

XÁC ĐỊNH SỰ ĐA DẠNG CỦA CÁC LOÀI NẤM MỐC TRÊN ỒNG NHÒM QUÂN SỰ

NGUYỄN THU HOÀI ⁽¹⁾, CHU THANH BÌNH ⁽¹⁾, NGÔ CAO CƯỜNG ⁽¹⁾,
ĐỖ THỊ THU HỒNG ⁽¹⁾, ĐỖ TẤT THỊNH ⁽¹⁾, VŨ QUỐC HẢI ⁽²⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Khí hậu nhiệt đới nóng ẩm và mưa nhiều của nước ta là điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của nấm mốc, từ đó gây ảnh hưởng đến công tác duy trì và bảo dưỡng vũ khí, trang bị quân sự. Ống nhòm quân sự là một trong những trang bị phục vụ huấn luyện sẵn sàng chiến đấu của quân đội có khả năng bị nhiễm nấm trong quá trình sử dụng và bảo quản. Sự phá hủy và gây nhiễm của các chủng nấm mốc phụ thuộc vào đặc tính sinh học của các loài nấm khác nhau xuất hiện trên các chi tiết, linh kiện của ống nhòm mà chủ yếu trên bề mặt kính quang học. Sự sinh trưởng của nấm mốc trên bề mặt kính làm giảm độ truyền qua và tăng độ phân tán ánh sáng, từ đó hạn chế khả năng nhìn và phát hiện mục tiêu.

Việc phân loại các loài nấm bằng hình thái, cấu trúc sinh bào tử được nhiều tác giả thực hiện, tuy nhiên phương pháp truyền thống không thể định tên được các loài không có cấu trúc sinh bào tử ở hầu hết các loài nấm thuộc ngành nấm đảm Basidiomycota. Bên cạnh đó, phương pháp sinh học phân tử PCR (Polymerase Chain Reaction) có thể sử dụng để khuếch đại các phân đoạn điển hình của DNA với ưu điểm có kết quả nhanh, chính xác về các loài nấm. Các đoạn rDNA thường được lựa chọn đọc trình tự nucleotide là: 5S rDNA, 5,8S rDNA, 18S rDNA, 26S rDNA và ITS. Trong đó vùng ITS (internal transcribed spacer) được giải trình tự rộng rãi nhất trong giới nấm. ITS là vùng tiêu biểu trở thành đối tượng được quan tâm đối với nghiên cứu tiến hóa, phát sinh loài (Mitchell et al., 1995), trong đó cặp môi ITS1F/ITS4 được sử dụng để khuếch đại (Gardes & Bruns, 1993; White et al., 1990). Những nghiên cứu này đã cung cấp nền tảng cho việc xác định nhanh và chính xác sự đa dạng của các chủng nấm.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

- Thu thập 15 mẫu ống nhòm bị nhiễm nấm ở cấp độ 5 tại một số kho bảo quản của Cục Quân khí ở Hòa Bình, Nghệ An và Biên Hòa để phân lập các chi nấm.

- Sử dụng các chủng nấm phân lập trên mẫu kính bị nhiễm cho định danh các loài nấm dựa trên trình tự tương đồng với cặp môi ITS1F/ITS4.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp lấy mẫu, phân lập: Các mẫu kính được xác định vùng bị nhiễm nấm, dùng tăm bông sạch đã khử trùng quét lên bề mặt kính bị nhiễm nấm (thấu kính, thị kính, lăng kính) và ria cấy trên các đĩa thạch chứa môi trường thích hợp cho nấm sinh trưởng. Nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, trong thời gian 48 ÷ 72 giờ. Sau đó các chủng nấm được tách riêng rẽ thuần khiết trên môi trường đặc trưng cho nấm.

Phương pháp quan sát hình thái và cấu trúc sinh bào tử nấm: Chủng nấm thuần khiết được quan sát màu sắc khuẩn ty và hình thái cấu trúc cơ quan sinh bào tử (Katsuhiko Ando, 2003).

Phương pháp tách DNA, PCR và điện di: Tách DNA của các chủng nấm phân lập bằng Kit (Fungi/Yeast DNA Extraction, Norgen/Canada); trình tự ITS rDNA (~ 570 bp) được khuếch đại PCR sử dụng cặp mồi ITS1F (5' - CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (Gardes & Bruns, 1993) và ITS4 (5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). Chu trình PCR được chạy với chế độ nhiệt: 95°C/2 phút, 35 chu kỳ của 95°C/30 giây, 55°C/30 giây và 72°C/1 phút; 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel 1% agarose, đệm TAE, 110 V, 15 phút. Gel điện di được nhuộm với ethidium bromide (5 mg/ml) trên máy soi gel Nyxtechnix/Mỹ.

Giải trình tự và xử lý số liệu: Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng Kit (Bioneer, Hàn Quốc) và giải trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3100 - *Avant Genetic Analyzer* tại công ty 1st BASE (Singapore). Kết quả giải trình tự gen được kiểm tra bằng phần mềm phân tích BioEdit (ver.6.0.7, Mỹ), so sánh với trình tự ITS các loài đã được xác định trong ngân hàng gene (GenBank) bằng chương trình BLAST trên NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Định danh của các loài nấm thu được đã tham chiếu với hệ thống phân loại nấm (Hibbett et al., 2007).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập nấm mốc trên ống nhôm bị hỏng tại khu vực miền Bắc, miền Trung và miền Nam

Các kho bảo quản ở Hòa Bình, Nghệ An, Biên Hòa là các địa điểm được khảo sát và lựa chọn mẫu ống nhôm có những dấu hiệu hư hỏng do nấm gây nên (mẫu ở cấp độ 5). Các địa điểm được khảo sát này có điều kiện khí hậu nhiệt đới nóng ẩm khác nhau đặc trưng cho 3 miền Bắc, miền Trung, miền Nam. Tiến hành quan sát và thu 5 mẫu có dấu hiệu hỏng do nấm phá hủy với từng địa điểm khảo sát. Đã phân lập được 61 chủng nấm từ 15 mẫu tại 3 kho bảo quản (bảng 1).

Bảng 1. Số lượng chủng nấm phân lập từ kính quang học nhiễm nấm cấp độ 5

Địa điểm lấy mẫu	Loại ống nhôm, nơi sản xuất	Số chủng xuất hiện	Ghi chú
HÒA BÌNH	MB1_ON 8x30 (Hungari)	5	Tổng 22 chủng
	MB2_NVA 7x40 (Đức)	4	
	MB3_B41 (Đức)	5	
	MB4_ON 7x50 (Đức)	4	
	MB5_ON 6x30 (Liên Xô)	4	
NGHỆ AN	MT1_ON 15x50 (Liên Xô)	6	Tổng 23 chủng
	MT2_ON 7x50 (Triều Tiên)	4	

	MT3_ ON 6x30 (Liên Xô)	4	
	MT4_ ON 6x30 (Hungari)	5	
	MT5_ ON 6x30 (Tiệp Khắc)	4	
BIÊN HÒA	MN1_ ON D6 (Đức)	2	Tổng 16 chủng
	MN2_ ON 6x30 (Z133/VN)	3	
	MN3_ ON 6x30 (Z133/VN)	5	
	MN4_ ON 6x30 (Liên Xô)	3	
	MN5_ ON 6x30 (Liên Xô)	3	

Dựa trên hình thái, màu sắc của khuẩn lạc nấm, đã xác định các chủng nấm xuất hiện trong từng mẫu kính riêng biệt với số lượng khác nhau, trong đó Hòa Bình - 22 chủng, Nghệ An - 23 chủng, Biên Hòa - 16 chủng. Số lượng chủng nấm tại các kho lấy mẫu ở miền Nam thấp hơn so với số lượng nấm của hai địa điểm miền Bắc và miền Trung trên hầu hết các kính có nguồn gốc sản xuất trong nước và ngoài nước. Để làm rõ sự khác biệt về số lượng cũng như thành phần các loài nấm xuất hiện trên kính nhiễm tại ba địa điểm lấy mẫu, đã phân loại bằng hình thái nhằm xác định các chi nấm đã được thực hiện.

3.2. Đa dạng các chi nấm của 3 địa điểm thu mẫu

Sau khi các chủng nấm đã được phân lập và thuần khiết, hình dạng cấu trúc sinh bào tử, bào tử được so sánh trên kính hiển vi có độ phóng đại 40× (Katsuhiko Ando, 2003) để xác định thành phần chi, kết quả thu được ở bảng 2.

Bảng 2. Đa dạng thành phần chi nấm phân lập trên mẫu kính nhiễm

Địa điểm lấy mẫu	Số mẫu nghiên cứu	Đa dạng chi nấm		
		Ký hiệu chi	Số lượng chủng	Tần suất xuất hiện* (%)
Hòa Bình	5	<i>Culvularia</i> sp.	2	9,09
		<i>Paecilomyces</i> sp.	2	9,09
		<i>Aspergillus</i> sp.	8	36,36
		<i>Penicillium</i> sp.	6	27,27
		Chưa xác định	4	18,19
Nghệ An	5	<i>Culvularia</i> sp.	2	8,70
		<i>Aspergillus</i> sp.	9	39,10
		<i>Penicillium</i> sp.	1	4,35

Biên Hòa	5	<i>Trichodesma</i> sp.	1	4,35
		<i>Chaetomium</i> sp.	1	4,35
		Chưa xác định	9	39,10
	5	<i>Culvularia</i> sp.	2	12,50
		<i>Aspergillus</i> sp.	2	12,50
		<i>Cladosporium</i> sp.	1	6,25
		<i>Trichodesma</i> sp	1	6,25
		<i>Fusarium</i> sp.	2	12,50
		Chưa xác định	8	50,00

Chú thích ()*: Dựa trên số lượng chi nấm phân lập trong các mẫu kính khác nhau, tính trên tổng số chi nấm thu được tại cùng địa điểm nghiên cứu.

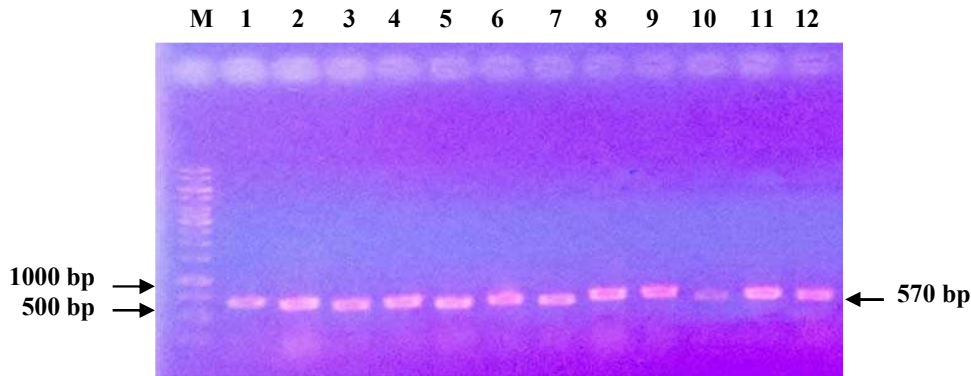
Các chủng nấm ở cả 3 địa điểm nghiên cứu được xác định bằng hình thái cho kết quả gồm hầu hết các chi nấm thuộc ngành Ascomycota như: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Culvularia*, *Paecilomyces*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Fusarium*. Đã xác định được thành phần các chi nấm bằng hình thái cấu trúc sinh bào tử cho 81,8% số chi nấm (Hòa Bình), 60,9% (Nghệ An) và 50% (Biên Hòa) (bảng 2).

Tuy nhiên một số chủng nấm chưa xác định được bằng hình thái cấu trúc sinh bào tử do các chủng phát triển chủ yếu là thể sợi, điều này rất khó khăn trong việc xác định tên chi cho các chủng nấm. Kết quả bảng 2 cho thấy số lượng các chi nấm trên kính nhiễm chưa được xác định bằng hình thái chiếm đa số trên tổng số chủng nấm đã phân lập ở hai địa điểm Biên Hòa (chiếm 50%) và Nghệ An (chiếm 39,1%). Điều này có thể bước đầu khẳng định được các chi nấm phân lập được trên kính nhiễm tại hai địa điểm này có sự đa dạng đáng kể. Tại địa điểm Hòa Bình với số lượng chi nấm đã định tên bằng hình thái và cấu trúc có thể thấy chúng đa số thuộc nhóm nấm túi, có khả năng hình thành bào tử để có thể nhận biết sơ bộ các chi bằng hình thái cấu trúc sinh bào tử.

3.3. Giải trình tự ITS rDNA của các chủng nấm đã phân lập

Để xác định tên cho các chủng nấm đến loài, ngoài việc sử dụng hình thái của các chủng nấm trên một trong những kỹ thuật được sử dụng ngày càng phổ biến để xác định thành phần loài nấm là giải trình tự đoạn 18S rDNA, vùng ITS rDNA (White et al., 1990; Mitchell et al., 1995; Liễu Như Ý và Trần Nhân Dũng, 2012). Dựa vào trình tự ITS, đặc trưng trên các loài nấm làm cơ sở cho việc xác định thành phần loài của các chi nấm, đã phân lập trên kính quang học tại 3 địa điểm nghiên cứu.

Sử dụng Kit tách DNA của hãng Norgen/Canada, DNA được tách từ các chủng nấm và khuếch đại trình tự ITS rDNA, sử dụng cặp mồi ITS1F & ITS4 (White et al., 1990). Sản phẩm PCR đã kiểm tra trên gel agarose, có so sánh với thang chuẩn DNA (hình 1).



Hình 1. Sản phẩm PCR khuếch đại ITS rDNA chủng nấm bằng cặp mồi ITS1F & ITS4; M - Thang chuẩn DNA

Kết quả trên hình 1 cho thấy sản phẩm PCR được khuếch đại từ DNA các chủng nấm đã có cùng một băng với kích thước tương ứng ~ 570 bp. Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự.

Sử dụng phần mềm Blast Search để so sánh với các trình tự ITS rDNA sẵn có trên ngân hàng dữ liệu Genbank, các chủng nấm đã được phân loại đến loài với trình tự tương đồng trên 99%.

3.4. Đa dạng thành phần loài nấm nhiễm trên kính bằng phân tích trình tự ITS rDNA

So sánh trình tự ITS rDNA của các chủng nấm đã phân lập trên kính quang học với các loài nấm đã định danh trên ngân hàng GenBank có mức độ tương đồng trên 99%, tiến hành định tên các loài nấm và thành phần đa dạng của các loài nấm của cả 3 địa điểm lấy mẫu được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Đa dạng loài nấm mốc phân lập trên mẫu kính nhiễm ở ba địa điểm

TT	Mẫu kính	Kết quả so sánh trên Blast	Ngành
HÒA BÌNH (07 chi, 13 loài)			
1	HB1	<i>Penicillium brevissimum</i> _B01	Ascomycota
2	HB4, HB5	<i>Penicillium ramusculum</i> _B15	
3	HB4	<i>Penicillium brevissimum</i> _B08	
4	HB3, HB5	<i>Penicillium oxalium</i> _B07	
5	HB2	<i>Paecilomyces variotii</i> _B04	
6	HB1	<i>Paecilomyces variotii</i> _B02	
7	HB1, HB3	<i>Aspergillus tritici</i> _B13	
8	HB1, HB4	<i>Aspergillus sydowii</i> _B16	
9	HB1, HB3	<i>Aspergillus sydowii</i> _B09	
10	HB5	<i>Aspergillus niger</i> _B10	
11	HB3	<i>Aspergillus flavus</i> _B03	

12	HB2	<i>Curvularia veruculosa</i> _B05	Basidiomycota
13	HB3	<i>Curvularia lunata</i> _B14	
14	HB2	<i>Phomopsis</i> sp._B06	
15	HB2	<i>Coprinellus radians</i> _B19	
16	HB4, HB5	<i>Perenniporia tephropora</i> _B18	
NGHỆ AN (12 chi, 16 loài)			
1	NA2, NA3	<i>Aspergillus flavus</i> _T04	Ascomycota
2	NA1, NA4	<i>Aspergillus sclerotium</i> _T10	
3	NA4, NA5	<i>Aspergillus versicolor</i> _T08	
4	NA2, NA4	<i>Aspergillus niger</i> _T02	
5	NA1	<i>Aspergillus versicolor</i> _T18	
6	NA4	<i>Penicillium citrinum</i> _T12	
7	NA1	<i>Curvularia</i> sp._T01	
8	NA3	<i>Curvularia clavata</i> _T05	
9	NA5	<i>Hypoxylon monticulosum</i> _T22	
10	NA3	<i>Nigrospora</i> sp._T06	
11	NA5	<i>Trichodesma harzianum</i> _T14	
12	NA1	<i>Chaetomium globusum</i> _T15	
13	NA5	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> _T13	
14	NA4	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> _T11	
15	NA3	<i>Coprinellus radians</i> _T17	Basidiomycota
16	NA2	<i>Coprinellus disseminatus</i> _T19	
17	NA1	<i>Lentinus squarrosulus</i> _T20	
18	NA1	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> _T16	
19	NA2	<i>Schyzophyllum commune</i> _T03	
BIÊN HÒA (10 chi, 10 loài)			
1	BH1, BH2	<i>Aspergillus fumigatus</i> _N02	Ascomycota
2	BH3, BH4	<i>Curvularia lunata</i> _N05	
3	BH3	<i>Periconia byssoides</i> _N06	
4	BH3, BH4	<i>Humicola grisea</i> _N11	
5	BH1, BH5	<i>Fusarium roliferatum</i> _N15	
6	BH4	<i>Trichodesma harzianum</i> _N12	
7	BH4	<i>Acremonium</i> sp._N10	
8	BH3, BH5	<i>Leptosphaerulina chartarum</i> _N08	
9	BH2	<i>Cladosporium cladosporioides</i> _N04	
10	BH1, BH5	<i>Agaricomycetes</i> sp. N14	Basidiomycota

Tại 3 địa điểm Hòa Bình, Nghệ An, Biên Hòa các mẫu nấm mốc nhiễm trên ống nhòm cho thấy sự đa dạng đáng kể của thành phần các loài nấm. 61 chủng nấm phân lập được đều thuộc hai ngành nấm túi (Ascomycota) và ngành nấm đảm (Basidiomycota). Đặc điểm của hai ngành nấm này đều có hệ sợi nấm phát triển, điều này cho thấy mức độ nguy hiểm của chúng khi xuất hiện trên kính quang học làm hạn chế sự truyền qua của ánh sáng.

Số lượng nấm nhiễm trên kính thu mẫu ở Nghệ An đa dạng hơn cả với 16 loài thuộc 12 chi; tiếp đó là ở Biên Hòa xuất hiện 10 loài thuộc 10 chi, Hòa Bình có 13 loài thuộc 7 chi. Kết quả ở bảng 3 cho thấy sự đa dạng về số lượng và chủng loài của các chi nấm thu được ở Nghệ An (khu vực miền Trung), điều này chứng tỏ với đặc điểm của bào tử hoặc hệ sợi nấm gây nhiễm trên bề mặt kính có khả năng tồn tại bền vững trên bề mặt vật liệu trong những điều kiện khắc nghiệt (khí hậu khô, nóng) và gây ảnh hưởng trực tiếp đến việc quan sát mục tiêu. Bên cạnh đó, với khu vực miền Bắc (Hòa Bình) có khí hậu đặc trưng của 4 mùa khí hậu trong năm, số lượng lớn các chủng nấm đều thuộc ngành nấm túi có hệ sợi nấm phát triển cùng với sự hình thành bào tử. Với đặc điểm này các bào tử khá bền vững và sẽ nảy mầm khi có điều kiện thuận lợi (độ ẩm, dinh dưỡng, nhiệt độ).

4. KẾT LUẬN

- Đã thu được 61 chủng nấm xuất hiện trên 15 mẫu kính nhiễm nấm mốc tại các kho Cục Quân khí ở Hòa Bình, Nghệ An, Biên Hòa.

- Bằng phân tích giải trình tự ITS rDNA (sử dụng cặp mồi ITS1F, ITS4) và so sánh với các trình tự tương đồng trên ngân hàng Genbank, đã xác định được thành phần loài nấm phá hủy trên ống nhòm quân sự tại 3 kho bảo quản thuộc hai ngành nấm túi (Ascomycota) và ngành nấm đảm (Basidiomycota). Trong đó, tại Nghệ An thu được 23 chủng nấm gồm 16 loài thuộc 12 chi; Biên Hòa phân lập được 16 chủng gồm 10 loài, 10 chi; Hòa Bình xuất hiện 22 chủng gồm 13 loài, 07 chi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Liễu Như Ý, Trần Nhân Dũng, *Đa dạng di truyền một số loài nấm ăn dựa trên trình tự ITS (internal transcribed spacer)*, Tạp chí Khoa học, 2012, **22**:18-25.
2. Gardes M., Bruns T., *ITS primer with enhanced specificity for basidiomycetes- application to the identification of mycorrhizae and rusts*, Molecular Ecology, 1993, **2**:113-118.
3. Hibbett et al., *A higher - level phylogenetic classification of the Fungi*, Mycological research, 2007, **111**:509-547.
4. Katsuhiko Ando, *Workshop on taxonomy and identification of fungi*, 2003.
5. Mitchell J.I., Robert P.J., Moss S.T., *Sequence or structure: a short review on the application of nucleic acid sequence information to fungal taxonomy*, Mycologist, 1995, **9**:67-75.

6. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J., *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*, In: PCR protocols: a guide to methods and applications. (Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., eds), Academic Press, San Diego, USA, 1990, p.315-322.

SUMMARY

IDENTIFYING THE DIVERSITY OF DIFFERENT FUNGI SPECIES ON MILITARY BINOCULARS

In this study, sixty one fungi strains were isolated from fifteen fungi-contaminated binoculars samples in 3 storages in Hoa Binh, Nghe An and Bien Hoa. DNA of the strains was isolated and ITS rDNA region (~ 570 bp) was amplified by ITS1F/ITS4 primer pairs. The diversity of the fungus of the 3 places was found by comparing ITS rDNA sequences similar to the species on Genbank database. On contaminated binoculars in Nghe An we found 23 strains belonging to 16 species and 12 genus; In Bien Hoa and Hoa Binh 16 strains belonging to 10 species and 10 genus and 22 strains belonging to 13 species and 7 genus were identified.

Từ khóa: ITS rDNA regions, classification, fungi, trình tự chuỗi ITS rDNA, phân loại, nấm.

Nhận bài ngày 22 tháng 7 năm 2015

Hoàn thiện ngày 21 tháng 9 năm 2015

⁽¹⁾ *Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga*

⁽²⁾ *Cục Quân khí, Tổng cục Kỹ thuật*