trình tự vùng ITS trên cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI), 7 chủng nấm sợi phân lập được xác định gồm *Fusarium* sp. S1.1, *Aspergillus flavus* S1.2, *Penicillium citrinum* S1.3, *Aspergillus niger* S2.1, *Aspergillus* sp. S3.3, *Aspergillus nomiae* S5.3, *Aspergillus frequens* S6.2. Hầu hết các chủng có khả năng sinh enzyme ngoại bào cellulase và laccase, chủng *Penicillium citrinum* S1.3 cho hoạt tính tốt nhất với cả hai loại enzyme. Nghiên cứu này đã bước đầu đánh giá hiệu quả của việc bổ sung bioxide vào sơn tường, đồng thời cung cấp dữ liệu cho việc thử nghiệm, nghiên cứu sâu hơn về hoạt chất kháng nấm giúp cải thiện khả năng bảo vệ của sơn tường.

Từ khóa: Bioxide, hoạt chất kháng nấm, nấm sợi, phân hủy sinh học, sơn tường.

MỞ ĐẦU

Sơn tường là một trong những vật liệu quan trọng của ngành xây dựng, được sử dụng phổ biến và rất cần thiết cho các công trình xây dựng. Trong điều kiện khí hậu nhiệt đới gió mùa với độ ẩm và nhiệt độ cao của Việt Nam, nấm sợi có khả năng bám dính tốt dễ dàng xâm nhập và phát triển trên bề mặt sơn tường. Nấm sợi được coi là nguyên nhân chính gây ra sự phân hủy sinh học của các bức tường và nhiều bề mặt vật liệu xây dựng khác (Sterflinger *et al.*, 2013). Sự xuất hiện của nấm sợi trên các mảng tường gây ra các vấn đề về thẩm mỹ và có thể dẫn đến sự xuống cấp và bong tróc, phồng rộp của lớp sơn phủ, qua đó tác động đến sức khỏe con người. Hơn nữa, nấm sợi có thể ăn sâu vào bề mặt tường, tạo ra các vết nứt ảnh hưởng đến cấu trúc vật liệu và làm suy yếu chúng (Shirakawa *et al.*, 2002). Do hoạt động trao đổi chất của từng loại nấm sợi, một số nấm tạo ra các sắc tố khác nhau (xanh lá cây, xám, đen, nâu,...) phụ thuộc vào từng loài, thành phần sơn tường, sự hiện diện của các vi sinh vật khác và các yếu tố môi trường (Marco *et al.*, 2020). Các sợi nấm có xu hướng bám trên bề mặt sơn tường, sản xuất ra polysaccharide ngoại bào (EPS) giúp nấm sợi bám dính, tạo màng sinh học. Nấm sợi có thể hình thành các bào tử có khả năng chống chịu cao với các điều kiện bất lợi và dễ dàng phát tán vào không khí, bám vào mọi vật liệu (Ngo *et al.*, 2021). Đồng thời chúng có khả năng sản sinh các enzyme thủy phân ngoại bào như cellulase, lipase, protease, esterase, peroxidase, laccase,... thúc đẩy quá trình phân hủy sinh học bề mặt vật liệu, tạo ra nguồn carbon và khoáng chất cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật. Nhiều vi sinh vật được phát hiện trên bề mặt sơn tường chỉ là chất gây ô nhiễm trong không khí, không tham gia vào quá trình phân hủy. Tuy nhiên, những vi sinh vật gây ô nhiễm này có thể cung cấp chất hữu cơ hoặc các chất dinh dưỡng khác, tạo điều kiện thuận lợi cho các vi sinh vật có khả năng phân hủy vật liệu sinh trưởng và phát triển (Zucconi *et al.*, 2022).

Nhiều nghiên cứu chỉ ra các chi nấm sợi phổ biến thường tìm thấy trên bề mặt sơn tường hoặc tranh tường bao gồm *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Fusarium* và *Trichoderma* (Sterflinger *et al.*, 2013; Rosado *et al.*, 2014). Trong đó các chi *Aspergillus* và *Penicillium* là phổ biến nhất vì chúng được bắt gặp thường xuyên trong môi trường tự nhiên do khả năng sản sinh nhiều bào tử và dễ dàng phát tán trong không khí (Zucconi *et al.*, 2022).

Để giảm sự tác động của nấm sợi đến sơn tường, các hoạt chất diệt nấm thường được nghiên cứu sử dụng. Việc sử dụng các bioxide là phụ gia của sơn được nghiên cứu sử dụng phổ biến để ngăn chặn sự phát triển của

nấm sợi và vi khuẩn. Nghiên cứu của Gaylarde cho thấy hoạt chất diệt nấm có chứa đồng có thể làm chậm sự đổi màu của bức tường sơn trong 6 năm và được chứng minh là làm giảm đáng kể sinh khối vi khuẩn và nấm sợi. Chất diệt nấm có nguồn gốc isothiazolinone, carbendazim, 2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (OIT) và 3-iodo-2-propylbutyl carbamate (IPBC) thường được sử dụng rộng rãi trong các công thức sơn (Gaylarde *et al.*, 2011).

Để phát triển các phương pháp, hoạt chất và chế phẩm kháng nấm trên sơn tường, việc phân lập và xác định đặc điểm sinh học của các chủng nấm sợi gây hại là rất quan trọng, cung cấp dữ liệu cho các nghiên cứu thử nghiệm và đánh giá. Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập, xác định đặc điểm sinh học và định danh các chủng nấm trên sơn tường thử nghiệm có và không có hoạt chất diệt nấm bioxide tại Trạm thử nghiệm khí hậu Hòa Lạc, thuộc Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga. Từ đó, hiệu quả kháng nấm của sơn tường thử nghiệm sẽ được đánh giá, nhằm mở rộng ứng dụng và nâng cao hiệu quả bảo vệ của chúng.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Các mẫu nghiên cứu được thu thập trên bề mặt sơn tại 2 lô thử nghiệm có và không có hoạt chất diệt nấm bioxide và được bố trí ở cùng cùng 1 điều kiện của phòng thử nghiệm tại Trạm thử nghiệm khí hậu Hòa Lạc thuộc Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga. Các mẫu đựng trong túi vô trùng, vận chuyển về phòng thí nghiệm và bảo quản ở 4°C cho đến khi tiến hành phân lập.

Phương pháp

Lấy mẫu và phân lập nấm sợi

Tổng số 8 vị trí lấy mẫu khác nhau được xác định trên tường sơn tại phòng thử nghiệm ở cùng một thời điểm. Mỗi vị trí được khoanh vùng với diện tích bề mặt sơn tường mỗi ô là 5 x 5 cm, quan sát và chụp ảnh bằng kính hiển vi cầm tay DM WF120. Thu mẫu bằng cách sử dụng tấm bông lấy mẫu cán gỗ loại tiết trùng (Medisafe, Trung Quốc), quết kín lên bề mặt sơn tại vị trí các ô đã được xác định. Các chủng nấm sợi được phân lập bằng cách phết đều đầu tấm bông trực tiếp trên đĩa petri chứa môi trường Czapek–Dox (30 g sucrose, 7,5 g peptone, 1 g K₂HPO₄, 0,5 g MgSO₄.7H₂O, 0,5 g KCl, 0,01 g FeSO₄, nước cất 1 L, pH 7,0) có bổ sung hỗn hợp kháng sinh (100 mg/L ampicillin; 100 mg/L tetracycline). Đặt đĩa thạch ở nhiệt độ 28-30°C trong 3 - 5 ngày. Mật độ nấm sợi trung bình (CFU/cm²) được xác định bằng số khuẩn lạc/ diện tích đĩa petri. Các chủng nấm sợi được thuần khiết bằng cách cấy chuyển nhiều lần trên môi trường thạch Czapek–Dox (Ngo *et al.*, 2021).

Đặc điểm sinh học của các chủng nấm sợi

Các chủng nấm được nuôi cấy trong tủ ẩm ở 28-30°C trên môi trường thạch Czapek–Dox có cảm la men nghiêng. Sau 72 giờ, la men được lấy ra quan sát hình thái cuống sinh bào tử và bào tử dưới kính hiển vi quang học Zeiss Axiocam 503 Color Camera Unit ở độ phóng đại 1000 lần.

Phân loại nấm sợi dựa trên trình tự ITS

Nấm sợi được phân loại bằng cách quan sát hình thái khuẩn lạc và cuống sinh bào tử kết hợp với xác định trình tự vùng ITS. DNA tổng số của nấm sợi được tách chiết bằng kit Fungi/Yeast DNA Extraction (Norgen, Canada). Trình tự ITS1–5,8S–ITS2 được khuếch đại từ DNA tổng số với cặp mồi ITS1F (5'- CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A - 3'); ITS4 (5' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3'). Sản phẩm PCR được tinh sạch, giải trình tự trên máy đọc trình tự động ABI PRISM@3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) tại công ty 1st BASE (Singapore). 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 trên NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Cây phả hệ được xây dựng bằng phần mềm Mega (ver.7).

Đánh giá khả năng sinh một số enzyme của các chủng nấm sợi phân lập

Xác định hoạt tính của cellulase, laccase của các chủng nấm sợi theo phương pháp đặt thỏi thạch. Các thỏi thạch chứa chủng nấm được đặt trên môi trường thạch cơ chất (bổ sung 1% Carboxymethyl cellulose (CMC), 0,05% guaiacol). Nhuộm màu đĩa thạch bằng dung dịch lugol 1%. Hoạt tính enzyme được đo bằng hiệu số D - d (trong đó D là đường kính vòng thủy phân (mm), d là đường kính của thỏi thạch (mm)) (Vedashree *et al.*, 2013).

Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần. Kết quả được tính toán bằng phần mềm Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) và được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± sai số.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập nấm sợi trên mẫu sơn thử nghiệm tại Hòa Lạc

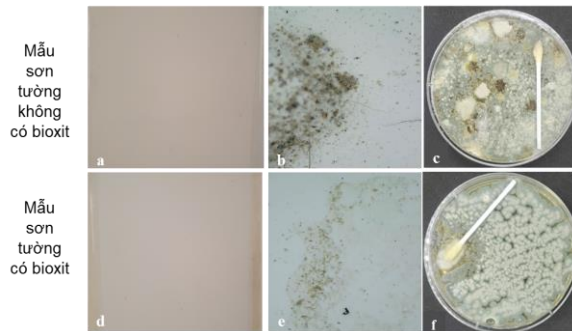
Tổng số 8 mẫu bề mặt sơn tường được thu thập ở phòng thử nghiệm tại Hòa Lạc. Trong đó, 4 mẫu kí hiệu S1, S2, S3, S4 là bề mặt sơn tường không bổ sung bioxide (Hình 1A), 4 mẫu còn lại S5, S6, S7, S8 được thu thập trên bề mặt sơn thử nghiệm bổ sung bioxide (Hình 1B).



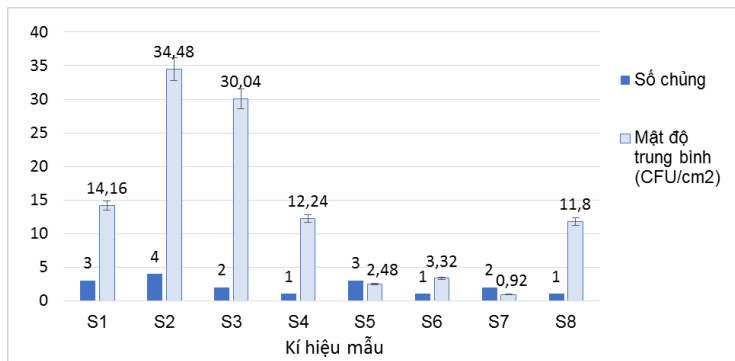
Hình 1. Các vị trí thu mẫu trên bề mặt sơn tường (A) Sơn tường đối chứng không bổ sung bioxide (B) Sơn tường thử nghiệm có bổ sung bioxide

Qua quan sát bên ngoài, khó nhận ra sự xuất hiện của nấm sợi. Kết quả phân tích ảnh chụp độ phóng đại 50x của 2 khu vực sơn tường thử nghiệm cho thấy có xuất hiện nấm sợi phát triển (Hình 2b, e). Nhìn chung, hệ nấm sợi trên các khu vực sơn tường đối chứng không bổ sung bioxide cao hơn các khu vực khác.

Kết quả phân lập các mẫu trên môi trường Czapek–Dox cho thấy số chủng nấm sợi phân lập và mật độ nấm sợi trung bình trên các mẫu sơn tường không bioxide cao hơn so với mẫu sơn thử nghiệm có bioxide (Hình 3). Độ đa dạng nấm sợi ở các mẫu thu được khác nhau đáng kể. Mật độ trung bình các chủng nấm sợi phân lập từ mẫu sơn tường không bổ sung bioxide là 22,73 CFU/cm² cao gấp gần 5 lần mẫu có bổ sung bioxide (mật độ trung bình 4,63 CFU/cm²). Mẫu S2 phân lập được 4 chủng nấm sợi, đồng thời mật độ vi sinh vật cao nhất ở mẫu S2 chiếm 34,48 CFU/cm². Có thể nhận thấy mẫu S2 ở vị trí thấp khu vực chân tường dễ bị thấm nước nên thường có độ ẩm cao hơn các khu vực khác, thích hợp cho nấm sợi phát triển. Khi bổ sung các hoạt chất diệt nấm vào sơn tường, mật độ và số chủng giảm đi đáng kể. Như vậy, sơn tường có bổ sung bioxide cho thấy có tác dụng ức chế đáng kể đối với nấm sợi, chỉ những chủng có khả năng thích nghi tốt mới có thể phát triển trên điều kiện môi trường này.



Hình 2. Hình ảnh quan sát sự phát triển của nấm sợi trên bề mặt sơn tường (a) (d) Bề mặt sơn tường, (b) (e) sợi nấm trên bề mặt mẫu chụp với độ phóng đại 50x, (c) (f) đĩa phân lập nấm sợi trên môi trường Czapek–Dox sau 5 ngày nuôi cấy

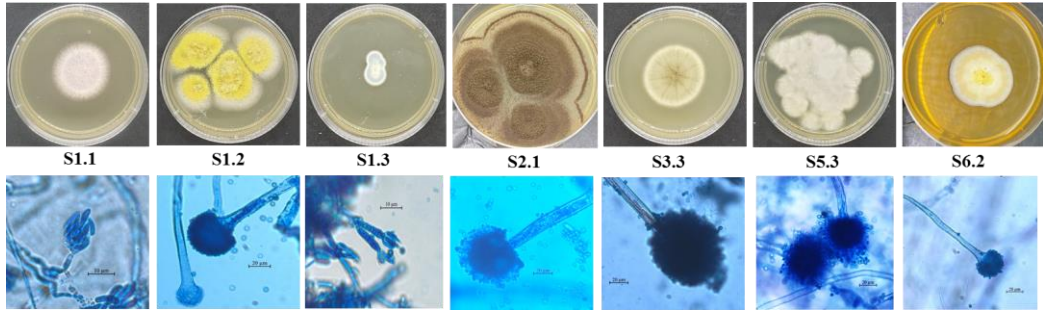


Hình 3. Mật độ nấm sợi và số chủng nấm phân lập được trên môi trường Czapek–Dox

Đặc điểm sinh học các chủng nấm sợi phân lập

Từ 8 mẫu thu thập trên bề mặt sơn tường thử nghiệm tại Hòa Lạc đã phân lập trên môi trường Czapek–Dox được 7 chủng nấm sợi khác nhau về đặc điểm hình thái khuẩn lạc, cuống bào tử và bào tử. Kết quả được mô tả ở Hình 4 và Bảng 1. Tất cả các chủng đều có dạng khuẩn lạc tỏa tròn, có màu sắc, dạng nhung hoặc bông xốp, hệ sợi phát triển, sinh bào tử.

Từ kết quả quan sát hình dạng khuẩn lạc, dạng hệ sợi, cuống sinh bào tử và bào tử của các chủng nấm sợi phân lập có thể sơ bộ đưa ra đánh giá phân loại tới bậc chi của chúng. Nhận thấy 5 chủng S1.2, S2.1, S3.3, S5.3, S6.2 có đặc điểm hệ sợi, cuống bào tử trần, bong hình cầu, bào tử trần hình cầu, sơ bộ đánh giá chúng thuộc chi *Aspergillus*; chủng S1.1 có đặc điểm thuộc chi *Fusarium* và S1.3 thuộc chi *Penicillium* (Miên, 2015).



Hình 4. Hình thái khuẩn lạc (hình trên) và bào tử (hình dưới) các chủng nấm sợi phân lập thuần khiết từ mẫu sơn tường trong phòng thử nghiệm kín Hoà Lạc

Bảng 1. Đặc điểm hình thái các chủng nấm sợi phân lập

Kí hiệu chủng	Đặc điểm khuẩn lạc	Đặc điểm bào tử	Phân loại đến chi
S1.1	Khuẩn lạc lồi, trắng, bông, bên trong xám. Mặt sau trắng, ngả vàng vào trong	Sợi nấm có vách ngăn ngang và phân nhánh, cuống bào tử mọc trực tiếp từ sợi nấm, có dạng búp măng và nhỏ dần về đỉnh, có vách ngăn ở phần gốc; bào tử có hình thuyền, thuôn dài, nhỏ về 2 đầu, có ba vách ngăn.	<i>Fusarium</i> (Miên, 2015)
S1.2	Khuẩn lạc lồi, bề mặt xốp nhẹ, màu vàng sau chuyển màu lục vàng, lục khi già	Giá bào tử trần thành dày, không màu, ráp; bong hình elongate khi non, sau gần cầu đến cầu; thể bình 1 hoặc 2 tầng, Bào tử trần gần cầu đến cầu.	<i>Aspergillus</i> (Miên, 2015)
S1.3	Khuẩn lạc dạng nhung viền trắng, vòng xanh lục, phía tâm hệ sợi ngả vàng	Hệ sợi phân nhánh và có vách ngăn. Cuống sinh bào tử phân nhánh, đầu đỉnh chùm 3-6 thể bình đều hướng lên song song dạng chổi. Bào tử trần, hình cầu, đỉnh từng chùm trên mỗi thể bình.	<i>Penicillium</i> (Miên, 2015)
S2.1	Mặt khuẩn lạc dạng xốp bông, đầu sinh bào tử hình tia hoặc hình cột tẻ, màu nâu oliu nhạt đến nâu oliu, hệ sợi nấm màu trắng, mặt trái vàng sậm	Cuống sinh bào tử trần kích thước thay đổi, nhẵn, không màu hoặc nâu nhẹ ở nửa phía trên của cuống. Bong hình cầu hoặc gần cầu, thể bình 2 tầng, có màu nâu nhạt, thể bình tương đối đồng đều. Bào tử trần hình cầu khi trưởng thành.	<i>Aspergillus</i> (Miên, 2015)
S3.3	Khuẩn lạc lồi, viền trắng, có các vệt nâu hướng từ tâm ra	Cuống sinh bào tử thu nhỏ ở phần gần bong. Bong hình gần cầu đến elongate. Thể bình 1 tầng, 2 tầng hoặc cả 2. Bào tử trần hình cầu, gần cầu đến hình trứng.	<i>Aspergillus</i> (Miên, 2015)
S5.3	Khuẩn lạc hơi lồi, bông trắng, hệ sợi phát triển. Mặt sau viền trắng ngả vàng bên trong	Cuống sinh bào tử trần kích thước thay đổi, không màu hoặc nâu nhẹ, thể bình 2 tầng, có màu nâu nhạt. Bào tử trần hình cầu.	<i>Aspergillus</i> (Miên, 2015)
S6.2	Khuẩn lạc viền trắng, vòng xanh lục, phía tâm hệ sợi ngả vàng	Cuống sinh bào tử hình ống, hình thành trên một tế bào của sợi nấm. Đầu cuống phình to hình cầu, hình bầu dục hay hình chùy. Có hai lớp mang bào tử dính vào thể bình. Bào tử trần hình cầu.	<i>Aspergillus</i> (Miên, 2015)

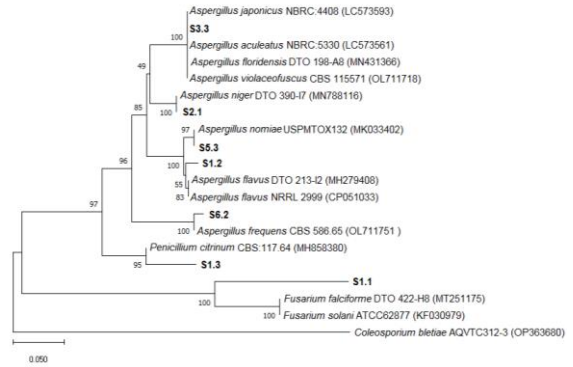
Định danh các chủng nấm sợi phân lập

Việc định danh các chủng nấm sợi phân lập bằng phương pháp sinh học phân tử thông qua phân tích trình tự ITS nhằm bổ sung cho phân tích đặc điểm hình thái khuẩn lạc và bào tử nấm sợi. Bảng 2 và Hình 5 cho kết quả định danh các chủng nấm sợi phân lập bằng phương pháp sinh học phân tử thông qua phân tích trình tự ITS. Trình tự nucleotide vùng ITS của 7 chủng nấm phân lập cho thấy độ tương đồng cao (> 98%) so với trình tự các loài nấm đã biết trên cơ sở dữ liệu GenBank. 7 chủng nấm phân lập được có quan hệ gần gũi với các chi

Fusarium, *Aspergillus*, *Penicillium*. Trong đó, chi phổ biến nhất là *Aspergillus* (5 chủng S1.2, S2.1, S3.3, S5.3, S6.2), chi *Fusarium* có 1 chủng S1.1 và *Penicillium* gồm 1 chủng S1.3. Theo nghiên cứu của Brandt, *Aspergillus* có tỷ lệ phổ biến nhất trong bộ sưu tập các mẫu phân lập từ các nguồn khác nhau tại Việt Nam, tiếp theo đó là *Penicillium* (Brandt *et al.*, 2018).

Bảng 2. So sánh trình tự đoạn ITS của các chủng nấm phân lập với một số chủng nấm đại diện trên GenBank (NCBI)

Ký hiệu chủng	Mã số đăng kí trên Genbank (NCBI)	Các chủng nấm gần gũi được so sánh	Độ tương đồng cao nhất (%)
S1.1	PP937578	<i>Fusarium</i> sp.	98,78
S1.2	PP937579	<i>Aspergillus flavus</i>	100
S1.3	PP937580	<i>Penicillium citrinum</i>	100
S2.1	PP937581	<i>Aspergillus niger</i>	99,89
S3.3	PP937582	<i>Aspergillus</i> sp.	100
S5.3	PP937583	<i>Aspergillus nomiae</i>	100
S6.2	PP937584	<i>Aspergillus frequens</i>	100



Hình 5. Cây phát sinh loài của các chủng nấm sợi phân lập được dựa trên trình tự vùng ITS

Các chủng đại diện tham chiếu với giá trị Bootstrap 1000 sử dụng thuật toán Kimura 2-parameter và G+I.

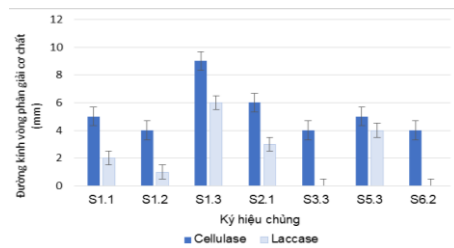
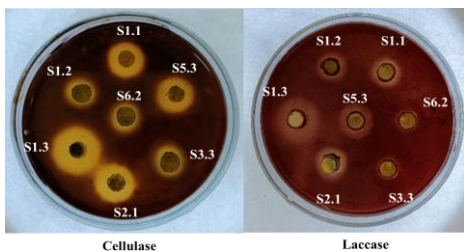
Dựa vào kết quả nghiên cứu về đặc điểm hình thái, đặc điểm bào tử và phân tích trình tự ITS, bảy chủng nấm sợi phân lập được định tên và đăng kí mã số truy cập trên cơ sở dữ liệu Genbank gồm *Fusarium* sp. S1.1 (PP937578), *Aspergillus flavus* S1.2 (PP937579), *Penicillium citrinum* S1.3 (PP937580), *Aspergillus niger* S2.1 (PP937581), *Aspergillus* sp. S3.3 (PP937582), *Aspergillus nomiae* S5.3 (PP937583), *Aspergillus frequens* S6.2 (PP937584).

Nghiên cứu của Bashir phân lập nấm từ sự xuống cấp của bề mặt tường sơn tại Pakistan thu được các chi phổ biến nhất là *Penicillium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Acremonium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Mucor* và *Alternaria* (Bashir *et al.*, 2016). Các chi nấm sợi phân lập được *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* thường phân bố rộng và phổ biến, dễ dàng tìm thấy trong môi trường tự nhiên ở điều kiện khí hậu nhiệt đới ẩm gió mùa như Việt Nam (Brandt *et al.*, 2018).

Trong 4 mẫu sơn tường có bổ sung bioxide, chỉ phân lập được 3 chủng gồm *P. citrinum* S1.3, *A. nomiae* S5.3, *A. frequens* S6.2 cho thấy các chủng này có khả năng thích nghi được trong điều kiện có bioxide, tuy nhiên mật độ chủng không cao.

Khả năng sinh tổng hợp một số enzyme ngoại bào của các chủng nấm phân lập

Bảy chủng nấm sợi phân lập được nghiên cứu khả năng sinh enzyme ngoại bào bằng cách xác định đường kính vòng phân giải cơ chất CMC và Guaiacol. Kết quả hình 6 cho thấy ngoại trừ S3.3 và S6.2 chỉ sinh tổng hợp cellulase, tất cả các chủng còn lại đều có khả năng sinh tổng hợp cả 2 loại enzyme ngoại bào. Các chủng có khả năng phân giải CMC tốt hơn hẳn so với Guaiacol. Chủng *Penicillium citrinum* S1.3 cho kết quả phân giải tốt nhất với cả 2 loại cơ chất (đường kính vòng phân giải cơ chất của enzyme cellulase đạt 9 mm và laccase đạt 6 mm). Chủng *P. citrinum* cũng đã được nghiên cứu có khả năng sinh các enzyme ngoại bào như cellulase, laccase, lipase, esterase.... (Khan *et al.*, 2023). Với việc sản sinh các enzyme ngoại bào, các chủng nấm sợi có khả năng xúc tác đẩy nhanh quá trình phân hủy thành phần của sơn tường, làm biến đổi màu sắc, hình dạng, đặc tính, gây hư hỏng cho bề mặt sơn.



Hình 6. Khả năng phân giải cơ chất của các chủng nấm sợi phân lập
(a) Vòng phân giải cơ chất; (b) Đường kính vòng phân giải cơ chất.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã đánh giá mật độ và số chủng nấm sợi phân lập từ sơn tường có bổ sung bioxide cao hơn hẳn so với mẫu đối chứng không bổ sung bioxide. Từ 8 mẫu thử nghiệm và đối chứng thu thập, đã phân lập được 7 chủng nấm sợi. Hình thái khuẩn lạc, cuống bào tử và bào tử của các chủng nấm cho phép xác định chúng thuộc 3 chi nấm *Fusarium*, *Aspergillus* và *Penicillium*. Các kết quả định danh dựa trên vùng ITS của các chủng nấm phân lập đã xác định lần lượt là *Fusarium* sp. S1.1 (PP937578), *Aspergillus flavus* S1.2 (PP937579), *Penicillium citrinum* S1.3 (PP937580), *Aspergillus niger* S2.1 (PP937581), *Aspergillus* sp. S3.3 (PP937582), *Aspergillus nomiae* S5.3 (PP937583), *Aspergillus frequens* S6.2 (PP937584). Hầu hết các chủng đều có khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulase và laccase, trong đó chủng *P. citrinum* S1.3 cho hoạt tính cao nhất với cả 2 loại enzyme khảo sát.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí của đề tài: Đặc điểm của phá hủy vi sinh trên vật liệu và thiết bị, xây dựng các biện pháp bảo vệ chúng trong điều kiện khí hậu nhiệt đới. Đề tài cấp UBPH, mã số T1.3 2022-2023.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bashir U, Hafeez R (2016). Deterioration of painted wall surface by fungal saprobes: isolation and identification. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 28(1): 09-13.
- Brandt SC, Ellinger B, van Nguyen T, Thi QD, Van Nguyen G, Baschien C, et al. (2018). A unique fungal strain collection from Vietnam characterized for high performance degraders of bioecological important biopolymers and lipids. *PLoS One*, 13(8): e0202695.
- Gaylarde C, Morton L, Loh K, Shirakawa M (2011). Biodeterioration of external architectural paint films—A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(8): 1189-1198.
- Khan S, Ali SA, Ali AS (2023). Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by mesophilic fungus '*Penicillium citrinum*' isolated from soils of plastic waste dump yard, Bhopal, India. *Environ Technol*, 44(15): 2300-2314.
- Marco A, Santos S, Caetano J, Pintado M, Vieira E, Moreira PR (2020). Basil essential oil as an alternative to commercial biocides against fungi associated with black stains in mural painting. *Build Environ*, 167: 106459.
- Đặng Vũ Hồng Miên (2015). *Hệ nấm mốc ở Việt Nam - phân loại, tác hại, độc tố, cách phòng chống*. NXB Khoa học và Kỹ thuật.
- Ngo CC, Nguyen QH, Nguyen TH, Quach NT, Dudhagara P, Vu THN, et al. (2021). Identification of fungal community associated with deterioration of optical observation instruments of museums in Northern Vietnam. *Applied Sciences*, 11(12): 5351.
- Rosado T, Gil M, Caldeira AT, Martins MdR, Dias CB, Carvalho L, et al. (2014). Material characterization and biodegradation assessment of mural paintings: Renaissance frescoes from Santo Aleixo Church, Southern Portugal. *International Journal of Architectural Heritage*, 8(6): 835-852.
- Shirakawa MA, Gaylarde CC, Gaylarde PM, John V, Gambale W (2002). Fungal colonization and succession on newly painted buildings and the effect of biocide. *FEMS Microbiol Ecol*, 39(2): 165-173.
- Sterflinger K, Piñar G (2013). Microbial deterioration of cultural heritage and works of art—tilting at windmills? *Appl Microbiol Biot*, 97: 9637-9646.
- Vedashree S, Sateesh MK, Lakshmeesha T, Mohammed SS, Vedamurthy A (2013). Screening and assay of extracellular enzymes in *Phomopsis azadirachtae* causing die-back disease of neem. *Journal of Agricultural Technology*, 9(4): 915-927.
- Zucconi L, Canini F, Isola D, Caneva G (2022). Fungi affecting wall paintings of historical value: A worldwide meta-analysis of their detected diversity. *Applied Sciences*, 12(6): 2988.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FUNGI ON PAINTED WALL SURFACES IN HOA LAC AREA

Nguyen Thi Kim Thanh^{1*}, Do Thi Tuyen^{1,2}, Tran Khanh Linh^{1,2}, Nguyen Thi Hieu Thu¹,
Nguyen Viet Thang¹, Georgiy M Bukharev¹, Ngo Cao Cuong^{1,2}

¹Joint Vietnam - Russia Tropical Science and Technology Research Center

²Graduate University of Science and Technology - Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi

SUMMARY

The growth of fungi on painted wall surfaces greatly impacts on the aesthetics, structure and quality of the wall. To evaluate the antifungal effectiveness, wall paint with added biocide was tested in a closed room in Hoa Lac. The objective of this study was to isolate and study the biological characteristics of harmful fungal strains growing on painted wall surfaces with added biocide and control without biocide in Hoa Lac area. Evaluation of the fungi isolated from 8 samples collected on the painted wall surface in the laboratory showed that 1-4 strains were present on each collected samples, the average fungal density on the isolated petri dish ranged from 0.92-34.48 CFU/cm², in which, the number of strains and the average fungal density on the painted wall samples with added biocide were lower than the control samples without added biocide. A total of 7 different fungal strains were isolated. Based on the morphological characteristics of colonies, conidiophores, spores, and similarity comparison with ITS region sequences on the GenBank database (NCBI), 7 isolated fungal strains were identified including *Fusarium* sp. S1.1, *Aspergillus flavus* S1.2, *Penicillium citrinum* S1.3, *Aspergillus niger* S2.1, *Aspergillus* sp. S3.3, *Aspergillus nomiae* S5.3, *Aspergillus frequens* S6.2. Most strains were capable of producing extracellular enzymes including cellulase and laccase. The strain of *Penicillium citrinum* S1.3 had the best activity with both types of enzymes. Thus, this study initially evaluated the effectiveness of adding biocide to the wall paint, and at the same time provided data for further research on antifungal active ingredients to improve the protective ability of wall paint.

Keywords: Biocide, antifungal active ingredients, fungi, biodegradation, wall paint.

* Author for correspondence: Tel: 0982010336; Email: ngocaocuong2011@gmail.com; Tel: 0983124291; Email: kimthanht2301@gmail.com