

Abstract of thesis presented to the Senate of Universiti Malaysia Terengganu in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy

**MULTIPLATFORM METABOLOMICS STUDY ON THE RESPONSE
MECHANISM TO CADMIUM TOXICITY BY MANGROVE FUNGUS**

Trichoderma atroviride

SITI ATHIRAH BINTI MOHAMAD JAMALI

AUGUST 2024

Main Supervisor : Associate Professor Mariam Taib, Ph.D.
Co-supervisor : Professor Syarul Nataqain Baharum, Ph.D.
**Faculty/Institute : Institute of Climate Adaptation and Marine
Biotechnology**

Cadmium (Cd) is one of the most harmful heavy metal pollutants. To remediate these pollutants, mangrove fungi are suggested to be more efficient as bioremediation agents. Many *Trichoderma* sp. have been studied, however, there is no report on the bioremediation potential of a *Trichoderma* sp. isolated from the mangroves of the east coast of Malaysia. A Cd-tolerant *Trichoderma atroviride* was previously isolated from the mangroves of Terengganu and hence, it is crucial to explore its response mechanism towards Cd stress that may facilitate the development of a new bioremediation agent. Thus, the aims of this study were to profile the metabolites and identify the potential biomarkers in response to Cd toxicity by *T. atroviride* leading to elucidating the biosynthetic pathways involved. Prior to the metabolomics analysis, the optimum growth and tolerance of *T. atroviride* upon exposure to Cd were determined. *T. atroviride* that grew optimally on Potato Dextrose Agar at 30 °C could tolerate the highest Cd concentration of 3.0 mM. The optimum tolerance was found at 0.75 mM Cd at day 10 and declined towards day 14. The effect of two silylated and one alkylated derivatization agents in Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) analysis for both day 10 and day 14 intracellular and extracellular methanolic extracts was investigated. More metabolites were detected by all derivatization agents combined, with silylation agents detecting a wider range of metabolite groups. For the metabolite profiling of Cd-treated *T. atroviride*, a combination of GC-MS, Nuclear Magnetic Resonance (¹H NMR), and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) was used and a total of 127 metabolites were identified for day 10 samples. Moreover, a total of 39 potential biomarkers were identified, with taurine, glutamine, and citrate showing the highest potentials, which can be validated further via transcriptomic or biochemical approach. KEGG analysis used to study integrated pathways in response to Cd toxicity demonstrated 11 impacted metabolic pathways in *T. atroviride*, including seven amino acid metabolisms. It is proposed that Cd toxicity

induced amino acid, organic acid and lipid metabolisms, and antioxidative response in *T. atroviride*. In conclusion, the multiplatform metabolomics approach managed to identify the potential biomarkers and pathways involved which can be used to further elucidate the Cd-tolerance mechanism by *T. atroviride*, enhancing its potential as a good bioremediation agent

Abstrak tesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti Malaysia Terengganu sebagai memenuhi keperluan untuk Ijazah Doktor Falsafah

**KAJIAN METABOLOMIK BERBILANG PLATFORM KE ATAS
MEKANISMA TINDAK BALAS TERHADAP TOKSISITI KADMIUM OLEH
KULAT PAYA BAKAU *Trichoderma atroviride***

SITI ATHIRAH BINTI MOHAMAD JAMALI

OGOS 2024

Penyelia : Profesor Madya Mariam Taib, Ph.D.
Penyelia Bersama : Profesor Syarul Nataqain Baharum, Ph.D.
**Fakulti/Institut : Institut Penyesuaian Iklim dan Bioteknologi
Marin**

Kadmium (Cd) telah dikenalpasti sebagai salah satu logam berat pencemar yang paling berbahaya. Untuk memulihkan pencemar ini, kulat bakau dicadangkan sebagai ejen bioremediasi yang lebih berkesan. Banyak *Trichoderma* sp. telah dikaji sebagai ejen bioremediasi yang berpotensi, namun tiada laporan mengenai potensi *Trichoderma* sp. yang dipencilkan dari kawasan bakau pantai timur Malaysia. Satu kulat toleran Cd *Trichoderma atroviride* telah dipencilkan sebelum ini dari paya bakau Terengganu, maka, adalah penting untuk meneroka mekanisme tindak balasnya terhadap tekanan Cd yang boleh membantu dalam pembangunan ejen bioremediasi yang baharu. Oleh itu, tujuan kajian ini adalah untuk memprofilkan metabolit dan mengenalpasti penanda-bio yang berpotensi dalam tindak balas toksisiti Cd oleh *T. atroviride*, dan seterusnya menjelaskan tapak jalan biosintesis yang terlibat. Sebelum analisis metabolomik, pertumbuhan dan toleransi optimum *T. atroviride* selepas didedahkan kepada Cd telah ditentukan. *T. atroviride* yang tumbuh secara optimal di atas Agar Potato Dekstrosa pada 30 °C didapati mampu toleran kepada Cd pada kepekatan tertinggi iaitu 3.0 mM. Toleransi optimum ditemui pada kepekatan 0.75 mM Cd pada hari ke-10, dengan penurunan ke arah hari ke-14. Kesan dua ejen derivatisasi silisasi dan satu ejen metilasi dalam analisis Kromatografi Gas-Spektrometri Jisim (GC-MS) telah dikaji untuk ekstrak metanol intraselular dan ekstraselular pada hari ke-10 dan ke-14. Lebih banyak metabolit dikesan menggunakan kombinasi ketiga-tiga ejen

derivatisasi, dengan ejen sililasi berjaya mengesan kumpulan metabolit yang lebih pelbagai. Untuk kajian pemprofilan metabolit untuk *T. atroviride* yang dirawat dengan Cd, kombinasi GC-MS, Resonans Magnetik Nuklear (NMR), dan Kromatografi Cecair-Spektrometri Jisim (LC-MS) digunakan dan sejumlah 127 metabolit berjaya dikenalpasti untuk sampel dirawat dengan Cd hari ke-10. Tambahan lagi, sejumlah 39 penanda-bio dikenal pasti dengan taurin, glutamin, dan sitrat menunjukkan potensi paling tinggi yang boleh divalidasi peranan mereka lebih lanjut melalui pendekatan transkriptomik atau biokimia. Analisis KEGG yang digunakan dalam kajian integrasi tapak jalan sebagai tindak balas *T. atroviride* terhadap toksisiti Cd menunjukkan 11 laluan metabolik terimpak, termasuk tujuh laluan metabolik asid amino. Dicadangkan bahawa toksisiti Cd merangsang metabolisme asid amino, asid organik dan lipid, serta tindakbalas antioksidan dalam *T. atroviride*. Kesimpulannya, pendekatan metabolomik berbilang platform ini dapat mengenal pasti penanda-bio berpotensi dan tapak jalan yang terlibat yang boleh digunakan untuk menerangkan mekanisme toleransi oleh *T. atroviride* terhadap Cd, meningkatkan potensinya sebagai sebagai ejen bioremediasi yang baik.