

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CHỦNG NẤM MEN *SACCHAROMYCES* SP.02

NGÔ MỸ YẾN¹, TRẦN THANH THỦY²

1. Đặt vấn đề

Đã từ lâu, nấm men được biết đến như một công cụ không thể thiếu được trong công nghiệp sản xuất cồn, các loại nước giải khát có rượu như: bia, vang, sâm banh và các loại bánh mì v.v...

Từ những năm 70, 80 của thế kỷ này, nấm men thật sự trở thành mô hình quý giá để phân tích phần lớn các chức năng của tế bào đặc trưng cho nhân chuẩn, để nghiên cứu chức năng protein động vật, chức năng một số gen ở thực vật.

Trong vòng 20 năm trở lại đây, nấm men đã tạo ra một cuộc cách mạng trong nghiên cứu sinh học phân tử giai đoạn hiện đại. Nấm men luôn được chọn là đối tượng điển hình xuất sắc trong nghiên cứu lí thuyết và những ứng dụng thực tiễn.

Để góp phần vào việc tìm hiểu vai trò và ứng dụng nấm men phục vụ đời sống, chúng tôi đã tiến hành đề tài “*Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng nấm men Saccharomyces sp.02*”. Hy vọng rằng những kết quả nghiên cứu bước đầu về chủng nấm men này sẽ là cơ sở cho những ứng dụng thiết thực trong chăn nuôi gia súc hiện nay.

Mục đích tìm hiểu một số đặc điểm sinh lí, sinh hoá, phân loại và một số đặc tính sinh học khác của chủng nấm men *Saccharomyces* sp.02 làm cơ sở để sử dụng chủng này tạo chế phẩm *probiotic* phòng và trị bệnh đường ruột cho heo.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Chủng nấm men *Saccharomyces* sp.02 từ bộ sưu tập giống của phòng thí nghiệm Vi sinh – Khoa Sinh Đại học Sư phạm TP.HCM.

¹ Sinh viên, Trường Đại học Sư phạm TP.HCM.

² Tiến sĩ, Trường Đại học Sư phạm TP.HCM.

Các chủng vi sinh vật kiểm định do Trung tâm bảo tàng giống chuẩn ĐHQG Hà Nội và Viện Pasteur Tp. HCM cung cấp.

Các kháng sinh chuẩn do Công ty TNHH Nam khoa cung cấp. Hoá chất, thiết bị dùng nghiên cứu rất phổ biến trong PTN về Vi sinh vật học.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Kiểm tra độ thuần khiết của giống bằng phương pháp Koch; Nghiên cứu các đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hoá của chủng nấm men *Saccharomyces* sp.02 theo Nguyễn Lân Dũng; nghiên cứu sự sinh trưởng và phát triển của nấm men bằng phương pháp đếm số lượng tế bào trên khung đếm Thoma-Goriaev; Khảo sát sự ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến khả năng tạo sinh khối của tế bào bằng phương pháp cân sinh khối tươi; Khảo sát khả năng đề kháng với các chất kháng sinh của nấm men bằng phương pháp dùng đĩa kháng sinh chuẩn; Bảo quản nấm men bằng phương pháp đông khô; Xác định khả năng sống sót sau đông khô bằng đếm số lượng khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch.

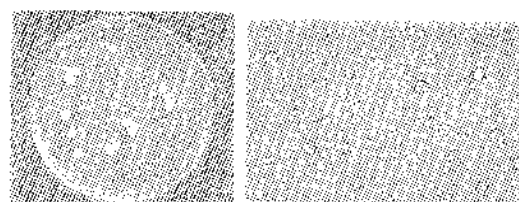
3. Kết quả và biện luận

3.1 Nghiên cứu các đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hoá của chủng *Saccharomyces* sp.02

3.1.1. Các đặc điểm hình thái

Nuôi cấy chủng nấm men *Saccharomyces* sp.02 trên môi trường Hansen agar ở nhiệt độ 28-30°C. Sau 3 ngày quan sát đặc điểm hình thái khuẩn lạc của chủng nấm men trên.

Kết quả được mô tả trong hình 1 và bảng 1.



Hình 1: Hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng *Saccharomyces* sp.02

Bảng 1: Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào chủng nấm men *Saccharomyces* sp.02

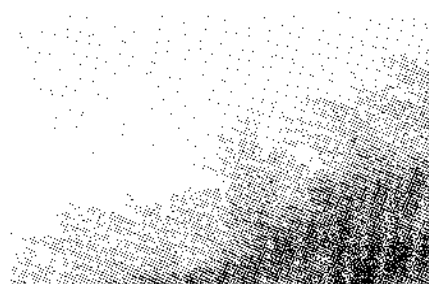
| <i>Hình thái khuẩn lạc</i> | | | | |
|----------------------------|-----------------------------|------------------|----------------------|----------------------|
| Hình dạng | Màu | Bề mặt | Mép | Đường kính khuẩn lạc |
| Tròn | Trắng ngà, ở giữa màu trắng | Bóng, nhô ở giữa | Tròn, không răng cưa | 1,9-3 mm |

| Hình thái tế bào | | | | | |
|------------------|---------------------|------------------------------|---------------|---------------------------|-----------------------|
| Hình dạng | Cách sắp xếp tế bào | Kích thước (μm) | Dạng nảy chồi | Tỉ lệ tế bào nảy chồi (%) | Tỉ lệ tế bào chết (%) |
| Tròn, elip | Tế bào nằm đơn lẻ | (4-6,16 x 4-9,24) | Đơn cực | 28,26 | 2,7 |

3.1.2. Quan sát khuẩn ty nấm men

Cấy nấm men trên môi trường *pepton-glucosa* (MT9) nuôi ở 25-30⁰C sau 3-5 ngày lấy ra quan sát với cấy dưới kính hiển vi. Kết quả: khuẩn ty của chủng nấm men *Saccharomyces* sp.02 là khuẩn ty giả đờ là những tế bào dài xếp nối tiếp nhau.

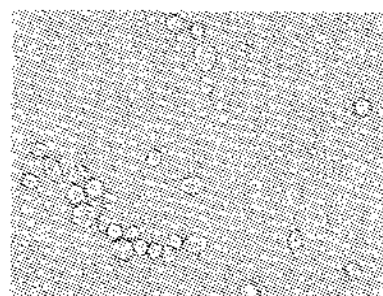
Kết quả này được minh họa trong hình 2.



Hình 2: Khuẩn ty của chủng *Saccharomyces* sp.02

3.1.3. Quan sát nang bào tử nấm men

Cấy nấm men *Saccharomyces* sp.02 trên thạch nghiêng chứa môi trường 11 nuôi ở 28 -30⁰C trong 10-15 ngày có thể quan sát thấy nang bào tử của nấm men. Kết quả: trong nang bào tử có từ 1-4 bào tử, bào tử hình cầu. Kết quả này được minh họa trong hình 3.



Hình 3: Nang bào tử của chủng nấm men *Saccharomyces* sp.02

3.1.4. Khả năng sử dụng nitrat làm nguồn nitơ duy nhất

Cấy chủng nấm men *Saccharomyces* sp.02 trên môi trường 6 (môi trường thử khả năng sử dụng nguồn nitơ; môi trường đối chứng hay môi trường cơ sở) và môi trường cơ sở có bổ sung 1g KNO₃; kí hiệu MT (-). Môi trường cơ sở có bổ sung 1g pepton hay (NH₄)₂SO₄; kí hiệu MT (+).

Kết quả: sau 3 ngày nuôi ở 28-30⁰C chủng *Saccharomyces* sp.02 mọc trên MT(+) có bổ sung pepton. Điều này chứng tỏ chủng này không thể sử dụng nguồn

dinh dưỡng nitơ dưới dạng nitrat để sinh trưởng – phát triển vì chúng không có khả năng tiết enzym *nitrat reductaza* phân giải nitrat.



(+) : Có bổ sung pepton.
 DC : Ống đối chứng.
 (-) : Có bổ sung KNO₃.

Hình 4: Khả năng phân giải nitrat của chủng nấm men *Saccharomyces sp.02*

1.5. Khả năng phân giải urê

Cấy chủng nấm men trên môi trường 7 (môi trường thử khả năng phân giải urê). Nuôi trong tủ ấm từ 3 - 5 ngày lấy ra quan sát thấy vết cấy không có màu đỏ hồng. Điều này chứng tỏ chủng *Saccharomyces sp.02* không có khả năng phân giải urê.



Hình 5: Khả năng phân giải urê của chủng nấm men *Saccharomyces sp.02*

1.6. Khả năng lên men các loại đường

Cho 9ml mỗi loại môi trường nước chiết giá đậu với các loại đường: maltose, lactose, d- galactose, saccarose, glucose, fructose và dextrin vào các bình Einhorn - Smith. Cho 1ml giống (chủng nấm men *Saccharomyces sp.02* đã hoạt hóa vào các bình trên. Sau 8 giờ lên men kết quả được ghi nhận ở bảng 2.

Bảng 2: Khả năng lên men các loại đường của chủng nấm men sau 8 giờ

| Loại đường | Khả năng lên men | |
|--------------------|------------------|----------------------|
| <i>Glucose</i> | +++ | +++ Lên men rất mạnh |
| <i>Maltose</i> | +++ | |
| <i>Saccarose</i> | ++ | |
| <i>Fructose</i> | ++ | ++ Lên men mạnh |
| <i>Dextrin</i> | ++ | + Lên men trung bình |
| <i>D-galactose</i> | ++ | - Không lên men |
| <i>lactose</i> | - | |

Từ bảng trên cho thấy chủng nấm men *Saccharomyces* sp.02 lên men mạnh đối với đường *glucose*, *maltose*, *saccharose*; lên men yếu đối với đường *fructose*, *dextrin*, *d-galactose* và không lên men đối với đường *lactose*.

Tổng hợp kết quả nghiên cứu các đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hoá của chủng nấm men *Saccharomyces* sp.02 và tóm tắt trong bảng 3.

Bảng 3: So sánh các đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hoá của chủng nấm men *Saccharomyces* sp.02 với đặc điểm chung của chi *Saccharomyces* (theo khoá phân loại của Lodder 1971).

| Các đặc điểm | Chủng <i>Saccharomyces</i> sp.02 | Đặc điểm của chi <i>Saccharomyces</i> (theo Lodder 1971) |
|---------------------------------|--|--|
| Hình thái khuẩn lạc | Tròn, bóng | Khuẩn lạc dạng bột nhão, hơi bóng |
| Hình thái tế bào | Tròn, elip | Tròn, elip |
| Dạng nảy chồi | Đơn cực | Đa cực hay đơn cực |
| Khuẩn ty | Giả | Có hoặc không có khuẩn ty giả |
| Nang bào tử | Trong nang bào tử có 1-4 bào tử, bào tử hình cầu | Trong nang bào tử có 1-4 bào tử, bào tử hình cầu, elip |
| Khả năng sử dụng nitrat | Không | Không |
| Khả năng phân giải urê | Không | Không rõ |
| Khả năng lên men các loại đường | Lên men được 6 trong 7 loại đường khảo sát: <i>glucose</i> , <i>maltose</i> , <i>fructose</i> , <i>saccharose</i> , <i>d-galactose</i> , <i>dextrin</i> ; không lên men đường <i>lactose</i> | Có khả năng lên men các loại đường khác nhau |

So sánh các đặc điểm chủng nấm men *Saccharomyces* sp.02 với đặc điểm chung của chi *Saccharomyces* theo khoá phân loại của Lodder (1971) chúng đều có các đặc điểm tương đồng. Do vậy chúng tôi có thể kết luận chủng nấm men *Saccharomyces* sp.02 thuộc chi *Saccharomyces*.

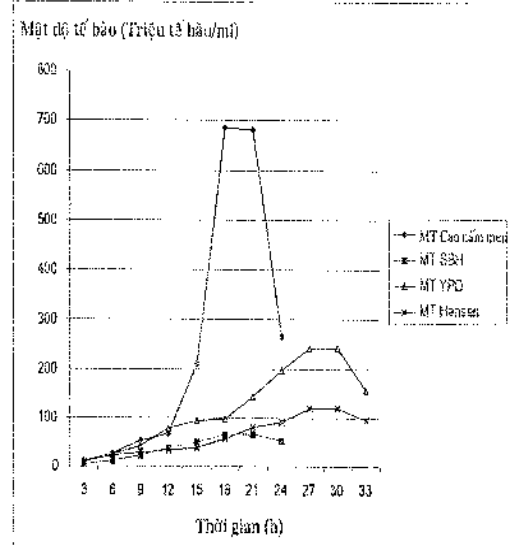
3.2. Chọn môi trường tối ưu cho sự sinh trưởng và phát triển

Cấy chủng nấm men *Saccharomyces* sp.02 vào các ống nghiệm chứa 4 môi trường: Cao nấm men, SBH, YPD, Hansen dịch thể với tỉ lệ giống ban đầu bằng nhau 0,3 triệu tế bào/ml. Theo dõi sự sinh trưởng – phát triển của nấm men sau 0, 3, 6, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 giờ. Dùng phương pháp đếm số lượng tế bào bằng phòng

đếm hồng cầu để xác định số lượng tế bào ở mỗi thời điểm trên. Kết quả được ghi nhận ở bảng 4 và đồ thị 1.

Bảng 4: Mật độ tế bào trên các loại môi trường

| Thời gian (h) | Mật độ tế bào trên các loại môi trường (triệu tb/ml). | | | |
|---------------|---|-------|--------|-----------------|
| | Cao nấm men | SBII | YPD | Hansen dịch thể |
| 0 | 0,30 | 0,30 | 0,30 | 0,30 |
| 3 | 10,00 | 4,17 | 8,54 | 7,92 |
| 6 | 25,34 | 11,04 | 24,58 | 21,46 |
| 9 | 52,50 | 21,18 | 42,04 | 29,17 |
| 12 | 66,04 | 36,17 | 77,71 | 32,09 |
| 15 | 209,58 | 49,72 | 91,94 | 36,66 |
| 18 | 685,00 | 64,70 | 98,33 | 57,29 |
| 21 | 681,80 | 64,04 | 143,62 | 80,83 |
| 24 | 265,40 | 51,38 | 195,83 | 91,88 |
| 27 | ---- | ---- | 241,77 | 118,72 |
| 30 | ---- | ---- | 241,57 | 117,93 |
| 33 | ---- | ---- | 156,04 | 94,88 |



Đồ thị 1: Đồ thị sinh trưởng của chủng nấm men *Saccharomyces sp.02* trên các môi trường khác nhau

Kết quả khảo sát này cho thấy môi trường cao nấm men là môi trường tối ưu nhất cho sự sinh trưởng và phát triển của chủng nấm men *Saccharomyces sp.02*, có thể sử dụng môi trường này để khảo sát ảnh hưởng của điều kiện môi trường đến sự sinh trưởng và phát triển của chủng này trong những nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố môi trường đến khả năng tạo sinh khối của tế bào

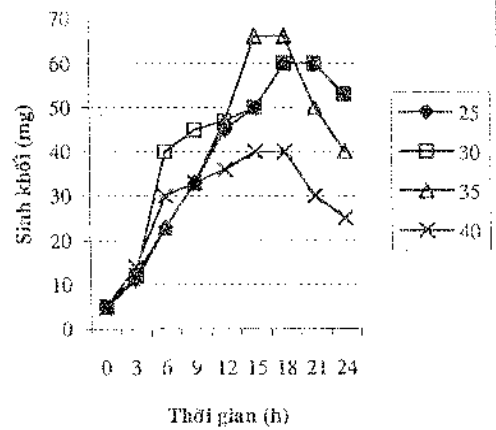
3.3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nuôi nấm men trong ống nghiệm trên môi trường cao nấm men ở các nhiệt độ: 25^oC, 30^oC, 35^oC, 40^oC và khảo sát từng mốc nhiệt độ tại các thời điểm 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 giờ với lượng giống đưa vào ban đầu bằng nhau (0,3 triệu tb/ml). Sau đó thu sinh khối bằng cách li tâm với tốc độ 4000 vòng/phút và cân sinh khối bằng cân phân tích với độ chính xác 0,1mg tại các thời điểm trên.

Kết quả được ghi nhận ở bảng 5 và đồ thị 2.

Bảng 5: Ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng tạo sinh khối nấm men.

| Thời gian (h) | Sinh khối tế bào tại các nhiệt độ khác nhau (mg) | | | |
|---------------|--|------|------|------|
| | 25°C | 30°C | 35°C | 40°C |
| 0 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 3 | 11 | 12 | 12 | 14 |
| 6 | 23 | 40 | 23 | 30 |
| 9 | 33 | 45 | 33 | 33 |
| 12 | 45 | 47 | 47 | 36 |
| 15 | 50 | 50 | 66 | 40 |
| 18 | 60 | 60 | 66 | 40 |
| 21 | 60 | 60 | 50 | 30 |
| 24 | 53 | 53 | 40 | 25 |



Đồ thị 2: Đồ thị biểu diễn sự ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự tạo sinh khối nấm men

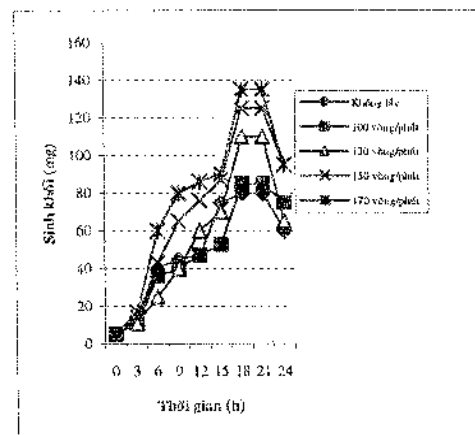
Vậy nhiệt độ 35°C là nhiệt độ tối ưu cho sự sinh trưởng–phát triển của nấm men và là nhiệt độ tối ưu thu sinh khối nên chúng tôi quyết định chọn nhiệt độ 35°C để khảo sát sự ảnh hưởng của những điều kiện tiếp theo.

3.3.2. Ảnh hưởng của cường độ thông khí

Nuôi nấm men trong môi trường cao nấm men ở nhiệt độ 35°C với các chế độ: không lắc, lắc 100 vòng/phút, 130 vòng/phút, 150 vòng/ phút, 170 vòng/phút với lượng giống ban đầu đưa vào bằng nhau 0,3 triệu tb/ml. Khảo sát ở các thời điểm 0 giờ, 3 giờ, 6 giờ, 9 giờ, 12 giờ, 15 giờ, 18 giờ, 21 giờ, 24 giờ. Kết quả được ghi nhận ở bảng 6 và đồ thị 3.

Bảng 6: Ảnh hưởng của cường độ thông khí lên khả năng tạo sinh khối của tế bào

| Thời gian (h) | Sinh khối tế bào tại các chế độ thông khí khác nhau (mg). | | | | |
|---------------|---|----------|----------|----------|----------|
| | Không lắc | 100 vòng | 130 vòng | 150 vòng | 170 vòng |
| 0 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 3 | 13 | 11 | 11 | 14 | 17 |
| 6 | 40 | 36 | 25 | 43 | 60 |
| 9 | 45 | 40 | 40 | 65 | 80 |
| 12 | 47 | 47 | 60 | 76 | 86 |
| 15 | 75 | 53 | 70 | 87 | 90 |
| 18 | 80 | 85 | 110 | 125 | 135 |
| 21 | 80 | 85 | 110 | 125 | 135 |
| 24 | 60 | 75 | 65 | 95 | 95 |

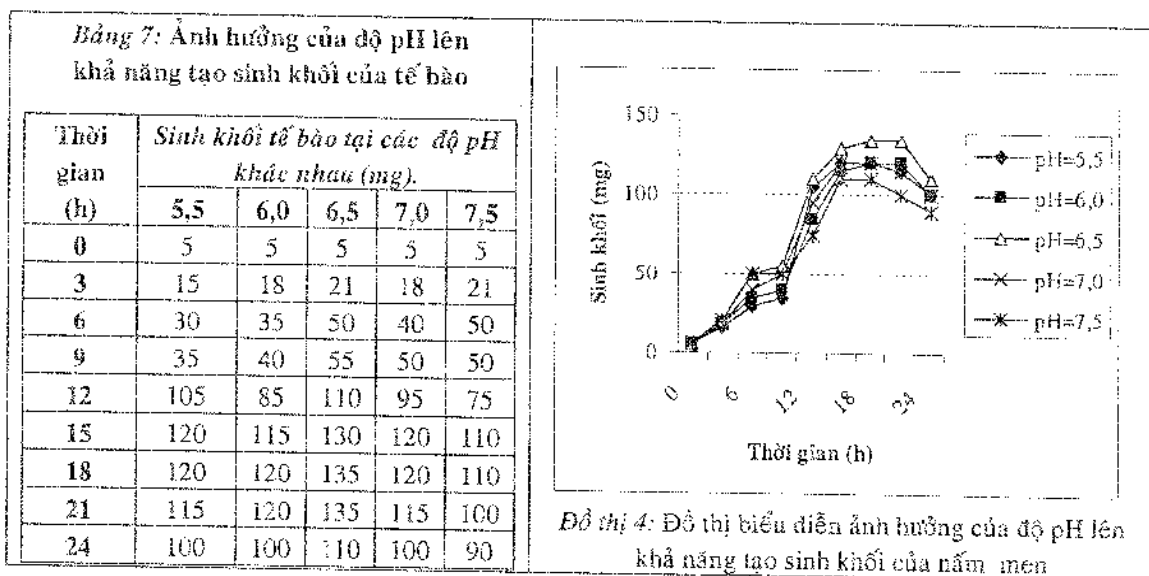


Đồ thị 3: Ảnh hưởng của cường độ thông khí lên sự tạo sinh khối nấm men

Vậy có thể thu sinh khối tế bào nấm men trong điều kiện nuôi cấy trên máy lắc với tốc độ 170 vòng/phút là tối ưu so với các chế độ lắc mà chúng tôi khảo sát.

3.3.3. Ảnh hưởng của độ pH

Nuôi nấm men ở các pH = 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 và đưa vào nhiệt độ 35°C, lắc 170 vòng/phút, lượng giống ban đầu đưa vào bằng nhau (0,3 triệu tế bào/ml). Khảo sát tại các thời điểm 0 giờ, 3 giờ, 6 giờ, 9 giờ, 12 giờ, 15 giờ, 18 giờ, 21 giờ, 24 giờ. Kết quả được ghi nhận ở bảng 7 và đồ thị 4.



Nhận xét: Trong các độ pH trên sinh khối tế bào cao nhất ở chế độ pH=6,5 vào thời điểm 18 giờ đạt 135 mg, ở các chế độ pH còn lại lượng sinh khối tế bào đều cho ít hơn. Vậy pH tối ưu cho chủng nấm men *Saccharomyces* sp.02 sinh trưởng và phát triển 6,5.

• Vậy điều kiện tối ưu cho sự sinh trưởng và phát triển của chủng *Saccharomyces* sp.02 là:

- Môi trường cao nấm men.
- Thời gian thu sinh khối tốt nhất vào thời điểm 18 giờ. Nhiệt độ nuôi cấy 35°C.
- Chế độ thông khí lắc 170 vòng/phút.
- PH ban đầu = 6,5.

3.4. Khả năng đề kháng các kháng sinh của chủng Saccharomyces sp.02

Cấy trái chủng nấm men *Saccharomyces* sp.02 trên môi trường Hansen agar rồi đặt các đĩa giấy có tẩm chất kháng sinh lên mặt thạch (3 đĩa/đĩa petri) và các chất kháng sinh được chọn là các kháng sinh đường ruột. Theo dõi sự tạo thành vòng vô khuẩn sau 24 giờ.

Kết quả cho thấy chủng nấm men *Saccharomyces* sp.02 có khả năng đề kháng rất mạnh với 8 chất kháng sinh trị bệnh đường ruột sau: *neomycin*, *acid nalidixic*, *kanamycin*, *gentamycin*, *ampicillin*, *cloramphenicol*, *noefloxacin*,

Bảng 8: Khả năng đề kháng với các chất kháng sinh của chủng Saccharomyces sp.02

| Tên kháng sinh | Nồng độ | Kết quả |
|-----------------------|-----------|---------|
| <i>Neomycin</i> | 30 µg/đĩa | + |
| <i>Axit nalidixic</i> | 30 µg/đĩa | + |
| <i>Kanamycin</i> | 30 µg/đĩa | + |
| <i>Gentamycin</i> | 30 µg/đĩa | + |
| <i>Ampicillin</i> | 10 µg/đĩa | + |
| <i>Cloramphenicol</i> | 30 µg/đĩa | + |
| <i>Noefloxacin</i> | 5 µg/đĩa | + |
| <i>Tetracylin</i> | 30 µg/đĩa | + |

+ Đề kháng rất mạnh.

Như vậy, trong quá trình điều trị, có thể sử dụng các kháng sinh trên mà không sợ chủng nấm men *Saccharomyces* sp.02 bị mất hoạt tính. Kết quả này trùng với kết quả nghiên cứu của Phạm Thúy Hồng, Nguyễn Thị Ngọc Anh, Nguyễn Thanh Thủy, Đinh Duy Kháng, 1998.

3.5. Bảo quản nấm men bằng phương pháp đông khô

Tiến hành bảo quản chủng nấm men trên bằng phương pháp đông khô: giống nấm men đã chuẩn bị vào làm đông ở nhiệt độ - 20⁰C, trong khoảng 5 phút, tiếp theo đưa nấm men vào làm khô trong thiết bị đông khô ở áp suất cao sau 20 giờ.

Kết quả bước đầu khảo sát khả năng sống sót của chủng giống sau đông khô: trước và sau đông khô cấy trái trên các đĩa petri sau đó đếm khuẩn lạc rồi tính số lượng tế bào có trong 1g mẫu. Kết quả như sau:

- Trước đông khô: 74 x 10⁷ tế bào/ml
- Sau đông khô: 71,8 x 10⁷ tế bào/ml.
- Tỷ lệ sống sót: 97,02%.

4. Kết luận và đề nghị

4.1. Kết luận

- Các đặc điểm hình thái, sinh lí, sinh hoá của chủng nấm men *Saccharomyces*. sp.02 phù hợp với các đặc điểm của chi *Saccharomyces* theo khoá

phân loại của Lodder (1971). Do vậy, có thể kết luận chủng nấm men trên thuộc chi *Saccharomyces*.

- Đã xác định các điều kiện tối ưu cho quá trình thu sinh khối của chủng này là:

- Môi trường cao nấm men.
- Nhiệt độ nuôi cấy 35°C.
- Thời gian thu sinh khối tốt nhất vào thời điểm 18 giờ.
- pH ban đầu = 6,5.
- Chế độ thông khí: 170 vòng/phút.

• Chủng nấm men *Saccharomyces* sp.02 có khả năng đề kháng rất mạnh (hoàn toàn không mẫn cảm) với 8 loại kháng sinh đường ruột sau: *Neomycin*, *Axit Nalidixic*, *Kanamycin*, *Gentamycin*, *Ampicillin*, *Cloramphenicol*, *Noefloxacin*, *Tetracylin*. Đây là một trong những tính chất rất quan trọng của một chủng *probiotic*. Trong quá trình điều trị, sự có mặt của các chất kháng sinh sẽ không làm ảnh hưởng đến hoạt tính cũng như sự tồn tại của chủng nấm men này trong đường ruột.

• Đã bảo quản chủng nấm men *Saccharomyces* sp.02 bằng phương pháp đông khô. Kết quả bước đầu khảo sát khả năng sống sót của chủng này sau khi đông khô là 97,02%.

Tuy nhiên để có thêm cơ sở để sử dụng chủng này trong việc chế tạo một chế phẩm *probiotic* cần tiếp tục nghiên cứu và thông báo trong công trình tiếp theo:

- Phân loại chủng *Sacharomyces* sp.02 đến loài.
- Sự hình thành một loại *protein ngoại bào* có khả năng phân giải độc tố một số vi khuẩn gram dương của chủng này.
- Khả năng sống sót của chủng *Saccharomyces* sp.02 sau thời gian và điều kiện nhiệt độ bảo quản khác nhau.

Abstract:

Studying some biological characteristics of strain *Saccharomyces* sp. 02

Saccharomyces sp.02 is resistant to antibiotic, such as Kanamycine, Neomycine, Gentamycine, Nalidixic axit, ampiciline, Cloramphenicol, Neofloxacine, Tetraciline. Therefore, the activities of this strain are affected by these antibiotic. In conclusion, *Saccharomyces* sp.02 can be supplemented in *probiotic* production for prevention and treatment of intestinal diseases in swine.