

Khảo sát nấm mốc có khả năng phân giải cellulose thu nhận từ rừng Mã Đà, Đồng Nai

The investigation of fungi's cellulose degradation. A study at Ma Da forest, Dong Nai

Hồ Bảo Thùy Quyên^{1*}, Phạm Nguyễn Phương Thảo², Nguyễn Mỹ Phi Long²

¹Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQG Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: quyen.hbt@ou.edu.vn

THÔNG TIN

TÓM TẮT

DOI:10.46223/HCMCOUJS.
tech.vi.13.1.454.2018

Ngày nhận: 28/07/2018

Ngày nhận lại: 13/09/2018

Duyệt đăng: 15/10/2018

Từ khóa:

cellulose, cellulose, Mã Đà, nấm mốc

Rừng Mã Đà là một trong những khu bảo tồn quan trọng nhất tại Việt Nam, có thảm thực vật dày đặc. Đây là nguyên liệu cung cấp dinh dưỡng cho những nhóm nấm mốc có khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulase, do hệ nấm mốc này tham gia vào chu trình carbon thông qua hoạt động phân giải cellulose. Nghiên cứu phân lập và giữ giống 220 chủng nấm mốc từ 6 mẫu đất thu tại các nơi khác nhau rừng Mã Đà (Đồng Nai). Định danh theo phương pháp so sánh hình thái được 19 chủng thuộc nhóm *Aspergillus niger*, 3 chủng thuộc *Curvularia* sp., 9 chủng thuộc *Penicillium lilacinum*, 2 chủng thuộc *Penicillium* sp.1, 3 chủng thuộc *Penicillium* sp.2, 3 chủng thuộc *Penicillium* sp.3, 2 chủng thuộc *Penicillium* sp.4, 1 chủng thuộc *Penicillium* sp.5, 3 chủng thuộc *Penicillium* sp.6, 3 chủng thuộc *Penicillium* sp.7 và 2 chủng thuộc *Trichoderma* sp. Khảo sát khả năng phân giải cellulose trên môi trường Czapek-Dox bổ sung 1% carboxyl methyl cellulose (CMC) cho thấy, tất cả các chủng nấm mốc này đều có khả năng phân giải cellulose. Trong đó các chủng có hoạt tính cellulase cao thuộc chi *Penicillium*. Kết quả của đề tài sẽ là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về đánh giá khả năng hoàn trả carbon cho tự nhiên của các hệ nấm mốc và thu nhận các chủng nấm mốc có hoạt tính cellulase cao để ứng dụng vào sản xuất.

ABSTRACT

Ma Da forest is one of the important natural reserves in Vietnam. Its vegetation is a nutritional supplement to filamentous fungi and cellulase production. The enzymatic systems of fungi that can degrade native cellulose play an important role in the cycle of carbon. This study isolated and maintained 220 varieties of mold from 6 different soil samples collected from different places of Ma Da (Dong Nai). The

Keywords:

cellulose, cellulose, Ma Da, mold

identification method based on morphology identified 19 strains of *Aspergillus niger*, 3 strains of *Curvularia* sp., 9 strains of *Penicillium lilacinum*, 2 strains of *Penicillium* sp.1, 3 strains of *Penicillium* sp.2, 3 strains of *Penicillium* sp.3, 2 strains of *Penicillium* sp., 4 strains of *Penicillium* sp., 3 strains of *Penicillium* sp.6, 3 strains of *Penicillium* sp. 7 and 2 strains of *Trichoderma* sp. The investigation of cellulose degradation on Czapek-dox medium with 1% carboxyl methylcellulose (CMC) showed that all fungi were capable of cellulose degradation, including the genus *Penicillium* with high cellulose activity. The results of the study will be the prerequisite for further studies of the assessment of mold systems' ability to return carbon to nature and to obtain molds with high cellulase activity for production.

1. Giới thiệu

Rừng Mã Đà hay “Khu bảo tồn thiên nhiên và di tích Vĩnh Cửu” là một trong những khu bảo tồn quan trọng nhất tại Việt Nam, có diện tích vùng là 68,368ha và diện tích đất rừng khoảng 78,8% - 89,3% với độ đa dạng và phong phú cao (Quynh, Nam, Duc, & Diep, 2010). Vì vậy, Rừng Mã Đà là nơi dự trữ nguồn gen của nhiều sinh vật bao gồm các hệ động vật, thực vật và vi sinh vật. Hệ sinh thái rừng thường tạo ra một lượng lớn vật liệu hữu cơ dưới dạng lá, cành, hoa, quả, hạt (Tandel, Kukadia, Kolambe, & Jadeja, 2009) nên một lượng lớn cellulose là thành phần chủ yếu của sinh khối thực vật chiếm 42-50% (Binder & Raines, 2009; Shields, Paul, Lowe, & Parkinson, 1973) đã được tích trữ lại trong và trên mặt đất cung cấp nguồn dinh dưỡng cho hệ vi sinh vật trong đất, đặc biệt là các sinh vật có khả năng phân giải cellulose nhờ hệ enzyme cellulase ngoại bào có ở các nhóm nấm, vi khuẩn, xạ khuẩn, ...

Ngày nay, cellulase đã và đang tiếp tục được sàng lọc với hy vọng thu nhận được nguồn enzyme có hoạt tính cao và ổn định (Sunna, Moracci, Rossi, & Antranikian, 1997; Vieille & Zeikus, 2001) nhằm phục vụ trong chuyển đổi sinh học các chất thải, trong công nghiệp dệt (Bhat, 2000), công nghiệp giấy (García et al., 2002; Stork et al., 1995), sử dụng trong sản xuất nhiên liệu sinh học (Dale, 1999; Lynd, Wyman, & Gemgross, 1999; Philippidis, 1994), chế biến thực phẩm như rượu bia, nước trái cây và nhiều lĩnh vực khác (Philippidis, 1994).

Trong hệ sinh thái thảm mục rừng, nấm mốc là một trong những nhóm quan trọng vì chúng tham gia vào các chu trình tuần hoàn vật chất, chu trình carbon thông qua quá trình phân hủy chất hữu cơ từ lá và hình thành chất mùn (Ardhiani, Nungki, & Endang, 2013; De Boer, Folman, Summerbell, & Boddy, 2005; Lynd, Weimer, van Zyl, & Pretorius, 2002). Trong nghiên cứu của Sri Laksmi & Narasimha đã thực hiện vào năm 2012 đã phân lập được chủng *Aspergillus* sp. từ thảm mục đất rừng với hoạt tính đạt 14.16U/ml cellulase (Sri Laksmi & Narasimha, 2012).

Nghiên cứu này khảo sát nấm mốc có khả năng phân giải cellulose ở rừng Mã Đà, Đồng Nai với mục tiêu xác định thành phần loài nấm mốc trong đất thu nhận từ rừng Mã Đà và khả năng phân giải cellulose của một số chủng phân lập được. Kết quả của nghiên cứu sẽ là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về đánh giá khả năng hoàn trả carbon cho tự nhiên của các hệ nấm mốc và thu nhận các chủng nấm mốc có hoạt tính cellulose cao để ứng dụng vào sản xuất.

2. Vật liệu - Phương pháp

2.1. Vị trí nghiên cứu và mẫu thu

Vùng rừng Mã Đà thuộc huyện Vĩnh Cửu tỉnh Đồng Nai có tọa độ địa lí 11°08'41" - 11°32'16" vĩ độ Bắc và 106°55'14" - 107°35'20" Kinh độ Đông. Nơi đây có địa hình tương đối bằng phẳng, đồi thấp, dạng lượn sóng, thấp dần từ Bắc xuống Nam và từ Tây sang Đông, khí hậu nhiệt đới gió mùa cận xích đạo chia thành 2 mùa rõ rệt: mùa mưa và mùa khô. Nhiệt độ trung bình năm từ 25 - 27°C, lượng mưa trung bình năm từ 2000 - 2800mm (Quynh et al., 2010).

Mẫu đất được thu theo phương pháp ngẫu nhiên trong rừng Mã Đà, gạt bỏ tầng thảm mục, thu 1kg đất ở lớp đất mặt, bảo quản trong túi zip có ghi các thông tin của mẫu. Tại phòng thí nghiệm, mẫu được để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng. Tiếp theo, mẫu được loại bỏ sỏi, đá và xác bã thực vật trước khi được nghiền và đồng nhất mẫu. Mẫu được giữ trong túi zipper có ký hiệu mẫu và bảo quản ở nhiệt độ phòng.

2.2. Phương pháp phân lập mốc từ đất

Các chủng nấm mốc được phân lập theo phương pháp pha loãng dãy nồng độ. 5g đất cho vào 45 ml nước muối 0,9% vô trùng, vortex ở 1200 vòng trong 5 phút để có được dịch đất pha loãng nồng độ 10^{-1} , việc pha loãng được thực để đạt được 10^{-6} . Hút 0,1 ml dịch đất pha loãng ở các nồng độ lên đĩa môi trường PDA có bổ sung kháng sinh Chloramphenicol (0,1g/lít), mỗi nồng độ cấy 2 đĩa, dùng que gạt thủy tinh vô trùng để dàn đều dịch cấy. Các đĩa này được ủ ở nhiệt độ phòng 2 - 3 ngày, quan sát và tách từng loại khuẩn lạc nấm mốc sang môi trường PDA, tiếp tục ủ từ 3 - 5 ngày. Các chủng mốc sau khi phát triển sẽ để giữ giống tạm thời ở 12°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.3. Phương pháp định danh nấm mốc bằng hình thái

Quan sát hình thái khuẩn lạc 3 - 7 ngày tuổi, đối với các loài phát triển chậm cần thời gian lâu hơn, ghi nhận các đặc điểm: đường kính, màu sắc khuẩn lạc, dạng khuẩn lạc, giọt tiết, sắc tố tiết ra môi trường và các đặc điểm riêng khác.

Để ghi nhận cấu trúc vi thể, khi khuẩn lạc có màu (có bào tử) đường kính đạt 0,5 - 1cm, dùng dao mổ vô trùng cắt một bên khuẩn lạc theo hình chữ nhật kích thước 3 - 4 x 1,5 - 2cm, ủ 2 - 3 ngày và quan sát dưới kính hiển vi. Các chủng nấm mốc cũng được làm tiêu bản với thuốc nhuộm blue-coton lactophenol quan sát cấu trúc sinh sản của nấm mốc dưới kính hiển vi. Các chủng nấm mốc được quan sát cấu trúc vi thể ở vật kính 40x, 100x và được định danh dựa vào khóa phân loại của tác giả Mien (2015).

2.4. Khảo sát khả năng phân giải cellulose của nấm mốc

Cấy 1 điểm trên đĩa môi trường Czapek-Dox bổ sung 1% carboxyl methyl cellulose (Cz + 1%CMC), ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 ngày, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Sau đó, nhỏ thuốc thử lugol lên bề mặt thạch để xác định khả năng phân giải cellulose của các chủng theo công thức D - d trong đó, D là đường kính vòng phân giải và d là đường kính khuẩn lạc.

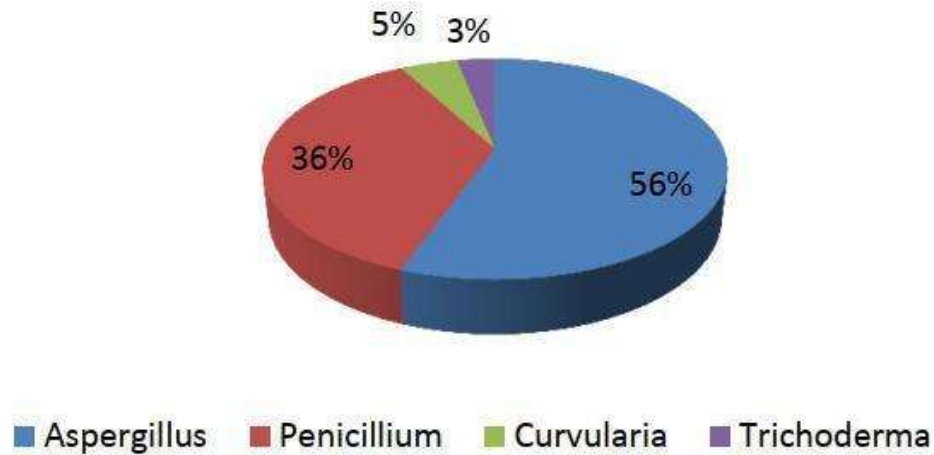
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả phân lập các chủng nấm mốc từ đất rừng

Từ 6 mẫu đất được thu tại rừng Mã Đà (Đồng Nai) ký hiệu MD1, MD2, MD3, MD4, MD5, MD6, nghiên cứu đã phân lập được 220 chủng nấm mốc. Số lượng chủng nấm mốc phân lập được của từng mẫu tương ứng là 31, 54, 37, 37, 26, 35.

3.2. Kết quả định danh các chủng nấm mốc bằng đặc điểm hình thái

Từ 220 chủng đã phân lập tiến hành định danh 63 chủng có sự hình thành bào tử, dựa theo khóa phân loại của tác giả Mien (2015). Kết quả định danh đến nhóm đối với chi *Aspergillus* và chi *Penicillium*, các chủng nấm còn lại được định danh đến chi bao gồm *Curvularia* và *Trichoderma*.



Hình 1. Cấu trúc thành phần các chủng thuộc chi nấm mốc *Aspergillus*, *Penicillium*, *Curvularia* và *Trichoderma*

Bảng 1

Số lượng chủng nấm mốc phân lập được trong từng mẫu đất

STT	Mẫu Nhóm	MD1	MD2	MD3	MD4	MD5	MD6	TỔNG
1	<i>Aspergillus flavus</i>	11	1	1	4	0	2	19
2	<i>Aspergillus niger</i>	1	1	5	3	2	4	16
3	<i>Curvularia</i> sp.	0	0	0	0	0	3	3
4	<i>Penicillium lilacinum</i>	5	3	0	0	0	1	9
5	<i>Penicillium</i> sp1.	2	0	0	1	0	0	3
6	<i>Penicillium</i> sp2.	1	0	0	0	0	0	1
7	<i>Penicillium</i> sp3.	0	0	3	0	0	0	3
8	<i>Penicillium</i> sp4.	0	0	0	1	1	0	2
9	<i>Penicillium</i> sp5.	0	0	0	0	0	1	1
10	<i>Penicillium</i> sp6.	0	0	1	0	2	0	3
11	<i>Penicillium</i> sp7.	0	0	1	0	0	0	1
12	<i>Trichoderma</i> sp.	0	0	2	0	0	0	2

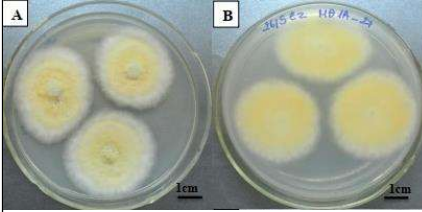
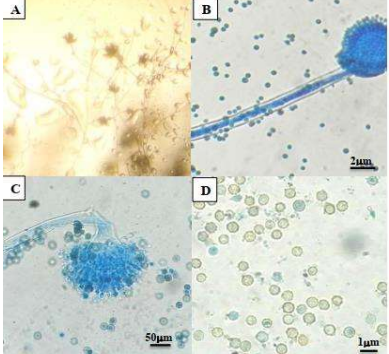
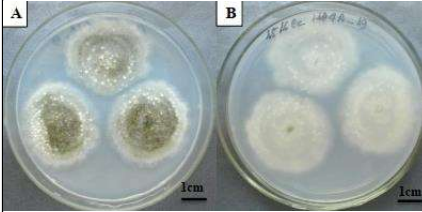
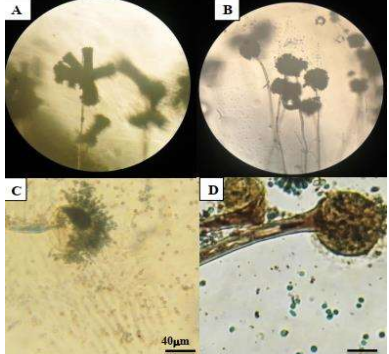
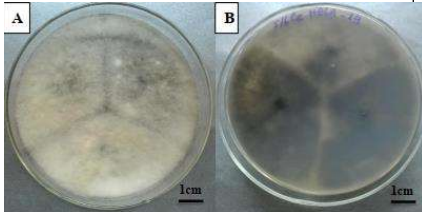
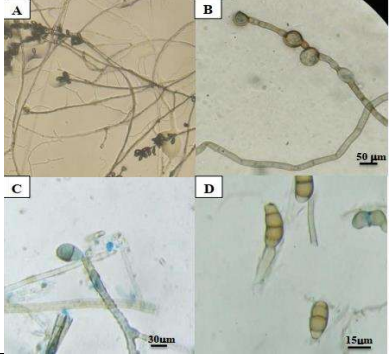
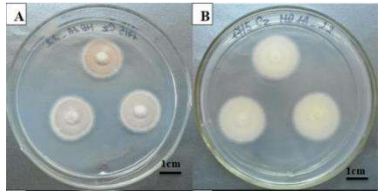
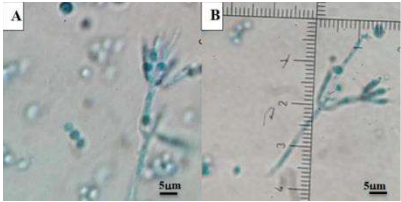
Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

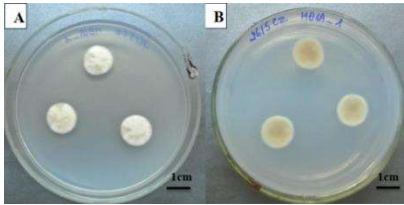
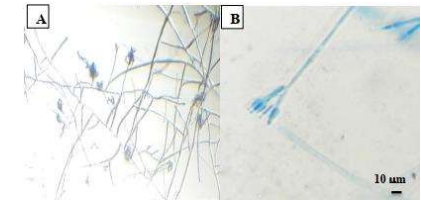
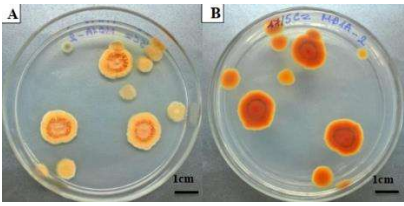
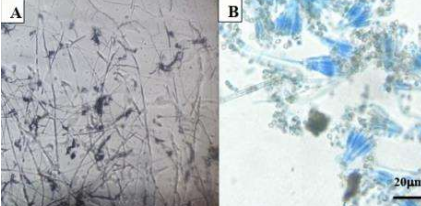
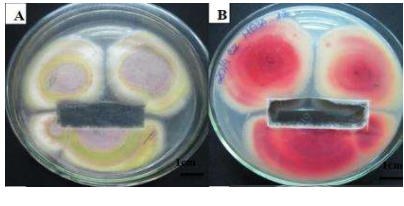
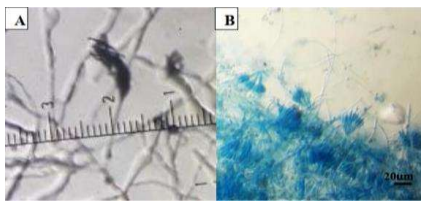
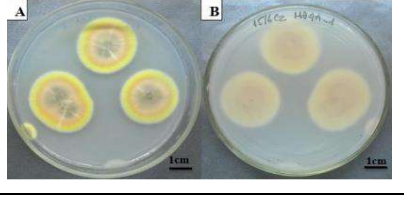
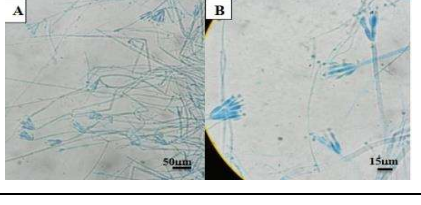
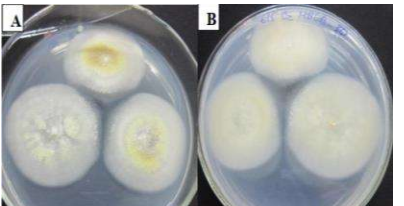
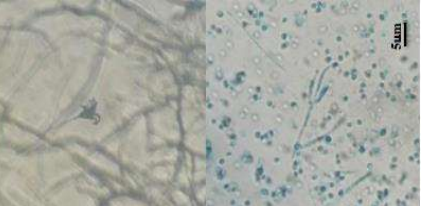
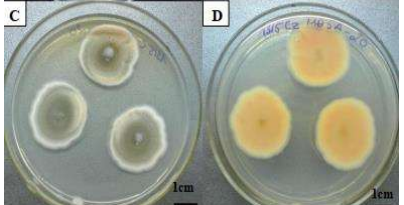
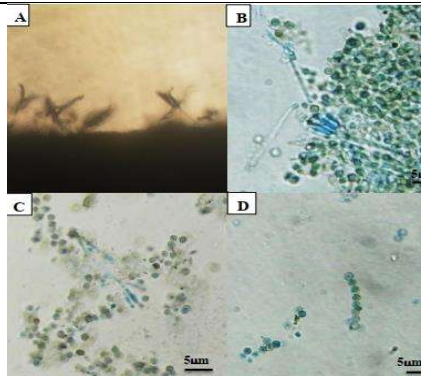
Qua kết quả định danh cho thấy chi *Aspergillus* (56%) và *Penicillium* (36%) chiếm ưu thế so với các chi khác (Hình 1). Tuy nhiên, chi *Penicillium* (gồm 8 nhóm) có thành phần loại đa dạng hơn chi *Aspergillus* (chỉ có 2 nhóm là *A. flavus* và *A. niger*). Đồng thời, các mẫu đất

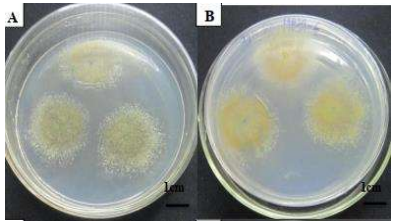
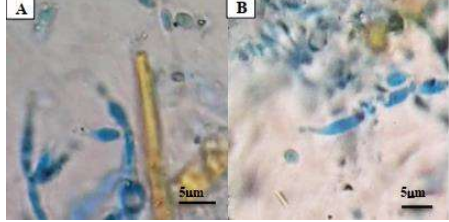
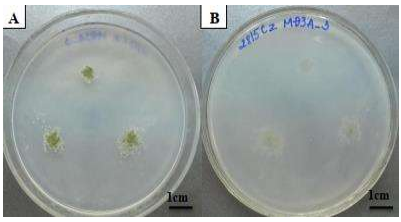
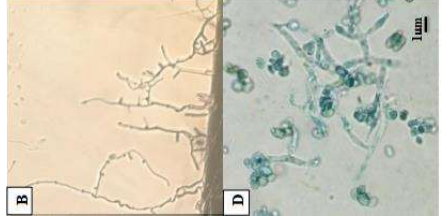
khác nhau thì số lượng và thành phần loài nấm cũng khác nhau. Chi *Aspergillus* có mặt ở tất cả các mẫu đất, nhưng các chi còn lại chỉ có ở một hoặc hai mẫu đất (Bảng 1). Điều này cho thấy có sự khác biệt về thành phần loài nấm ở các địa điểm khác nhau.

Bảng 2

Hình thái đại thể và vi thể của các chủng nấm mốc đã được định danh

STT	Nhóm	Khuẩn lạc (A: mặt trên, B: mặt dưới)	Vi thể
1	<i>Aspergillus flavus</i>		
2	<i>Aspergillus niger</i>		
3	<i>Curvularia</i> sp.		
4	<i>Penicillium lilacinum</i>		

STT	Nhóm	Khuẩn lạc (A: mặt trên, B: mặt dưới)	Vi thể
5	<i>Penicillium</i> <i>sp.1</i>		
6	<i>Penicillium</i> <i>sp.2</i>		
7	<i>Penicillium</i> <i>sp.3</i>		
8	<i>Penicillium</i> <i>sp.4</i>		
9	<i>Penicillium</i> <i>sp.5</i>		
10	<i>Penicillium</i> <i>sp.6</i>		

STT	Nhóm	Khuẩn lạc (A: mặt trên, B: mặt dưới)	Vi thể
11	<i>Penicillium sp.7</i>		
12	<i>Trichoderma sp.</i>		

Vi thể: A. Mẫu tạo theo phương pháp cắt thạch (x100), B. Cấu trúc chồi (x400), C, D. Cấu trúc mang conidi (x1000)

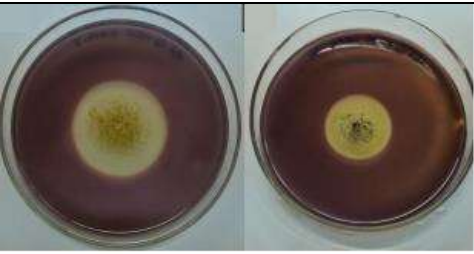
Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

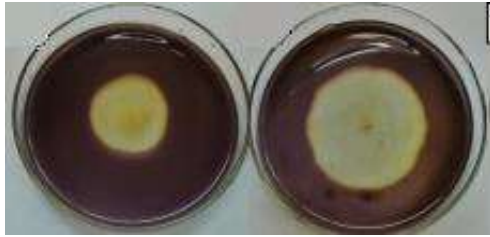

3.3. Kết quả hoạt tính phân giải cellulose của các chủng nấm mốc

Chọn ngẫu nhiên 5 chủng trong nhóm *A. flavus*, 9 chủng trong nhóm *A. niger*, 3 chủng trong nhóm *Curvularia* và 2 chủng trong nhóm *Trichoderma* khảo sát khả năng phân giải cellulose. Sau 5 ngày nuôi cho kết quả 19 chủng này tuy không tạo được vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc nhưng đều phát triển được trên môi trường khảo sát sử dụng cơ chất là CMC. Như vậy, các chủng này đều có khả năng phân giải cellulose nhưng hoạt tính không cao (Bảng 3).

Bảng 3

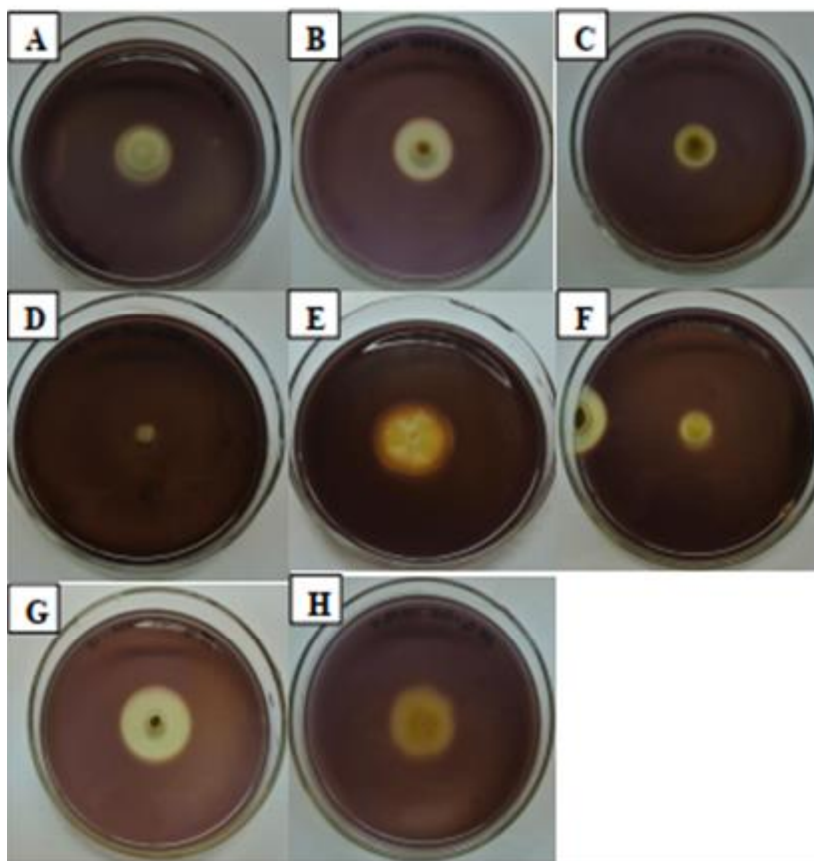
Khả năng phân giải của các chủng nấm mốc không tạo vòng phân giải sau 5 ngày nuôi

STT	Tên chi	Khả năng phân giải
1	<i>Aspergillus</i>	 <i>A.flavus</i> MĐ1A 8 <i>A.niger</i> MĐ4A 36

STT	Tên chi	Khả năng phân giải
2	<i>Curvularia</i>	 <p>MD6A_14 MD6A_15</p>
3	<i>Trichoderma</i>	 <p>MD3A_3 MD3A_22</p>

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Đối với chi *Penicillium* nghiên cứu được thực hiện tương tự đối với 14 chủng trong đó có 5 chủng nhóm *P. lilacinum*, 1 chủng trong *Penicilium* sp.1, 1 chủng *Penicillium* sp.2, 1 chủng *Penicillium* sp.3, 2 chủng *Penicillium* sp.4, 1 chủng *Penicillium* sp.5, 2 chủng *Penicillium* sp.6 và 1 chủng *Penicillium* sp.7. Kết quả khảo sát cho thấy tất cả các chủng thuộc chi *Penicillium* khảo sát đều phân giải được cellulose do chúng đều mọc được trên môi trường cơ chất CMC, nhưng các chủng khác nhau có khả năng phân giải cũng khác nhau. Cụ thể là các chủng *P. lilacinum*, *Penicilium* sp.3, *Penicilium* sp.4, và *Penicilium* sp7 không tạo được vòng phân giải quanh khuẩn lạc. Các chủng có vòng phân giải quanh khuẩn lạc là *Penicillium* sp.1 (D-d = 1,4cm), *Penicillium* sp.2 (D-d = 0,9cm), *Penicillium* sp.5 (D-d = 0,6cm), *Penicillium* sp.6 (D-d = 2cm) (Hình 2).



Hình 2. Khả năng phân giải cellulose của các chủng *Penicillium* sau 5 ngày nuôi

A. <i>P. lilacinum</i>	B. <i>Penicillium</i> sp.1	C. <i>Penicillium</i> sp.2
D. <i>Penicillium</i> sp.3	E. <i>Penicillium</i> sp.4	F. <i>Penicillium</i> sp.5
G. <i>Penicillium</i> sp.6	H. <i>Penicillium</i> sp.7	

4. Kết luận

Từ 6 mẫu đất thu tại các nơi khác nhau của rừng Mã Đà (Đồng Nai), nghiên cứu đã phân lập và giữ giống 220 chủng, định danh được 19 chủng thuộc nhóm *Aspergillus niger*, 3 chủng thuộc *Curvularia* sp., 9 chủng thuộc *Penicillium lilacinum*, 2 chủng thuộc *Penicillium* sp.1, 3 chủng thuộc *Penicillium* sp.2, 3 chủng thuộc *Penicillium* sp.3, 2 chủng thuộc *Penicillium* sp.4, 1 chủng thuộc *Penicillium* sp.5, 3 chủng thuộc *Penicillium* sp.6, 3 chủng thuộc *Penicillium* sp.7 và 2 chủng thuộc *Trichoderma* sp. Tất cả các chủng nấm mốc này đều có khả năng phân giải cellulose, trong đó một số chủng thuộc chi *Penicillium* có vòng phân giải cellulose rõ. Điều này chứng minh cho hệ nấm mốc tại rừng Mã Đà có khả năng hoàn trả carbon về cho chu trình tự nhiên, góp phần ổn định hệ sinh thái. Đồng thời các chủng *Penicillium* sp.1, *Penicillium* sp.2, *Penicillium* sp.5 và *Penicillium* sp.6 có hoạt tính phân giải cellulose cao, là những chủng tiềm năng cho việc thu nhận và sàng lọc chọn chủng để ứng dụng vào trong sản xuất.

Tài liệu tham khảo

- Ardhiani, K. H., Nungki, A. P., & Endang, S. S. (2013). *Role of bacteria and mold as agent plant litter composting*. Paper presented at the 3rd International Conference on Chemical, Biological and Environment Sciences (ICCEBS'2013), Kuala Lumpur, Malaysia.
- Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18, 355-383.
- Binder, J. B., & Raines, R. T. (2009). Simple chemical transformation of Lignocellulosic biomass into furans for fuels and chemicals. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 1979-1985.
- Dale, B. E. (1999). Biobased industrial products: Bioprocess engineering when cost really counts. *Biotechnology Progress*, 15, 775-776.
- De Boer, W., Folman, L. B., Summerbell, R. C., & Boddy, L. (2005). Living in a fungal world: Impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology*, 29(4), 795-811.
- García, O., Torres, A. L., Colom, J. F., Pastor, F. I. J., Diaz, P., & Vidal, T. (2002). Effect of cellulase-assisted refining on the properties of dried and never-dried eucalyptus pulp. *Cellulose*, 9, 115-125.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 506-577.
- Lynd, L. R., Wyman, C. E., & Gemgross, T. U. (1999). Biochemical engineering. *Biotechnology Progress* 15, 777-793.
- Mien, D. V. H. (2015). *Hệ nấm mốc ở Việt Nam, phân loại, tác hại, độc tố, cách phòng chống [Mold system in Vietnam, classification, harm, toxin, prevention]*. Hanoi, Vietnam: Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- Philippidis, G. P. (1994). Enzymatic conversion of biomass for fuel production. In M. E. Himmel, J. O. Baker, & R. P. Overend (Eds.), *Cellulase production technology* (pp. 188-217).
- Quynh, N. X., Nam, N. X., Duc, T. A., & Diep, N. A. (2010). *Nghiên cứu ảnh hưởng của chất độc da cam/Dioxin lên quá trình diễn thế các hệ sinh thái và sự biến đổi cấu trúc gen, protein của một số loài sinh vật tại khu vực Mã Đà [Study on the effects of Agent Orange / Dioxin on the process of generation of ecosystems and modification of genetic structure, proteins of some species of organisms in Ma Da area]*. Retrieved May 12, 2018, from <https://123doc.net/document/1317422-nghien-cuu-anh-huong-cua-chat-doc-da-cam-dioxin-len-qua-trinh-dien-the-cac-he-sinh-thai-va-su-bien-doi-cau-truc-gen-protein-cua-mot-so-loai-sinh-vat-t.htm>
- Shields, J. A., Paul, E. A., Lowe, W. E., & Parkinson, D. (1973). Turnover of microbial tissue in soil under field conditions. *Soil Biology & Biochemistry*, 5(6), 31-37.
- Sri Laksmi, A., & Narasimha, G. (2012). Production of cellulases by fungal cultures isolated from forest litter. *Annals of Forest Research*, 55, 85-92.

- Stork, G., Pereira, H., Wood, T. M., Du"sterho"ft, E. M., Toft, A., & Puls, J. (1995). Upgrading recycled pulps using enzymatic treatment. *TAPPI Journal*, 78, 79-88.
- Sunna, A., Moracci, M., Rossi, M., & Antranikian, G. (1997). Glycosyl hydrolases from hyperthermophiles. *Extremophiles*, 1, 2-13.
- Tandel, M. B., Kukadia, M. U., Kolambe, B. N., & Jadeja, D. B. (2009). Influence of tree cover on physical properties of soil. *Indian Forester*, 135(3), 420-424.
- Vieille, C., & Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 1-43.