

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN MỘT SỐ CHỦNG NẤM SỢI CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN TỪ ĐẤT Ở QUẬN NINH KIỀU, THÀNH PHỐ CẦN THƠ

Nguyễn Thị Hà¹

¹ Khoa Sư phạm, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 15/05/2014

Ngày chấp nhận: 30/10/2014

Title:

Isolation and selection of some fungi having antibacterial activity from the soil of Ninh Kieu District, Can Tho City

Từ khóa:

Fusarium solani, gene ITS, hoạt tính kháng khuẩn, *Penicillium pinophilum*, vi sinh vật đất

Keywords:

Antibacterial activities, gene ITS, *Fusarium solani*, *Penicillium pinophilum*, soil fungi

ABSTRACT

This study aimed to isolate and characterize antibacterial fungi strains from soil samples collected in Ninh Kieu District, Can Tho City. Seven fungi isolates exhibited high antibacterial activities towards bacterial pathogens, such as *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Edwardsiella ictaluri*, and *Aeromonas hydrophila*, were screened. Among these isolates, two isolates exhibiting highest antibacterial activity were selected. Based on morphological study, these two isolates belonged to *Penicillium* and *Fusarium* genus. Furthermore, ITS sequence analysis and BLAST search results on NCBI genbank database revealed that two selected antibacterial fungi isolates were *Penicillium pinophilum* and *Fusarium solani* species.

TÓM TẮT

Đề tài nhằm mục đích phân lập và khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của một số chủng nấm sợi từ đất ở quận Ninh Kiều, Thành phố Cần Thơ. Xác định hoạt tính kháng khuẩn của các chủng nấm sợi đã phân lập bằng phương pháp khối thạch trên các loài vi khuẩn gây bệnh ở người và động vật như *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri* cho thấy ba trong bảy chủng nấm có hoạt tính kháng ba loại vi khuẩn kiểm định, và qua khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của dịch trích sinh khối của ba chủng nấm kháng được ba loại vi sinh vật kiểm định, đã tìm ra được hai chủng nấm có hoạt tính kháng khuẩn cao nhất. Định danh bằng khảo sát hình thái dưới kính hiển vi quang học vật kính 40X, và giải trình tự gene ITS kết hợp sử dụng phần mềm BLAST trên ngân hàng gene NCBI cho thấy có khả năng hai chủng nấm này thuộc loài *Penicillium pinophilum* và *Fusarium solani*.

1 GIỚI THIỆU

Chất kháng sinh (CKS) không những trở thành thần dược cứu sống con người mà còn được ứng dụng rộng rãi trong trồng trọt, chăn nuôi, công nghệ thực phẩm và bảo vệ môi trường. Ở nước ta cũng như các nước đang phát triển việc lạm dụng thuốc KS, việc các VK gây bệnh ở người đang

kháng nhiều loại KS thông thường, và ngày càng xuất hiện nhiều chủng VSV kháng thuốc nên việc điều trị bằng kháng sinh trở nên rất khó khăn cho các thầy thuốc lâm sàng. Việc tìm kiếm CKS mới có nguồn gốc từ thiên nhiên, do các VSV tiết ra chống lại các VSV gây bệnh đã lờn thuốc đang thu hút sự quan tâm của nhiều nhà khoa học, đó là một việc làm vô cùng cấp thiết và quan trọng.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Phương pháp phân lập nấm sợi

Bốn địa điểm khác nhau ở quận Ninh Kiều, Thành phố Cần Thơ được chọn để thu mẫu đất, lấy 50 g đất với độ sâu khoảng 5-7 cm cho vào bọc nilon, ghi chú và đem về trụ trong ngăn mát tủ lạnh. Đồng nhất mẫu: cân 4 mẫu đất đã thu thập, mỗi mẫu 1 g đất cho vào 4 ống nghiệm chứa 9 ml nước cất. Pha loãng theo các mức độ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} lần, lấy 0,1 ml dung dịch ở các nồng độ pha loãng khác nhau cấy trang lên môi trường YEA có bổ sung chất kháng khuẩn chloramphenicol 0,01%, ủ mẫu trong tủ ủ vi sinh vật ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ. Tiếp tục phân lập đến khi rỗng (Choi, 1999).

2.2 Khảo sát đặc điểm hình thái nấm sợi

Hình thái đại thể: Cấy nấm sợi vào ống thạch nghiêng, sau 3 ngày cho 5 ml nước cất vô trùng vào ống giống, lăn nhẹ ống giống trong lòng bàn tay để các bào tử thấm nước tạo thành dịch huyền phù. Sau đó dùng que cấy vô trùng nhúng nhẹ vào dịch huyền phù rồi cấy 1 điểm vào đĩa petri có độ một lớp mỏng môi trường MEA. Ủ ở nhiệt độ 30°C, quan sát khuẩn lạc từng ngày về các đặc điểm sau: tốc độ phát triển của khuẩn lạc, màu sắc và sự biến đổi màu sắc trên bào tử, hình dáng khuẩn lạc, mép khuẩn lạc và sợi nấm.

Hình thái vi thể: Đặt một miếng thạch mỏng (MT5) có kích thước 0,5x0,5cm lên một miếng lam vô trùng đặt ở giữa đĩa petri trên một miếng giấy lọc được làm ẩm bằng nước cất vô trùng. Sau đó cấy nấm sợi vào 2 góc đối của miếng thạch, đẩy lamell lên, đẩy nắp đĩa petri lại và ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 ngày. Lấy lam ra, nhuộm nấm bằng phương pháp nhuộm kép với acetocarmin và fushin, sau đó quan sát bằng kính hiển vi ở vật kính 40X và 100X về các đặc điểm sau: hình dạng sợi nấm: màu sắc, có hay không có vách ngăn, có phân nhánh hay không, đặc điểm cơ quan sinh bào tử, hình dáng bào tử.

2.3 Phương pháp xác định hoạt tính kháng sinh

2.3.1 Phương pháp khối thạch

Cấy từng dòng nấm sợi đã phân lập rỗng trên MT MEA, ủ ở nhiệt độ phòng từ 3-4 ngày. Dùng khoan nút chai vô trùng khoan các khối thạch có đường kính 8 mm. Chuẩn bị MT môi trường nuôi cấy VSV kiểm định (MPA), đổ môi trường thành một lớp thạch mỏng lên đĩa Petri, cấy trái VSVKD lên bề mặt. Dùng kim mũi mác lấy các khối thạch chứa chủng nấm sợi nghiên cứu đặt lên các đĩa

thạch có VSVKD. Đặt đĩa trong tủ lạnh từ 4h-8h, sau đó ủ ở nhiệt độ phòng trong 24h. Xác định hoạt tính kháng sinh bằng cách đo kích thước vòng vô khuẩn D-d. D là đường kính vòng vô khuẩn, d là đường kính khối thạch. $D-d \geq 25$ mm rất mạnh, $D-d < 15$ mm yếu, $D-d \geq 20$ mm mạnh, $D-d = 0$ mm không kháng, $D-d \geq 15$ mm trung bình. (Đỗ Thu Hà, 2004)

2.3.2 Phương pháp đục lỗ

Cấy từng dòng nấm sợi đã phân lập rỗng vào bình tam giác chứa 20 ml YEA dịch thể. Ủ ở nhiệt độ phòng, sau 3-5 ngày thu dịch nuôi cấy. Cấy trái VSV kiểm định lên môi trường tương ứng. Dùng khoan nút chai khoan các lỗ trên đĩa có VSV kiểm định. Dùng pipet hút 0,1 ml dịch nuôi cấy các chủng nấm sợi nghiên cứu cho vào các lỗ khoan. Đặt đĩa trong tủ lạnh từ 4-8 giờ, ủ ở nhiệt độ phòng 2 ngày, xác định hoạt tính kháng sinh bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn D-d (mm).

2.3.3 Định danh các chủng nấm sợi phân lập được

Chủng nấm sợi có khả năng sinh kháng sinh được nuôi trên môi trường YEA, sau đó được định danh sơ bộ bằng phương pháp quan sát hình thái với các đặc điểm như, dạng bia, màu sắc, kích thước, hình dạng và bề mặt của khuẩn lạc. Ngoài ra các mẫu còn được làm tiêu bản xem dưới kính hiển vi để quan sát hệ sợi nấm, bào tử.

Phương pháp làm tiêu bản: Dùng dao lam lấy 0.5x0.5cm diện tích agar có nấm sợi đặt lên lam và nhuộm với 30 μ l thuốc nhuộm cotton blue trong 30 phút. Sau đó dùng lamell đập lại (tránh bọt khí) xem dưới kính hiển vi ở vật kính 40X. Sau đó, các đặc điểm hình thái của chủng nấm sợi có khả năng sinh kháng sinh được so sánh với các đặc điểm hình thái của các chủng nấm sợi với khóa phân loại của Nguyễn Đức Lượng (2003).

Chủng nấm sợi sau khi đã định danh sơ bộ bằng các đặc điểm hình thái như trên được gởi định danh bằng phương pháp sinh học phân tử tại phòng thí nghiệm Sinh học phân tử Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Kết quả định danh bằng phương pháp này dựa trên giải trình tự vùng ITS sẽ được so sánh với cơ sở dữ liệu Genbank trên trang web NCBI bằng công cụ BLAST SEARCH.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

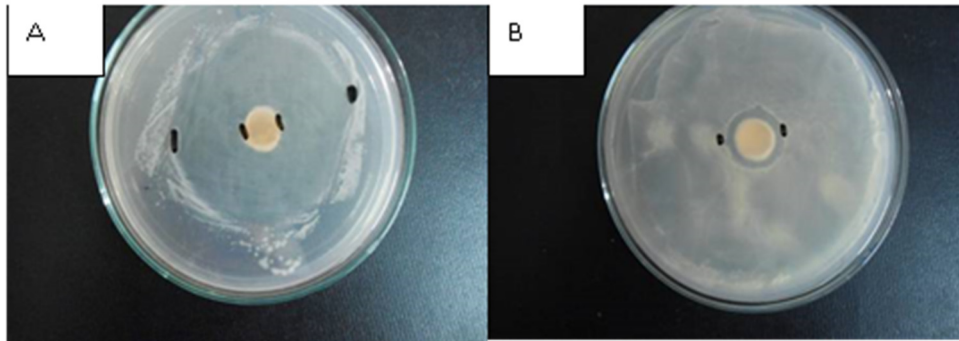
3.1 Phân lập và tuyển chọn các chủng nấm

Từ bốn mẫu đất đã thu thập được từ 4 khu vực khác nhau ở Quận Ninh Kiều, Thành phố Cần Thơ, đã phân lập được 11 chủng nấm sợi.

3.2 Tuyển chọn các chủng có hoạt tính kháng khuẩn

Những chủng có hoạt tính kháng khuẩn tốt nhất được tuyển chọn từ 11 chủng nấm sợi đã phân lập được. Quá trình tuyển chọn các chủng nấm có hoạt tính kháng VSVKĐ được tiến hành theo 2 bước: bước 1, 11 chủng nấm sợi được sàng lọc hoạt tính

kháng VSVKĐ theo phương pháp khối thạch (Hình 1) để tuyển chọn những chủng có hoạt tính kháng VSVKĐ mạnh. Các chủng VSVKĐ là *Aeromonas Hydrophila* và *Edwardsiella Ictaluri* (VSV gây bệnh trên cá tra) và hai chủng gây bệnh trên người và động vật là chủng *B. subtilis* và *E. coli*. Kết quả được trình bày ở Bảng 1.



Hình 1: Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của chủng nấm sợi bằng phương pháp khối thạch với *B. subtilis* và VSVKĐ. A. VT3.1, B. VR1.1

Bảng 1: Hoạt tính kháng khuẩn của nấm sợi bằng phương pháp khối thạch

STT	KH Chủng	Hoạt Tính kháng VSVKĐ (D – d, mm)			
		<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Aeromonas Hydrophila</i>	<i>Edwardsiella Ictaluri</i>
1	VT3.1	35	18	2	0
2	VC1.3	0	0	0	0
3	DH2.3	10	30	10	3
4	VR1.1	6	8	7	0
5	VC2.4	17	10	0	0
6	NK6	5	30	0	0
7	VC2.3	0	0	0	0
8	CK	17	0	0	0
9	VC2.2	0	0	0	0
10	VC3.2	0	0	0	0
11	DH2.2	18	0	0	0

Ghi chú: D = đường kính vòng vô khuẩn, d = đường kính lỗ đục trên đĩa thạch

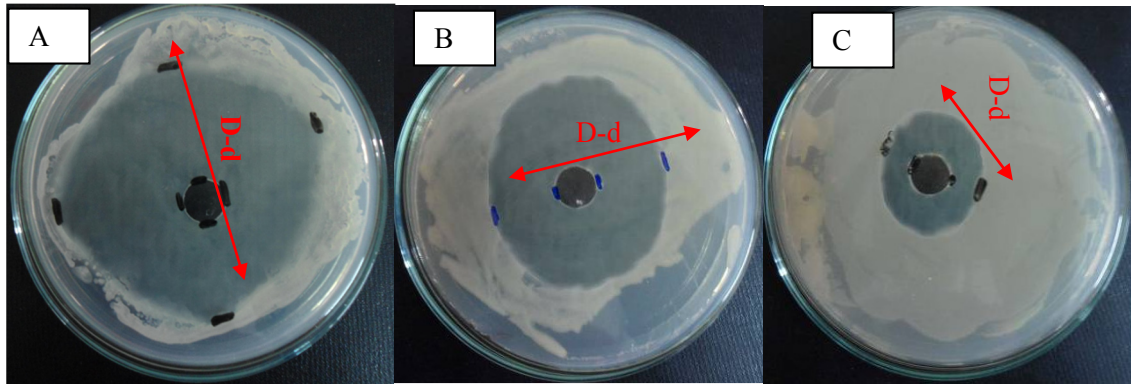
Dựa vào kết quả xác định đường kính vòng kháng khuẩn ở Bảng 1 cho thấy, trong số 11 chủng nấm có bốn chủng không thể hiện hoạt tính kháng VSVKĐ. Những chủng còn lại thể hiện hoạt tính khác nhau đối với các chủng VSVKĐ khác nhau. Chủng VT3.1 có khả năng kháng vi khuẩn *B. subtilis* rất mạnh, kháng *E. coli* trung bình và có khả năng kháng cả *Aeromonas Hydrophila* nhưng thấp. Còn chủng DH2.3 thì có khả năng kháng *E. coli* rất mạnh nhưng kháng *B. subtilis* thấp hơn VT3.1, ngoài ra chủng này còn có thể kháng cả *Aeromonas Hydrophila* và *Edwardsiella Ictaluri*. Tương tự chủng VT3.1, chủng VR1.1 cũng kháng ba loại VSVKĐ nhưng hoạt tính yếu hơn. Còn hai

chủng VC2.4 có hoạt tính kháng *B. subtilis* và *E. coli* ở dạng trung bình, NK6 có hoạt tính kháng *B. subtilis* và *E. coli* rất mạnh nhưng không có khả năng kháng hai vi khuẩn còn lại. Đối với CK và DH2.2 thì chỉ kháng được *B. subtilis* ở mức độ trung bình. Qua kết quả trên có thể thấy chủng VT3.1, DH2.3 có hoạt tính kháng khuẩn cao, và VR1.1 mặc dù hoạt tính kháng khuẩn không cao nhưng có khả năng kháng cả ba loại VSVKĐ. Vì vậy, ba chủng này được chọn ra để xác định hoạt tính kháng khuẩn trong dịch trích sinh khối nấm ở bước kế tiếp.

Ở bước hai, ba chủng nấm (VT3.1, DH2.3, VR1.1) được nuôi cấy trong cùng điều kiện và

trong thời gian 2 tuần, ở nhiệt độ phòng (30-32⁰C). Dịch nuôi cấy nấm sau khi ly tâm loại bỏ xác tế bào được sử dụng để xác định hoạt tính kháng

khảo bằng phương pháp đục lỗ thạch (Hình 2). Hoạt tính kháng VSVKĐ được trình bày trong Bảng 2.



Hình 2: Hoạt tính kháng khuẩn của dịch trích sinh khối các chủng VT3.1, DH2.3, VR1.1 bằng phương pháp đục lỗ thạch trên môi trường MT MPA.

VT3.1(VSVKĐ: *B.Subtilis*), B. DH2.3(VSVKĐ: *E.Coli*), C. VR1.1(VSVKĐ: *E.Coli*)

Bảng 2: Hoạt tính kháng VSVKĐ trong dịch trích sinh khối các chủng VT3.1, DH2.3, VR1.1 trên môi trường MT YEA

STT	KH Chủng	Hoạt Tính kháng VSVKĐ (D-d, mm)			
		<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Aeromonas Hydrophila</i>	<i>Edwardsiella Ictaluri</i>
1	VT3.1	40	20	5	0
2	DH2.3	15	36	10	5
3	VR1.1	5	10	5	0

Ghi chú: D = đường kính vòng vô khuẩn, d = đường kính lỗ đục trên đĩa thạch

Kết quả sàng lọc ở bước hai cho thấy, trong ba chủng VT3.1, DH2.3, VR1.1 được chọn để xác định hoạt tính kháng khuẩn trong dịch trích sinh khối, chủng VT3.1 có hoạt tính kháng VSVKĐ *B. subtilis* rất mạnh với đường kính vòng vô khuẩn khá lớn 40 mm. Riêng chủng VR1.1 có hoạt tính kháng các VSVKĐ yếu hơn. Kết quả khảo sát cũng cho thấy 2 chủng VT3.1 và DH2.3 có khả năng ức chế cả VK G (+) lẫn VK G (-), và đây cũng là đặc tính đặc biệt của 2 chủng nấm sợi này. Ngoài ra chủng nấm VT3.1 còn có khả năng ức chế vi khuẩn *Aeromonas Hydrophila* và chủng DH2.3 có khả năng ức chế cả vi khuẩn *Aeromonas Hydrophila* lẫn vi khuẩn *Edwardsiella Ictaluri* gây bệnh trên cá tra.

Như vậy, sau 2 bước sàng lọc hai chủng có hoạt tính kháng VSVKĐ tốt nhất là 2 chủng VT3.1 và DH2.3 và được chọn để định danh bằng phương pháp sinh học phân tử.

3.3 Định danh chủng nấm VT3.1 và DH2.3 bằng phương pháp sinh học phân tử

Chủng nấm VT3.1 và chủng nấm DH2.3 được gọi định danh ở phòng thí nghiệm Sinh học Phân tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

Trình tự ITS của chủng nấm VT3.1 có tổng số 533 nucleotide được giải trình tự bằng cặp mồi của White *et al.* (1990):

(ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3';
ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

Kết quả giải trình tự cho thấy ITS của chủng nấm sợi VT3.1 có trình tự như sau:

```
TATACACCTGTTGCTTTGGCGGGCCCAC
CGGGGCCACCTGGTCGCCGGGGACGCAC
GTCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGCGCGC
TGTGAACCCTGATGAAGATGGGCTGTCTGA
GTA CTATGAAAATTGTCAA AACTTTCAACA
ATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAG
AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA
```


ATTGCAGAATTCCTGGAATCATCGAATCTT
TGAACGCACTTTGCGCCCCCTGGCATTCCG
GGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTG
CCCTCAAGCACGGGTTGGTGTGTTGGGTGT
GGTCCCCCGGGAACCTACCCAAAAGGAA
GCGGCGACGTCCGTCTGGTCTCGAGCGTA
TGGGGCTGTGACTCGTCTCGGGAAGGACC
TGCGGGGTTGGTCACCACCATTTTTACC
ACGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAGTTAC
CCGCTGAACTTAAAGCATATCAATAAGCGG
GAAGAAA

Sử dụng BLAST so sánh trình tự của đoạn gene này với trình tự gene ITS của các chủng nấm đã biết trong ngân hàng gene của NCBI cho thấy, chủng VT3.1 được xác định có độ mức tương đồng gene ITS rất cao (100%) với chủng *Penicillium pinophilum* SGE75.

Trình tự ITS của chủng nấm DH2.3 có tổng số 533 nucleotide được giải trình tự bằng cặp mồi của White *et al.* (1990):

ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3';

ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Chủng nấm sợi DH2.3 có kết quả giải trình tự ITS như sau:

ACATACCTAAAACGTTGCTTCGAGCGGG
AACAGACGGCCCCGTAACACGGGCCGAGC
CCC GCCAGAGACCCCTAACTCTGTTTCA
TTATGTTTCTTCTGAGTAAAACAAGCAAAT
AAATTAATAACTTTCAACAACGGATCTCTTG
GCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT
GCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCT
GTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAGGCCCC
CGGGCCTGGCGTTGGGGATCGGCGAGGCG
CCCCCTGCGGGCACACGCCGTCCCCCAAAT
ACAGTGGCGGTCCC GCCCAGCTTCCATTG
CGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGAGAG
CGGCGCGGCCACGCCGTAACACCCAAC
TTCTGAATGTTGACCTCGAATCAGGTAGGA
ATACCCGCTGAACTTAAAGCATATCAATAAA
CGGAGGAC

Kết quả tra cứu trên BLAST của NCBI cho thấy dòng DH2.3 được xác định có độ tương đồng với dòng *Fusarium solani* genomic DNA containing partial ITS gene ở mức 98%.

Như vậy, hai chủng nấm có hoạt tính kháng khuẩn cao vừa được phân lập từ đất ở vùng trũng trong hẻm 51, đường 3.2, quận Ninh Kiều, Thành phố Cần Thơ (VT3.1), và đất trong khuôn viên Trường ĐHTC (DH 2.3) có khả năng thuộc các loài *Penicillium pinophilum* và *Fusarium solani* tương ứng.

4 KẾT LUẬN

Đã phân lập được 11 chủng nấm sợi từ đất được thu thập ở quận Ninh Kiều, Thành phố Cần Thơ, trong đó có 7 chủng có hoạt tính kháng vi khuẩn E. Coli, 5 chủng có hoạt tính kháng vi khuẩn B. subtilis. Về mặt hình thái các chủng này thuộc các giống *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* và *Alternaria*. Hai chủng có hoạt tính kháng khuẩn cao nhất được chọn có thể thuộc hai loài khác nhau là *Penicillium pinophilum* và *Fusarium solani*.

LỜI CẢM ƠN

Cám ơn Viện Công nghệ Sinh học đã tạo điều kiện vật chất cho thí nghiệm, cảm ơn sinh viên Lâm Thị Thúy Huỳnh đã tham gia thực hiện đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Choi, Y.W., Hyde, K.D. and Ho, W.H. 1999. *Single spore isolation of fungi*. Fungal Diversity 3: 29-38.
- Đỗ Thu Hà. 2004. *Nghiên cứu xạ khuẩn sinh chất kháng sinh chống nấm phân lập từ đất Quảng Nam-Đà Nẵng*. Luận án tiến sĩ Khoa Học, ĐHTSP Hà Nội.
- Nguyễn Đức Lượng, Phan Thị Huyền, Nguyễn Ánh Tuyết. 2003. *Thí nghiệm công nghệ sinh học*. NXB ĐH Quốc gia, TP HCM, Tập 2 - Thí nghiệm vi sinh vật học.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor. 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. Pp. 315-322.