

Phân lập và định danh nấm mốc từ một số nguồn đất và không khí nhằm xây dựng bộ tiêu bản mẫu phục vụ giảng dạy

Lê Quang Hạnh Thụ

Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành
lqhthu@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Nhằm mục đích xây dựng bộ tiêu bản nấm mốc phục vụ giảng dạy tại khoa Dược - trường Đại học Nguyễn Tất Thành, nhóm nghiên cứu tiến hành phân lập và định danh nấm mốc từ một số nguồn đất và không khí. Đất được thu thập ở một số công viên trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh; không khí được thu thập tại một số phòng thí nghiệm khoa Dược. Kết quả phân lập được 139 mẫu vi nấm gồm 103 mẫu từ đất và 36 mẫu từ không khí. Dựa vào đặc điểm hình thái, 101 mẫu vi nấm được định danh đến tên chi, thuộc 14 chi gồm *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Fusarium*, *Phoma*, *Paecilomyces*, *Bipolaris*, *Curvularia*, *Nigrospora*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium* và *Corynespora*.

© 2019 Journal of Science and Technology - NTTU

Nhận 29.07.2019
Được duyệt 27.10.2019
Công bố 25.12.2019

Từ khóa
nấm mốc, *Penicillium*,
tiêu bản

1 Đặt vấn đề

Hiện nay, việc thu thập tiêu bản nấm mốc phục vụ công tác giảng dạy phụ thuộc chủ yếu vào nguồn mẫu từ các cơ sở nghiên cứu giảng dạy và công ty thương mại. Tuy nhiên, nguồn mẫu không ổn định về số lượng và chất lượng, đồng thời chi phí thu mua cao. Do đó, để ổn định nguồn tiêu bản và chủ động trong công tác giảng dạy tại bộ môn, việc xây dựng bộ tiêu bản mẫu và bộ chủng vi nấm là cần thiết, đồng thời đây là cơ sở để mở rộng các nghiên cứu về vi nấm.

Trong điều kiện khí hậu nóng ẩm tại Việt Nam, sự phân bố nấm mốc trong ngoại cảnh với số lượng đáng kể và phân bố loài phong phú, là điều kiện thuận lợi đối với việc thu thập mẫu. Đối tượng chủ yếu dự kiến thu thập của đề tài là các chi loài phổ biến trong không khí và đất như *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium* ... nhằm phục vụ tốt chương trình giảng dạy cho sinh viên đại học ngành Dược.

2 Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Nấm mốc được thu thập từ các nguồn sau:

- Không khí tại một số phòng thí nghiệm khoa Dược – Đại học Nguyễn Tất Thành tại cơ sở 300A Nguyễn Tất Thành, P.13, Quận4, Tp.HCM
- Đất tại một số công viên trên địa bàn Tp.HCM gồm:
 - + Công viên Tao Đàn, 55C Nguyễn Thị Minh Khai, P. Bến Thành, Quận 1;
 - + Công viên Gia Định, đường Hoàng Minh Giám, P.9, Quận Phú Nhuận;

+ Công viên Hoàng Văn Thụ, đường Hoàng Văn Thụ, P.2, Quận Tân Bình.

Loại đất được chọn là đất trồng cây cỏ thụ ở công viên, nơi có bóng râm mát.

Bảng 1 Kí hiệu mẫu vi nấm được phân lập

Vị trí lấy Nơi lấy	1	2	3	4	5
TD	TD1-n	TD2-n	TD3-n	TD4-n	TD5-n
GD	GD1-n	GD2-n	GD3-n	GD4-n	GD5-n
HVT	HVT1-n	HVT2-n	HVT3-n	HVT4-n	HVT5-n
402	402-n				
403	403-n				
406	406-n				

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phương pháp thu và xử lí mẫu từ đất

Đất được lấy ở độ sâu 05 – 10cm bằng dụng cụ sạch và đặt trong petri vô trùng. Đất được rây qua lưới kích thước lỗ 01mm để loại bỏ đá sỏi. Mẫu được xử lí ngay hoặc được bảo quản ở 4⁰C không quá 48 giờ.

Pha loãng mẫu đất với dung dịch NaCl 0,9% để có độ pha loãng từ 10-1 đến 10-5. Hút 0,1ml dung dịch ở mỗi độ pha loãng, cho lên mặt thạch PDA chứa chloramphenicol 0,1% để ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn. Dùng que tam giác vô trùng trải dịch đều khắp mặt thạch. Các đĩa thạch đã trải mẫu đất được ủ ở nhiệt độ phòng và theo dõi sự phát triển của vi nấm trong 03 – 07 ngày[1].

2.2.2 Phương pháp thu và xử lí mẫu từ không khí

Sử dụng đĩa thạch PDA chứa chloramphenicol 0,1% để lấy mẫu nấm không khí. Tại phòng thí nghiệm, đặt các đĩa thạch ở trung tâm và 4 góc phòng, sau đó mở nắp đĩa trong thời gian 15 – 30 phút. Các đĩa thạch phải được đặt ở độ cao khoảng 1m so với mặt sàn, nơi đặt cần được lau sạch bằng ethanol 70%. Sau thời gian thu thập mẫu, đóng nắp đĩa thạch, ủ ở nhiệt độ phòng và theo dõi sự phát triển của vi nấm trong 03 – 07 ngày [1,2,4].

2.2.3 Phân lập và tinh sạch vi nấm

Thu sợi khuẩn ti từ các đĩa thạch đã ủ mẫu và cấy chuyển sang các môi trường chứa chất dinh dưỡng thích hợp. Thực hiện cấy chuyển vi nấm nhiều lần để tinh sạch mẫu. Tùy theo tốc độ phát triển của vi nấm, tiến hành ủ mẫu ở nhiệt độ phòng và theo dõi sự phát triển của vi nấm trong khoảng 01 – 02 tuần hoặc lâu hơn. Kiểm tra độ tinh sạch của mẫu bằng cách quan sát sự phát triển đồng nhất của khóm nấm và đặc điểm hiển vi. Đánh giá tốc độ phát triển của vi nấm trên các loại môi trường khác nhau để sơ bộ xác định môi trường nuôi cấy thích hợp.

2.2.4 Định danh vi nấm sợi

Tên khoa học của vi nấm được xác định đến chi. Vi nấm sợi được tiến hành định danh dựa trên hình thái khóm nấm và đặc điểm hiển vi. Dựa vào các khóa phân loại như Atlas of clinical fungi của nhóm nghiên cứu G.S.de Hoog [3] và các tài liệu tương tự để định danh chủng nấm phân lập được.

2.2.5 Xây dựng tiêu bản và lưu chủng

- Xây dựng tiêu bản: Thực hiện nhuộm vi nấm được xé sợi từ khóm nấm hoặc nhuộm trực tiếp sau khi nuôi cấy trên lam. Kiểm tra đặc điểm hiển vi, lựa chọn tiêu bản phù hợp nội dung giảng dạy, niêm phong và bảo quản tiêu bản để sử dụng trong thời gian dài.

- Lưu chủng: Dự kiến lưu chủng trong các điều kiện khác nhau gồm

- + Nước cất vô trùng ở điều kiện nhiệt độ phòng;
- + Glycerol 20% ở điều kiện nhiệt độ phòng.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Phân lập vi nấm

Phân lập được 103 mẫu vi nấm từ các mẫu đất thuộc một số công viên ở Tp.HCM và 36 mẫu vi nấm từ không khí một số phòng thí nghiệm tại cơ sở 300A.

Bảng 2 Số lượng vi nấm phân lập từ đất và không khí

Nơi lấy		Kí hiệu mẫu	Số lượng	Tổng		
Đất	Công viên Tao Đàn	TD1	09	34	103	139
		TD2	12			
		TD3	11			
		TD4	01			
		TD5	01			
	Công viên Gia Định	GD1	04	38		
		GD2	06			
		GD3	09			
		GD4	09			
		GD5	11			

Công viên Hoàng Văn Thụ	GD5	08	31	36
	HVT1	08		
	HVT2	04		
	HVT3	07		
	HVT4	03		
	HVT5	09		
Không khí	A402	402	12	36
	A403	403	13	
	A406	406	11	

3.2 Định danh nấm mốc

139 mẫu vi nấm đã phân lập được định danh bằng phương pháp thường qui dựa vào hình thái khóm nấm và đặc điểm hiển vi.

Có 101/139 mẫu vi nấm từ đất được định danh đến tên chi – thuộc 14 chi gồm: *Penicillium* (43 mẫu), *Aspergillus* (25 mẫu), *Trichoderma* (06 mẫu), *Mucor* (03 mẫu), *Fusarium* (04 mẫu), *Phoma* (01 mẫu), *Paecilomyces* (03 mẫu), *Bipolaris* (03 mẫu), *Curvularia* (04 mẫu), *Nigrospora* (01 mẫu), *Alternaria* (01 mẫu), *Botrytis* (02 mẫu), *Cladosporium* (04 mẫu) và *Corynespora* (01 mẫu). 38/139 mẫu không đủ cơ sở để định danh.

Bảng 3 Số lượng chi nấm phân lập từ đất và không khí

STT	Chi nấm	Nguồn		Tổng
		Đất	Không khí	
1	<i>Penicillium</i> sp.	37	06	43
2	<i>Aspergillus</i> sp.	17	08	25
3	<i>Trichoderma</i> sp.	06	-	06
4	<i>Mucor</i> sp.	03	-	03
5	<i>Fusarium</i> sp.	02	02	04
6	<i>Phoma</i> sp.	01	-	01
7	<i>Paecilomyces</i> sp.	01	02	03
8	<i>Bipolaris</i> sp.	-	03	03
9	<i>Curvularia</i> sp.	01	03	04
10	<i>Nigrospora</i> sp.	-	01	01
11	<i>Alternaria</i> sp.	-	01	01
12	<i>Botrytis</i> sp.	-	02	02
13	<i>Cladosporium</i> sp.	01	03	04
14	<i>Corynespora</i> sp.	-	01	01
15	Không đủ cơ sở định danh	34	04	38
Tổng		103	36	139

Trong số 139 mẫu vi nấm phân lập được, *Penicillium* và *Aspergillus* chiếm đa số. Đây là các chi nấm phổ biến trong môi trường ngoại cảnh với hình thái khóm nấm đa dạng phong phú và đặc điểm hiển vi với cấu trúc mang bào tử đặc trưng.

Các mẫu vi nấm thuộc chi *Penicillium* mang cấu trúc hiển vi điển hình với đầu mang bào tử có hình chôi. Trong 43 mẫu phân lập, chọn lựa được 26 chủng phù hợp để xây dựng tiêu bản giảng dạy với đặc điểm hiển vi điển hình, phát triển tốt trên môi trường thường dùng là PDA trong thời gian 3 – 5 ngày. Các chủng sản xuất nhiều giọt tiết (TD2-2, TD2-5, TD2-8, TD3-6, TD3-7, TD3-8, TD3-9, TD3-10 và TD3-14) gây khó khăn cho quá trình nhuộm vi nấm và các chủng phát triển

chậm (TD3-3, TD3-4, TD3-11, HVT2-3, HVT4-2, HVT5-4, HVT5-5 và 406-2) không phù hợp để xây dựng tiêu bản.

Trong 25 mẫu *Aspergillus* có 12 mẫu mang đặc điểm điển hình của nhóm Nigri (406-7, 403-8, TD1-4, TD1-11, GD1-3, GD2-1, GD2-4, GD3-1, GD3-3, GD5-1, GD5-2 và HVT1-3), 4 mẫu mang đặc điểm điển hình của nhóm Flavi (406-5, 402-14, GD4-2 và GD4-3) và 4 mẫu mang đặc điểm điển hình của nhóm Fumigatus (406-10, TD2-4, TD2-17 và TD2-18). Các mẫu *Aspergillus* còn lại có thêm một số đặc điểm hiển vi đặc biệt như mẫu GD5-3 có cấu trúc tế bào Hull...

Bên cạnh hai chi nấm phổ biến, nhóm nghiên cứu phân lập được 3 mẫu *Paecilomyces* và 6 mẫu *Trichoderma* với đặc điểm hiển vi dễ nhầm lẫn với *Aspergillus* và *Penicillium*. *Paecilomyces* có cấu trúc mang bào tử tương tự *Penicillium* nhưng thể bình, dạng phình to ở đáy và hẹp dần ở đỉnh, tạo cổ bình thuôn dài. *Trichoderma* cũng có cấu trúc tương tự nhưng đặc trưng là 3 thể bình mọc trên một cuống. Các mẫu này đều phù hợp để xây dựng tiêu bản giảng dạy, giúp sinh viên có cơ hội so sánh và phân biệt đặc điểm của các chi nấm cơ bản.

Ngoài ra, nhóm nghiên cứu cũng phân lập được 15 mẫu nấm thuộc nhóm sợi nấm có màu thuộc 6 chi *Bipolaris*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium* và *Nigrospora*. Lựa chọn được 11 mẫu phù hợp để xây dựng tiêu bản do có tốc độ sinh trưởng khá nhanh trên môi trường thường dùng là PDA (7 – 10 ngày) và tạo được bào tử điển hình của chi nấm.

3.3 Xây dựng tiêu bản và lưu chủng

Nghiên cứu đã xây dựng được bộ 139 tiêu bản nấm mốc. Dựa trên các tiêu chí và mục tiêu giảng dạy, lựa chọn được 57 mẫu tiêu bản phù hợp để sử dụng cho chương trình đào tạo Dược sĩ đại học. Hiện có các mẫu vi nấm thuộc 09 chi gồm *Penicillium* (26 mẫu), *Aspergillus* (17 mẫu), *Mucor*

(03 mẫu), *Fusarium* (02 mẫu), *Paecilomyces* (03 mẫu), *Bipolaris* (02 mẫu), *Curvularia* (02 mẫu), *Nigrospora* (01 mẫu) và *Alternaria* (01 mẫu). Có 09 mẫu nấm mốc được dự kiến sử dụng để phong phú nội dung giảng dạy thuộc 03 chi *Trichoderma* (04 mẫu), *Cladosporium* (03 mẫu) và *Botrytis* (02 mẫu).

139 mẫu nấm mốc đều được lưu chủng ở hai điều kiện:

+ Nước cất vô trùng ở điều kiện nhiệt độ phòng;

+ Glycerol 20% ở điều kiện nhiệt độ phòng.

4 Kết luận và đề xuất

Từ các nguồn mẫu dễ thu thập (đất và không khí), các vi nấm mốc thuộc chương trình học và phổ biến trong môi trường như *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Fusarium*... đã được phân lập. Việc xây dựng bộ tiêu bản mẫu và bộ lưu chủng vi nấm giúp giảng viên và kỹ thuật viên chủ động hơn trong việc chuẩn bị mẫu thực hành cho sinh viên. Bên cạnh đó, việc xây dựng và phong phú hóa bộ tiêu bản cũng như bộ chủng vi nấm giúp đa dạng nội dung giảng dạy. Từ đó, sinh viên có cơ hội quan sát và so sánh đặc điểm của các nhóm vi nấm; đồng thời tạo hứng thú trong học tập và kích thích khả năng tìm tòi nghiên cứu của sinh viên. Nhóm tác giả cũng đề xuất thu thập thêm nguồn đất từ các vị trí khác trên địa bàn Tp.HCM để phân lập vi nấm, nhằm phong phú bộ mẫu giảng dạy; đồng thời có thể xây dựng cơ sở thông tin về phân bố loài nấm mốc trong đất tại Tp.HCM...

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ NTTU, đề tài mã số 30.01.2018.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Đình Nga, Lê Thị Ngọc Huệ, Nguyễn Thị Vân Hà (2017), Giáo trình thực tập Kí sinh trùng, Nhà sản xuất Hồng Đức, tr. 51, 53-56, 62.
2. D.Wei Li, Eckardt Johanning, Chin S.Yang (2016), "Aribone fungi and mycotoxins", *Manual of Environmental Microbiology*, pp. 3.2.5-1 – 3.2.5-21.
3. G.S.de Hoog, J.Guarro, J.Gené and M.J.Figueras. *Atlas of clinical fungi 2nd edition*, Amer Society for Microbiology, pp. 1-20, 81-92, 332-347, 442-518, 598-611, 681-704, 814-844, 794-808, 943-952, 582-591.
4. W.Elliott Horner, Anthony G.Worthan and Philip R.Morey (2004), "Air- and Dustborne Mycoflora in Houses Free of Water Damage and Fungal Growth", *Applied and environmental microbiology*, Vol.70, No.11, p.6394 – 6400.

Isolation and identification of fungi from soil and air for teaching at NTTU

Le Quang Hanh Thu

Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

lqthu@ntt.edu.vn

Abstract The purpose for this work was to isolate fungi from soil and air in HCMC and classify to genus level. Samples were collected in December, 2017 and cultivated for fungi. Fungi isolated from soil include *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Fusarium*, *Phoma*, *Paecilomyces*, *Curvularia* and *Cladosporium*; fungi isolated from air were *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Bipolaris*, *Curvularia*, *Nigrospora*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium* and *Corynespora*. Thirty-eight isolations did not produce sexual or asexual spores so they could not be identified based on the features of colonies in soil cultures and microscopic features.

Keywords fungi, *Penicillium*, isolation, soil, air

