PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH MỘT SỐ CHỦNG NẤM SỢI TRÊN KHÍ TÀI QUANG TẠI BẮC GIANG - VIỆT NAM

NGÔ CAO CƯỜNG [(1)], ĐỖ TẤT THỊNH [(1)], CHU THANH BÌNH [(1)],
PHÍ QUYẾT TIẾN [(2)], NGUYỄN VĂN ĐỨC [(3)]

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Khí hậu nhiệt đới nóng ẩm, mưa nhiều ở Việt Nam tạo điều kiện thuận lợi cho nấm sợi phát triển từ đó gây ảnh hưởng đến chất lượng và công tác duy trì bảo dưỡng vũ khí, trang bị quân sự - quốc phòng. Sợi nấm phát triển trên chi tiết kính gây nên hiện tượng mờ mốc làm thay đổi đặc tính kỹ thuật thiết bị ảnh hưởng đến tính năng kỹ chiến thuật của khí tài. Nghiên cứu định danh nấm có trên các thiết bị quang học là rất cần thiết cho quá trình nghiên cứu đa dạng, phát hiện nguồn gốc thâm nhập của nấm, từ đó đưa ra các biện pháp duy trì và bảo dưỡng khí tài. Có nhiều phương pháp định danh, trong đó định danh nấm sợi bằng hình thái, cấu trúc sinh bào tử [1, 5], tuy nhiên phương pháp này đòi hỏi phải có thiết bị kính hiển vi có độ phóng đại đủ lớn và chuyên gia phân loại có kinh nghiệm. Bên cạnh đó, phương pháp định danh bằng so sánh các đoạn gen tương đồng trên GenBank đang được tiến hành ngày càng phổ biến do cho kết quả nhanh. Các đoạn rDNA thường được lựa chọn so sánh: 5S rDNA; 5,8S rDNA; 18S rDNA; 28S rDNA và ITS. Vùng ITS (internal transcribed spacer) dùng để so sánh và phân loại mức độ loài ở nấm men [3] và hầu hết các nấm sợi phổ biến như *Trichoderma* [8], *Penicillium* [4], *Aspergillus* [9]… Để phân loại đến loài chi *Aspergillus,* 5 đoạn gen: beta tubulin (BT2), calmodulin (CF), ITS và LUS rDNA (ID) và RNA polymerase II (RPB2) đã được sử dụng [7], trong đó đoạn gen ITS được sử dụng khá phổ biến. Đoạn gen này có kích thước khoảng 600bp cho phép phân loại nhanh giữa các loại nấm ở các chi khác nhau một cách chính xác, tuy nhiên các loài thuộc cùng một chi có quan hệ gần gũi thì cho kết quả phân loại chưa được cao. Vì vậy, việc phân loại bằng ITS cần được kết hợp với phân loại bằng hình thái để có kết quả chính xác. Trong bài báo này nhóm tác giả trình bày một số kết quả nghiên cứu về hình thái của một số chủng nấm được phân lập từ khí tài quang, phân loại bằng phương pháp hình thái, sau đó sử dụng đoạn gen ITS1-5,8S-ITS4 định danh lại để đối chiếu.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và môi trường

05 mẫu khí tài quang bị nhiễm nấm tại một đơn vị ở Lục Ngạn - Bắc Giang đưa về sửa chữa tại Z133 được thu thập để phân lập nấm sợi.

Các chủng nấm thuộc chi *Aspergillus* phân lập trên mẫu kính sau phân loại bằng phương pháp hình thái sử dụng làm đối tượng để định danh lại bằng phương pháp sinh học phân tử, đoạn trình tự gen ITS1-5,8S-ITS4 được phân lập so sánh.

Môi trường nuôi cấy:

Czapek (gam/lít): Saccharose-30; $NaNO_3$-3; K_2HPO_4-1; $MgSO_4$-0,5; KCl-0,5; $FeSO_4$-0,1; Agar-20; nước-1000; pH-6,0.

PDA (gam/lít): khoai tây-200; glucose-20; Agar-20; nước-1000.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

05 mẫu kính quang học nhiễm nấm được thu thập trong tháng 8/2016, đựng trong túi vô trùng đưa về phòng thí nghiệm và bảo quản ở 4^{o}C. Phân lập nấm sợi bằng cách sử dụng tăm bông sạch đã vô trùng quết lên bề mặt kính bị nhiễm nấm và cấy trên môi trường PDA, giữ ở nhiệt độ 30^{o}C, trong tối. Sau 48÷72 giờ nuôi cấy, các khuẩn lạc được quan sát, chọn lọc với đặc trưng hình thái khác nhau và cấy chuyển trên môi trường Czapek [2, 5].

Để nghiên cứu đặc điểm hình thái khuẩn lạc và cuống sinh bào tử, các chủng nấm sợi sau khi được thuần khiết, cấy truyền sang các môi trường Czapek, PDA. Nấm được nuôi cấy trong tủ ấm 28÷30°C, sau 7 ngày lấy ra quan sát đặc điểm khuẩn lạc và mô tả về hình thái, màu sắc [5].

Các chủng nấm sợi sau khi được được phân loại bằng cách quan sát hình thái khuẩn lạc và cuống sinh bào tử được sử dụng để ly trích DNA tổng số, khuếch đại trình tự vùng ITS theo các bước: tách DNA tổng số của nấm bằng kít Fungi/Yeast DNA Extraction (Norgen, Canada). Trình tự ITS1 - 5,8S - ITS2 được nhân lên 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'). 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 [6, 10]. Sản phẩm PCR được tinh sạch, giải trình tự trên máy đọc trình tự động *ABIRISM®3100-Avant Genetic Analyzer* tại công ty 1st BASE (Singapore). Các trình tự gen được xử lý bằng phần mềm BioEdit (ver. 6.0.7, Mỹ) và so sánh với các trình tự tương ứng của các chủng nấm trên GenBank bằng công cụ BLAST trên NCBI.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập các chủng nấm trên chi tiết kính của khí tài quang

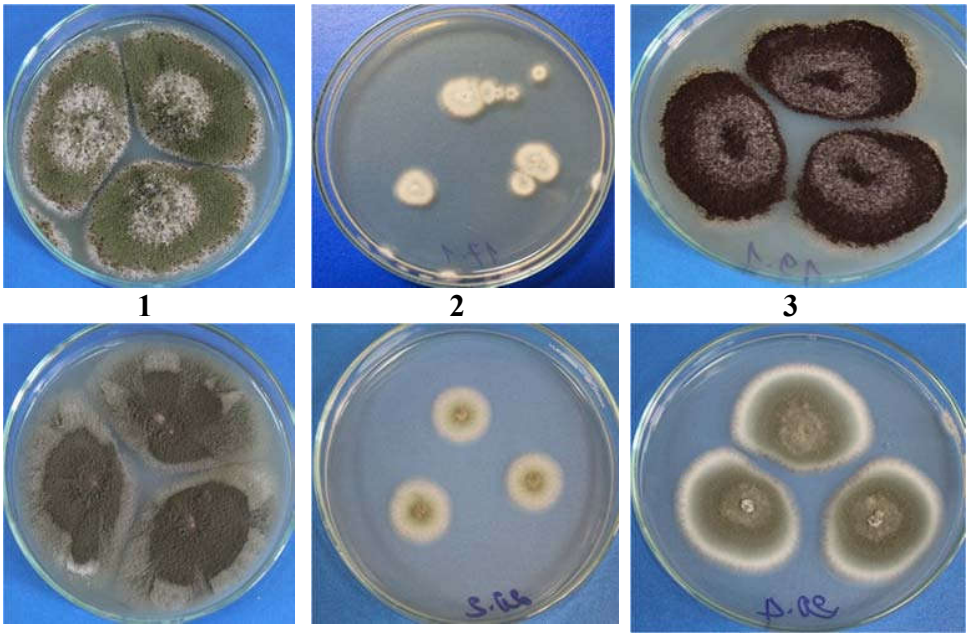
Từ 05 mẫu khí tài quang nhiễm nấm, 13 chủng nấm đã được phân lập và làm sạch trên các môi trường tương ứng PDA và Czapek (bảng 1).

Bảng 1. Số lượng chủng nấm phân lập từ các mẫu kính quang học nhiễm nấm

Ký hiệu loại thiết bị quan sát	Số chủng xuất hiện
BG1_ K76_191124_TQ	2
BG2_ K76_193040_TQ	2
BG3_ K76_19113_TQ	3
BG4_ K76_19134_TQ	4
BG5_ K76_1915_TQ	2

Kết quả ở bảng 1 cho thấy số lượng chủng nấm trên mỗi mẫu khí tài quang có từ 2 đến 4 chủng. Để làm rõ sự khác biệt về số lượng cũng như thành phần các loài nấm xuất hiện trên kính nghiên cứu đặc điểm hình thái các chủng nấm sợi đã được tiến hành.

3.2. Đặc điểm hình thái của một số chủng nấm đại diện



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc các chủng nấm sợi phân lập trên khí tài quang (1-chủng 13.1; 2-chủng 17.1; 3-chủng 19.1; 4-chủng 20.1; 5-chủng 20.2; 6-chủng 20.4)

Các chủng nấm được phân lập từ các mẫu kính quang học nhiễm nấm khá phong phú về màu sắc khuẩn lạc như trắng, xanh, xám, nâu, vàng. Hình dạng khuẩn lạc thường có hình tròn hoặc hình dạng không xác định có viền hoặc không với các sợi nấm bông, xốp, dẹt hoặc tạo thành một số tia đối xứng qua tâm. Dựa vào màu sắc, đặc điểm bề mặt khuẩn lạc, cuống sinh bào tử, 13 chủng nấm được xếp vào 2 nhóm sau khi đối chiếu với khóa phân loại [5] (bảng 2). Trong đó, chi *Penicillium* chiếm 7/13 chủng, chi *Aspergillus* chiếm 6/13 chủng.

Bảng 2. Mô tả hình thái khuẩn lạc của các chủng nấm sợi phân lập được

TT	Ký hiệu chủng	Đặc điểm sinh học	Chi phân loại
1	BG5; BG3 (20.1)	Khuẩn lạc trên môi trường Czapek có đường kính 4,0÷4,5cm/7 ngày ở nhiệt độ phòng 24÷26^{o}C, màu lục, lục xanh, mặt dạng nhung, với các lớp bào tử trần bết thành đám. Mặt trái khuẩn lạc màu vàng, vàng da cam. Giọt tiết không màu	*Penicillium* spp.
	BG4; BG5 (20.2)	Khuẩn lạc trên môi trường Czapek mọc chậm, đường kính 2,0÷2,5 cm/10 ngày ở nhiệt phòng, có màu lục xanh, lục. Mặt dạng nhung đến xốp nhẹ, mặt trái có màu vàng đến da cam tối, môi trường xung quanh có màu vàng chanh. Giọt tiết thường nhiều, tạo thành giọt, kích thước thay đổi	
	BG2; BG3; BG4 (20.4)	Khuẩn lạc trên môi trường Czapek phát triển khá nhanh, 4,5÷5,0 cm/ 10 ngày ở nhiệt độ 24÷26^{o}C. Mặt khuẩn lạc dạng nhung có các khía hình tia, thỉnh thoảng phân vùng nhẹ, mép mỏng, màu trắng. Khuẩn lạc màu lục vàng đến lục lơ, lục vàng xám. Giọt tiết thường được sinh ra có màu vàng nhạt đến vàng chanh. Mặt trái có màu vàng sáng đến nâu oliu	
2	BG1; BG2 (13.1)	Khuẩn lạc trên môi trường Czapek phát triển nhanh, đường kính 5÷6 cm /10 ngày ở nhiệt độ phòng, mặt bằng phẳng hoặc xốp nhẹ, màu vàng sau chuyển màu lục vàng, lục khi già	*Aspergillus* spp.
	BG1; BG4 (17.2)	Khuẩn lạc trên môi trường Czapek phát triển 4,5÷5,0 cm/7 ngày ở nhiệt độ phòng 24÷26^{o}C. Mặt khuẩn lạc dạng nhung đến xốp bông với các đầu sinh bào tử hình tia, màu nâu oliu nhạt đến nâu oliu, hoặc màu nâu đen; hệ sợi nấm màu trắng đến vàng đậm; giọt tiết không màu đến nâu sáng; mặt trái không màu đến vàng xạm	
	BG3; BG4 (19.1)	Khuẩn lạc trên môi trường Czapek phát triển nhanh, đường kính 5,0÷6,0 cm/10 ngày ở 25^{o}C; gồm hệ sợi nền màu trắng, phân vùng dị thường, cấu trúc đầu sinh bào tử trần mầu nâu tía hoặc nâu đen; mặt trái lúc đầu không màu, sau có màu nâu đen; không có giọt tiết	

3.3. Phân loại ba chủng nấm sợi thuộc chi *Aspergillus*

Đặc điểm cuống sinh bào tử của các chủng nấm sợi được thể hiện hình 2:

a **b** **c**

Hình 2. Cấu trúc cuống sinh bào tử của 03 chủng nấm thuộc chi *Aspergillus*

(a - chủng 13.1; b - chủng 17.2; c - chủng 19.1)

Chủng 13.1: Giá bào tử trần thành dày, không màu, ráp; bọng hình elongate khi non, sau gần cầu đến cầu, từ 10÷65µm đường kính nhưng hầu hết là từ 25÷45µm; thể bình 1 hoặc 2 tầng nhưng hiếm khi 2 cấu trúc này có cùng trên một đầu; cuống thể bình 6,0÷10µm x 4,0÷5,0µm nhưng có thể lên đến 16µm dài, thể bình 6,5÷10µm x 3,0÷5,0µm. Bào tử trần gần cầu đến cầu, gai ráp 3,0÷6,0µm nhưng hầu hết 3,5 đến 4,5µm, thỉnh thoảng elíp khi mới tạo thành 4,5÷5,5µm x 3,5÷4,5µm. Từ các mô tả trên chủng 13.1 được định danh là *Aspergillus flavus*.

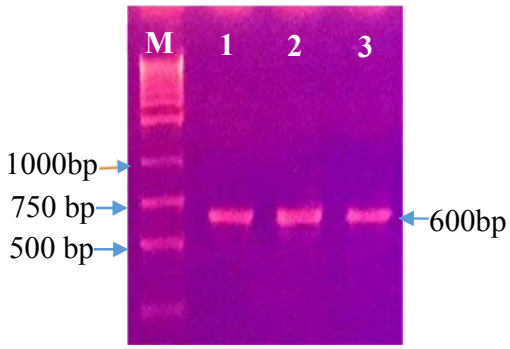
Chủng 17.2: Cuống 150÷1550µm x 5,0÷20µm, không màu đến nâu vàng đậm, thành dày, nhẵn; bọng hình gần cầu đến cầu, 13,0÷72,0µm rộng. Thể bình 2 tầng, cuống thể bình bao phủ 1/2 đến toàn bộ bề mặt bọng, 0÷3 vách ngang, 4,0÷60,0µm x 3,5÷15µm; thể bình 4,8÷17,0µm x 2,4÷6,5µm. Bào tử gần cầu đến cầu, 2,8÷5,6µm, gai ráp hoặc có rãnh dị thường. Chủng 17.2 được định danh là *Aspergillus niger*.

Chủng 19.1: Cuống sinh bào tử nhẵn, kích thước thay đổi, thường 1,0÷2,0mm x 9÷20 µm với thành dày 2,0÷2,5µm; bọng hình cầu hoặc gần cầu, 25÷80 µm đường kính. Thể bình 1 tầng, KT 6,5÷10,0µm x 3,0÷4,5µm. Bào tử hình gần cầu, cầu, gai, kích thước 3,5÷5,0 µm x 4,0÷5,0µm. Từ đó chủng 19.1 được định danh là *Aspergillus aculeatus*.

Để kiểm chứng kết quả phân loại bằng hình thái đến loài, trình tự vùng ITS của ba chủng nấm đã được phân lập, giải trình tự và so sánh đối chiếu lại.

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

Gen ITS1-5,8S-ITS2 của các chủng nấm được khuếch đại nhờ cặp mồi đặc hiệu ITS1F và ITS4 có kích thước khoảng 600 bp, trình từ đoạn gen ITS1-5,8S-ITS2 của các chủng 13.1; 17.2 và 18.1 được thể hiện ở hình 3.



Hình 3. Sản phẩm PCR khuếch đại ITS rDNA chủng nấm bằng cặp mồi ITS1F và ITS4; M - Thang chuẩn DNA; 1 - chủng 13.1 độ dài 604bp; 2 - chủng 17.2 độ dài 583bp; 3 chủng - 19.1 độ dài 577bp

Hình 3 cho thấy sản phẩm PCR khuếch đại từ DNA tổng số các chủng nấm có cùng một băng với kích thước tương ứng ~ 600 bp, sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự.

Trình tự một phần đoạn ITS1-5,8S-ITS2 của 3 chủng nấm có kích thước 604 bp, 583bp, 577bp, tương đồng 99% với trình tự tương ứng của các loài có mối quan hệ gần gũi (bảng 3).

Bảng 3. So sánh trình tự đoạn ITS của một số chủng nấm đại diện với trình tự tương ứng trên GenBank

Ký hiệu	Các loài nấm gần gũi được so sánh	Mã số truy cập trên GenBank	Độ tương đồng (%) cao nhất
13.1	*Aspergillus flavus*	JQ975004.1	99
	Aspergillus oryzae	HQ285542.1	99
	Aspergillus sydowii	LT745389.1	99
	Aspergillus parvisclerotigenus	KC964101.1	99
	Aspergillus nomius	KJ486842.1	99
17.2	*Aspergillus tubingensis*	JQ316525.1	99
	Aspergillus niger	KF881765.1	99
9.1	*Aspergillus aculeatus*	KM979737.1	99
	Aspergillus brunneoviolaceus	NR138279.1	99
	Aspergillus fijiensis	KU729079.1	99
	Aspergillus violaceofuscus	FR733805.1	99
	Aspergillus uvarum	NR135330.1	99

Khi so sánh trình tự các chủng nấm với cơ sở giữ liệu trên GenBank cho ta biết được mức độ tương đồng với các gen của các loài nấm. Tuy nhiên kết quả so sánh lại cho ta một số loài có độ tương đồng bằng nhau. Kết quả Blast và so sánh ba chủng nấm sợi 13.1; 17.2 và 19.1 được thể hiện ở bảng 3.

Kết quả so sánh với các trình tự nucleotide tương ứng trên cơ sở dữ liệu GenBank cho thấy chủng 13.1 gần gũi nhất với loài *Aspergillus flavus (*99%*)*; chủng 19.1 gần gũi nhất với loài *Aspergillus aculeatus* (99%). Riêng chủng 17.2 có độ tương đồng với hai loài *Aspergillus niger* và *Aspergillus tubingensis* cùng với độ tương đồng (99%). Kết quả phân loại bằng phương pháp sử dụng trình tự đoạn gen ITS cho kết quả khá tương đồng với phân loại dựa trên các đặc điểm sinh học bao gồm hình thái và màu sắc khuẩn lạc, cấu tạo chuỗi bào tử, hình dáng bào tử. Tuy nhiên đối với các loài cùng chi có họ hàng gần gũi thì phân loại đến loài bằng cách sử dụng trình tự đoạn gen ITS cần có sự kết hợp với kết quả phân loại dựa trên các đặc điểm hình thái. Với sự phân tích trên thì sau khi kết hợp hai kết quả phân loại bằng hình thái và so sánh trình tự đoạn gen ITS có thể kết luận chủng 17.2 là thuộc loài *Aspergillus niger.*

4. KẾT LUẬN

- Đã phân lập được 13 lượt chủng nấm từ 5 mẫu kính nhiễm nấm tại một đơn vị quân đội đóng trên địa bàn Lục Ngạn - Bắc Giang. Dựa trên các đặc điểm về thái có thể xếp 13 chủng nấm trên thuộc hai chi là *Aspergillus* và *Penicillium*.

- Kết hợp hai phương pháp định danh bao gồm: quan sát hình thái và dựa trên trình tự nucleotide của gen ITS1-5,8S-ITS2 đã xác định được chủng 13.1 thuộc loài *Aspergillus flavus;* chủng 19.1 thuộc loài *Aspergillus aculeatus* và chủng 17.2 thuộc loài *Aspergillus niger.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đặng Vũ Hồng Miên, *Hệ nấm mốc ở Việt Nam - Phân loại, tác hại, độc tố, cách phòng chống,* Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 2015, tr.313-448.
2. 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 Trường Đại học Cần Thơ, 2012, tr.18-25.
3. Guého E., Improvisi L., Christen R., de Hoog G. S., *Phylogenetic relationships of Cryptococcus neoformans and some related basidiomycetous yeasts determined from partial large subunit rRNA sequences,* Antonie van Leeuwenhoek, 1993, **63**:175-189.
4. Houbraken J.A.M.P., Frisvad J.C., Samson R.A, *Taxonomy of Penicillium citrinum and related species,* Fungal Diversity, 2010, **44**:117-133.
5. Katsuhiko Ando, *Workshop on taxonomy and identification of fungi,* 2003.
6. 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.

7. Peterson S.W., *Phylogenetic analysis of Aspergillus species using DNA sequences from four loci,* Mycologia*,* 1998*,* **100**:205-26.

8. Siddiquee S., Guan F.AT.S., Aziz E.R., *Phylogenetic relationships of Trichoderma harzianum based on the sequence analysis of the internal transcribed spacer region -1 of the rDNA,* Journal of Applied Sciences Research, 2007, **3**(9):896 -903.

9. Varga J., Due M., Frisvad J.C., Samson R.A, *Taxonomic revision of Aspergillus section Clavati based on molecular, morphological and physiological data,* Study Mycology, 2007, **59**:89-106.

10. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J., *Amplication 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

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF SOME FUNGAL SPECIES ON MILITARY OPTICAL EQUIPMENT IN BAC GIANG - VIETNAM

The 13 fungi were isolated from five optical equipments collected in Bac Giang province, Viet Nam. These fungi were classified as Aspergillus and Penicillium. Based on classification by morphology and sequence of ITS1 - 5,8S - ITS2 regions, three fungi were identified including 13.1 - Aspergillus flavus; 19.1 - Aspergillus aculeatus and 17.2 - Aspergillus niger.

Keywords: Optical equipment, classification, ITS rDNA, Aspergillus.

Nhận bài ngày 06 tháng 9 năm 2017

Hoàn thiện ngày 9 tháng10 năm 2017

(1) Phân viện Công nghệ sinh học, Trung tâm nhiệt đới Việt - Nga

(2) Viện Công nghệ Sinh học

(3) Tổng cục Kỹ thuật