

KHẢO SÁT ĐẶC ĐIỂM MỘT SỐ CHỦNG NẤM SỢI CÓ KHÁNG SINH CHỐNG SINH VẬT GÂY HẠI

Trần Thị Minh Định^{*}, Trần Thanh Thủy[†]

1. Mở đầu

Nấm sợi là đối tượng hấp dẫn cho các nghiên cứu cơ bản và đa dạng sinh học, là nhóm vi sinh vật (VSV) giàu tiềm năng sản sinh các chất có hoạt tính sinh học quý, trong đó có chất kháng sinh (CKS).

Từ lâu, các CKS có nguồn gốc từ nấm sợi đã được con người biết đến và ứng dụng có hiệu quả trong trị bệnh cho người, vật nuôi, cây trồng. Tuy nhiên, việc sử dụng các CKS không hợp lý cùng với sự xuất hiện các bệnh nan y mới khiến cho nhiều CKS không còn tác dụng chữa bệnh. Việc tìm kiếm các CKS mới trở thành một nhiệm vụ cấp thiết hiện nay.

Hơn nữa, để giảm thiểu các chất hoá học trong nông nghiệp, con người tăng cường sử dụng các chế phẩm sinh học trong công tác phòng trừ dịch bệnh cho cây. Nấm sợi sinh CKS là đối tượng không thể thiếu trong các chế phẩm này.

Ở Việt Nam các công trình nghiên cứu về nấm sợi rừng ngập mặn sinh CKS còn ít ỏi.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu

- Ba chủng nấm sợi phân lập từ rừng ngập mặn có hoạt tính kháng sinh (kí hiệu là M1, M2, M3) trong bộ sưu tập giống của PTN Vi sinh-Sinh hoá Trường ĐHSP Tp.HCM.
- Các VSV kiểm định gồm :

^{*} CN, Khoa Sinh học, Trường ĐHSP Tp.HCM

[†] TS, Khoa Sinh học, Trường ĐHSP Tp.HCM.

- + *Bacillus subtilis*, *Salmonella*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* nhận từ bộ sưu tập giống của PTN Vi sinh-Sinh hoá.
- + *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* nhận từ Viện Pasteur.
- + *E.coli* kháng thuốc nhận từ Bệnh viện Bình Dân.
- + Môi trường nuôi cấy, giữ giống nấm sợi RNM là môi trường Yeast Extract Agar (YEA), môi trường phân loại nấm sợi là Malt Yeast Extact Agar (MEA), môi trường tách chiết CKS là YEA, môi trường xộp thu bào tử các chủng nấm sợi gồm 60% cám, 30% bột đậu nành, 10% bột ngô.
- + Ấu trùng tằm tuổi ba nhận từ Công ti Dâu tằm tơ, Lâm Đồng.
- + Sâu tơ hại rau cải nhận từ Công ti Vipesco, Tp.HCM.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

- Khảo sát khả năng sinh kháng sinh bằng phương pháp khối thạch (Egorov N.X, 1983), phương pháp đục lỗ và khoan giấy lọc (Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự, 1978).
- Tách chiết CKS bằng dung môi và dịch lên men.
- Xác định một số tính chất lí hoá của dịch KS thô (Egorov N.X., 1983).
- Nghiên cứu các đặc điểm sinh học và phân loại nấm sợi (Bùi Xuân Đồng 1986, 2000; R. Samson và cộng sự, 2004).
- Khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào bằng cách đo kích thước vòng phân giải (Stephen, 2000).
- Khảo sát khả năng diệt côn trùng của nấm sợi (T.K.Chinh, 1996).

3. Kết quả và biện luận

3.1 Khảo sát đặc điểm sinh kháng sinh của ba chủng nấm sợi

3.1.1. Hoạt tính kháng sinh của ba chủng nấm sợi

Chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng sinh CKS của ba chủng nấm sợi với các VSV kiểm định như đã trình bày ở phần 2.1. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.1 và Bảng 3.2.

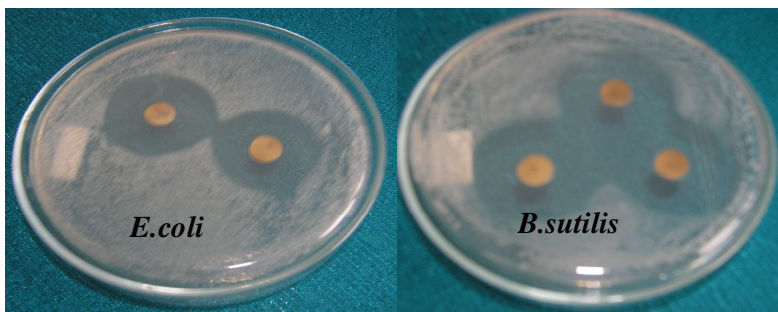
Bảng 3.1. Khả năng kháng nấm gây bệnh của ba chủng nấm sợi

Các chủng nấm kiểm định	Khả năng gây bệnh	Hoạt tính kháng sinh (D-d, cm)		
		M1	M2	M3
<i>Aspergillus niger</i>	Bệnh thối cổ rễ ở các cây họ đậu	-	+++	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	Bệnh héo vàng ở nhiều cây trồng cạn	+	+++	++

Ghi chú : - : không kháng, + : kháng yếu, ++ : kháng khá mạnh, +++ : kháng mạnh.

Bảng 3.2. Khả năng kháng VSV gây bệnh của 3 chủng nấm sợi

Các chủng VSV kiểm định	Khả năng gây bệnh	Hoạt tính kháng sinh (D-d, cm)		
		M1	M2	M3
<i>Escherichia coli</i>	Tiêu chảy	0	1,6	2,4
<i>E.coli kháng thuốc</i>	nt	0	0,7	1,8
<i>Bacillus subtilis</i>	Vi khuẩn cơ hội gây bệnh ở đường ruột	1,7	1	2,5
<i>Salmonella</i>	Thương hàn và ngộ độc thực phẩm	1,3	1,3	2,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Viêm phế quản, viêm tai giữa,..	0	0	0
<i>Candida albicans</i>	Các bệnh đường sinh dục	0	1,2	0



3.1.2. Tách chiết CKS

Nhằm lựa chọn phương pháp thu CKS tối ưu, chúng tôi tiến hành tách chiết CKS từ khối thạch bằng các dung môi khác nhau và dịch lên men, kết quả được trình bày trong bảng 3.3.

Bảng 3.3. Hoạt tính CKS 3 chủng nấm sợi khi tách chiết bằng các phương pháp khác nhau

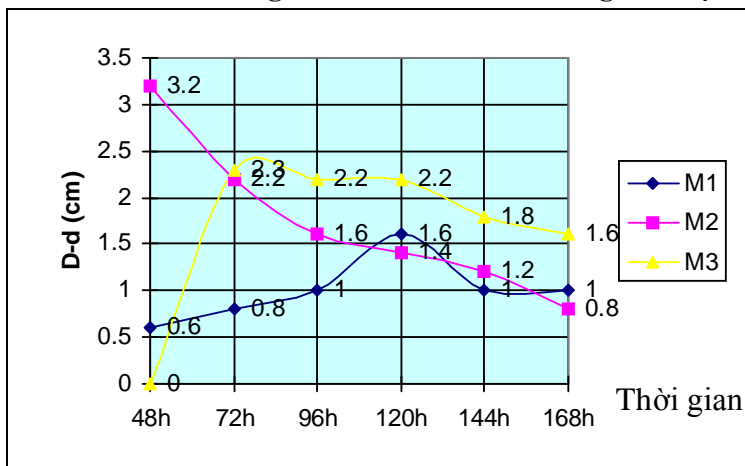
Dung môi	Hoạt tính kháng sinh (D-d, cm)		
	M1	M2	M3
Acetone	1,3	1	2,4
Butanol	0,35	1	1,3
Cồn tuyệt đối	0,8	2,2	1,7
Ethyl acetat	1	0,3	1,9
Nước 80 ⁰ C	0	0,1	0
Dịch lên men	1,6	3,2	2,3

Như vậy, phương pháp thu nhận CKS tốt nhất là thu nhận từ dịch lên men.

3.1.3. Xác định thời gian sinh tổng hợp CKS nhiều nhất

Nhằm xác định thời gian thu nhiều CKS nhất, chúng tôi tiến hành xác định thời gian sinh tổng hợp CKS nhiều nhất của ba chủng nấm sợi, kết quả được thể hiện ở Biểu đồ 3.1.

Biểu đồ 3.1. Thời gian sinh CKS của 3 chủng nấm sợi



Thời gian sinh CKS nhiều nhất của chủng M1 là 120h, chủng M2 là 48h, chủng M3 là 72h-120h.

3.1.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính và độ bền CKS

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính và độ bền kháng sinh của 3 chủng nấm sợi

Chủng	Nhiệt độ / Thời gian (phút)	30°C	40°C	60°C	80°C	100°C
		Hoạt tính kháng sinh (D-d, cm)				
M1	10	1,6	1,7	1,85	1,7	1,4
	20	1,6	1,8	2	1,6	1,7
	40	1,6	1,7	1,7	1,6	1,2
	60	1,6	1,7	1,7	1,45	1,1
M2	10	3,2	3,2	3,1	3,1	2,55
	20	3,15	3,6	3	2,75	2,55
	40	3,2	3,45	2,45	2,7	2,2
	60	3,1	3,2	2,25	1,65	1,1
M3	10	2,3	2,2	2,25	2,15	2,2
	20	2,25	2,3	2,2	2,25	2,1
	40	2,3	2,2	2,2	2,2	2,1
	60	2,3	2,2	2,2	2,15	2,25

Kết quả cho thấy : nhiệt độ thích hợp cho hoạt tính kháng sinh mạnh nhất của chủng M1 là 60°C, chủng M2 là 40°C, chủng M3 là 30°C.

CKS của chủng M1 và M2 có độ bền ở 100⁰C trong 40 phút, CKS của chủng M3 chịu được tất cả các nhiệt độ và thời gian khảo sát. Có thể xem đây là một tính chất đặc biệt của CKS có từ chủng này nhờ độ bền của CKS trong nhiều điều kiện nhiệt độ và thời gian khác nhau.

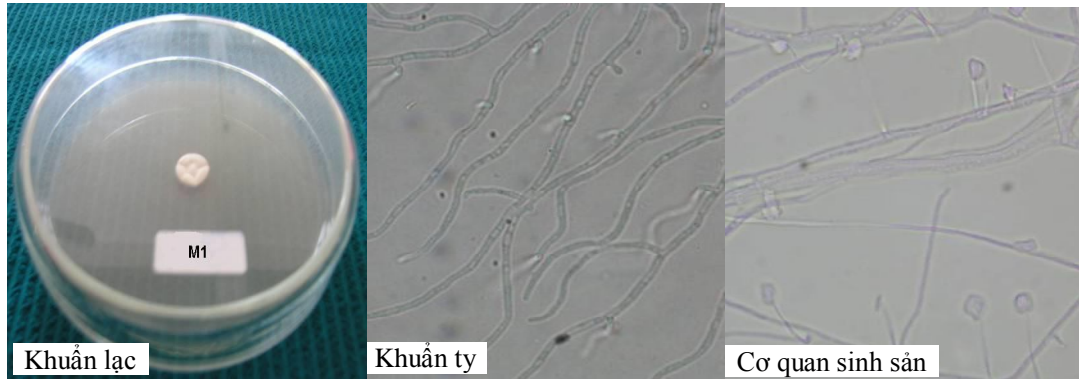
3.2 Đặc điểm sinh học và phân loại 3 chủng nấm sợi

3.2.1. Phân loại 3 chủng nấm sợi

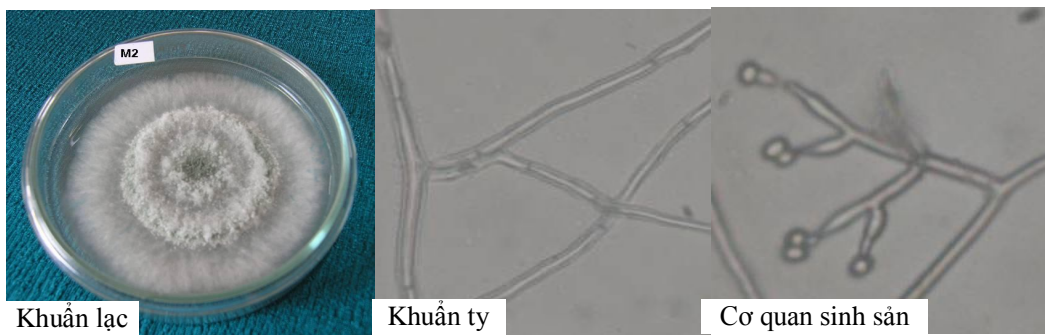
Bảng 3.5. Đặc điểm phân loại 3 chủng nấm sợi nghiên cứu.

Đặc điểm các chủng nấm sợi nghiên cứu		Đặc điểm phân loại các taxon tương ứng theo Bùi Xuân Đồng (1986, 2000), A.Samson (2004)	
M1	<ul style="list-style-type: none"> - KL màu vàng nhạt. - Cuống sinh bào tử không phân nhánh. - Bào tử có nhiều hình dạng. 	<i>Acremonium</i>	<ul style="list-style-type: none"> - KL màu trắng, hồng nhạt hoặc da cam nhạt. - Cuống sinh bào tử phân nhánh ít hoặc không phân nhánh. - Bào tử nhiều hình dạng.
M2	<ul style="list-style-type: none"> - KL tròn, từ màu trắng → xanh lục, phát triển nhanh. - Khuẩn ty không màu. - Cuống sinh BT ngắn phân nhánh nhiều lần. Các bào tử trần tập trung thành một chùm nhỏ. - BT hình ellip. 	<i>Trichoderma</i>	<ul style="list-style-type: none"> - KL có màu trắng hoặc từ trắng đến lục, phát triển nhanh. - Khuẩn ty không màu. - Cuống sinh BT phân nhánh nhiều, các BT trần liên kết → một chùm nhỏ. - BT hình ellip, hình cầu hoặc hình thuôn.
M3	<ul style="list-style-type: none"> - KL tròn, màu trắng → màu xám, mặt trái KL màu vàng nâu. - Khuẩn ty phân nhánh. - Cuống sinh BT không phân nhánh hoặc phân nhánh không đều, có hai loại thể bình : hình chai và hình trụ. <ul style="list-style-type: none"> - Có hai loại BT : <ul style="list-style-type: none"> + BT lớn mọc đơn độc, hình cầu. + BT nhỏ mọc thành chuỗi dài, hình ellip, hình quả chanh. 	<i>Botryotrichum piluliferum</i>	<ul style="list-style-type: none"> - KL màu trắng → màu xám, đôi chỗ có xám lục, lục, mặt trái KL màu vàng nâu. - Khuẩn ty phân nhánh. - Cuống sinh BT ngắn, phân nhánh không đều, một hoặc hai lần với các nhánh và nhánh phụ ngắn hơn. <ul style="list-style-type: none"> - Có hai loại BT : <ul style="list-style-type: none"> + BT lớn đơn độc, hình cầu, gần cầu. + BT nhỏ thành chuỗi, hình trứng.

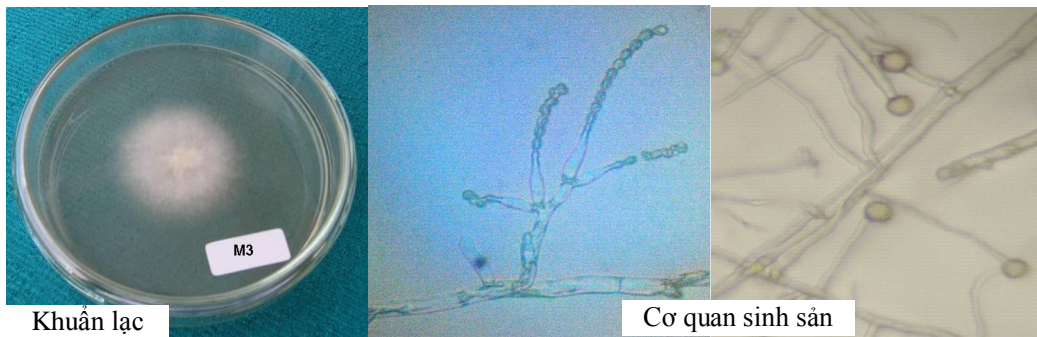
Từ những đặc điểm trên và dựa vào mô tả của Bùi Xuân Đồng (1986, 2000), R.Samson và cộng sự (2004), chúng tôi kết luận : chủng M1 thuộc chi *Acremonium*, chủng M2 thuộc chi *Trichoderma*, chủng M3 là loài *Botryotrichum piluliferum* Sacc & March.



Hình 3.3. Đặc điểm phân loại chủng M1



Hình 3.4. Đặc điểm phân loại chủng M2



Hình 3.5. Đặc điểm phân loại chủng M3

3.2.2. Các đặc điểm sinh học của ba chủng nấm sợi

Bảng 3.6. Các đặc điểm sinh lí, sinh hóa của ba chủng nấm sợi

Các đặc điểm		Đường kính khuẩn lạc (mm)		
		M1	M2	M3
Khả năng chịu nhiệt	20 ⁰ C	2	12	4,2
	25 ⁰ C	2,5	17,7	10
	30 ⁰ C	5,3	28,7	14,5
	35 ⁰ C	1,5	23,7	0
	40 ⁰ C	0	0	0
Khả năng chịu mặn	0%	8,7	44,3	21,5
	1%	5,2	36,2	15
	2,5%	5,3	28,7	14,5
	3%	4	22,2	2,8
	4%	3,8	12	0
	5%	3,5	9,3	0
Khả năng đồng hoá nguồn carbon	Glucose	5,7	23	14,5
	Maltose	7,8	18	5,5
	Sucrose	6,2	14	6
	Tinh bột	8,3	17,2	4,5
	Lactose	7	17	3
	Galactose	6	4,6	6,5
	CMC	5,2	10	7
Khả năng đồng hoá nguồn nitơ	Bột đậu	4,8	68,2	23,2
	Cao thịt	5,5	60	24,5
	NaNO ₃	4,3	32,2	10,5
	NH ₄ Cl	5,0	64,2	25
	NH ₄ NO ₃	5,1	65,2	19,7
	(NH ₄) ₂ SO ₄	4,9	49	17
	NaNO ₂	4,2	29,1	3

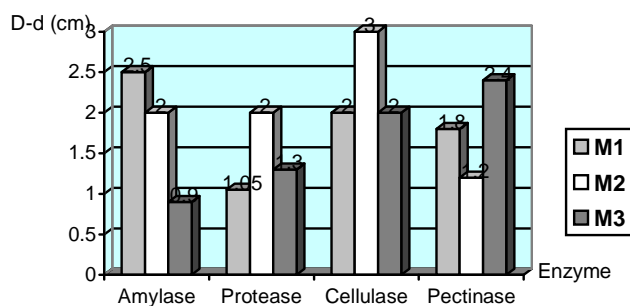
Qua Bảng 3.6 chúng tôi thấy :

- Cả ba chủng nấm sợi đều sinh trưởng tốt nhất ở 30⁰C, độ mặn 0%, đều đồng hoá được tất cả nguồn cacbon, nguồn nitơ khảo sát.

- Nguồn carbon tốt nhất cho sinh trưởng với chủng M1 là tinh bột, với chủng M2 và M3 là glucose.
- Nguồn nitơ tốt nhất cho sinh trưởng của chủng M1 là cao thịt, chủng M2 là bột đậu, chủng M3 là NH₄Cl.

3.2.3. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của ba chủng nấm sợi

Biểu đồ 3.2. Hoạt tính enzyme của ba chủng nấm sợi



Qua Biểu đồ 3.2 chúng tôi thấy :

- Ba chủng nấm sợi có khả năng sinh cả 4 loại enzyme amylase, protease, cellulase, pectinase.
- Chủng M1 sinh enzyme amylase mạnh nhất.
- Chủng M2 sinh enzyme protease và cellulase mạnh nhất.
- Chủng M3 sinh enzyme pectinase mạnh nhất.

3.2.4. Khả năng phân giải dầu của 3 chủng nấm sợi

Cả ba chủng nấm sợi đều có khả năng phân giải dầu, trong đó chủng M1 có khả năng phân giải dầu mạnh nhất, chủng M2 và M3 phân giải dầu yếu.



Hình 3.6. Khả năng phân giải dầu của ba chủng nấm sợi

3.3 Bước đầu tìm hiểu tác dụng của DKS và BT các chủng nấm sợi đối với tằm và sâu tơ

Nhằm tìm ra hướng ứng dụng cho ba chủng nấm sợi nghiên cứu, chúng tôi tiến hành khảo sát tác dụng của BT và DKS của chúng trên sâu tơ và tằm, kết quả được trình bày trong Bảng 3.7 và Bảng 3.8.

Bảng 3.7. Khả năng diệt tằm của 3 chủng nấm sợi

Chủng		Tỉ lệ tằm chết (%)	Thời điểm (ngày)	Mức độ diệt tằm
M1	DKS	100	11	Mạnh
	BT	76,7	15	Mạnh
M2	DKS	83,3	15	Mạnh
	BT	23,3	15	Yếu
M3	DKS	76,7	15	Mạnh
	BT	60	15	Khá mạnh

Bảng 3.8. Khả năng diệt sâu tơ của ba chủng nấm sợi

Chủng		Tỉ lệ sâu chết (%)	Thời gian (ngày)	Mức độ diệt sâu tơ
M1	DKS	50	10	Khá mạnh
	BT	20	10	Yếu

M2	DKS	34,6	10	Yếu
	BT	54,2	10	Khá mạnh
M3	DKS	66,7	10	Khá mạnh
	BT	34,4	10	Yếu

Qua Bảng 3.7 chúng tôi thấy :

- Bào tử và dịch kháng sinh của ba chủng nấm sợi đều có khả năng diệt tằm.
- DKS và BT chủng M1, DKS chủng M2, DKS chủng M3 có khả năng diệt tằm mạnh, mạnh nhất là DKS chủng M1.
- BT và DKS của ba chủng nấm sợi đều có khả năng diệt sâu tơ.
- DKS chủng M1, BT chủng M2, DKS chủng M3 diệt sâu tơ khá mạnh, mạnh nhất là DKS chủng M3.

4. Kết luận

- *Kết quả khảo sát hoạt tính kháng sinh của ba chủng nấm sợi RNM cho thấy :*
 - + Chủng M3 kháng khuẩn mạnh nhất. Chủng M2 kháng nấm mạnh nhất đồng thời có phổ tác dụng rộng nhất.
 - + Đã xác định được phương pháp thu nhận CKS từ dịch lên men là tối ưu.
 - + Đã xác định thời gian sinh kháng nhiều nhất của M1 là 120h, M2 là 48h, M3 : 72-120h.
 - + Đã xác định được độ bền nhiệt của CKS của ba chủng nấm sợi : M1 và M2-100⁰C/40 phút, M3-30-100⁰C/60 phút.
- *Đã định danh*
 - + Chủng M1 thuộc chi *Acremonium*.
 - + Chủng M2 thuộc chi *Trichoderma*.
 - + Chủng M3 là loài *Botryotrichum piluliferum Sacc & March*.

- + Trên cơ sở đó chúng tôi đã xác định được các đặc tính sinh học khác như khả năng sinh enzym ngoại bào, phân giải dầu, chịu nhiệt, chịu mặn, đồng hoá nguồn carbon, nitơ của ba chủng nấm sợi.
- *Bước đầu thử nghiệm DKS và BT của ba chủng nấm sợi trên sâu tơ và tằm cho thấy: DKS chủng M1 có tác dụng trên tằm mạnh nhất, DKS chủng M3 có tác dụng trên sâu tơ mạnh nhất.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyễn Văn Cách (2004), *Công nghệ lên men các chất kháng sinh*, NXB Khoa học và kỹ thuật, 144 tr.
- [2]. Nguyễn Lâm Dũng, Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thanh Hiền (1978), *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật*, NXB Khoa học và kỹ thuật, tr.160-235.
- [3]. Bùi Xuân Đồng (2000), *Vi nấm dùng trong công nghệ sinh học*, NXB Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, 201tr.
- [4]. Bùi Xuân Đồng (1986), *Nhóm nấm Hyphomycetes ở Việt Nam*, tập 1-2, NXB Khoa học và kỹ thuật.
- [5]. Nguyễn Vĩnh Hà (2002), *Khảo sát hoạt tính đối kháng của các chủng nấm sợi phân lập từ rừng ngập mặn khu vực Giao Thủy, Nam Định và Thái Thụy, Thái Bình*, Luận văn thạc sĩ khoa học, ĐHSPTP Hà Nội.
- [6]. Robert A.Samson, Ellen S.Hoekstra, Jens C.Frisvad (2004), *Introduction to food- and airborne fungi*, Centraalbureau voor Schimmelcultures_Utrecht, 389pp.

Tóm tắt

Khảo sát đặc điểm một số chủng nấm sợi có kháng sinh chống sinh vật gây hại

Ba chủng nấm sợi nghiên cứu có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm, hoạt phổ rộng, đặc biệt là khả năng kháng các vi khuẩn gây bệnh đã kháng nhiều loại kháng sinh. Đã xác định được các đặc điểm của chất kháng sinh và các đặc điểm sinh học, phân loại đến loài ba chủng nấm trên. Bước đầu thử nghiệm tác dụng của chất kháng sinh và bào tử nấm sợi trên ấu trùng tằm và sâu tơ hại rau cải cho kết quả tốt.

Abstract

Surveying characteristics some of strains filamentous fungi with antibiotic against organisms causing diseases

Our three filamentous fungi strains have ability to produce antibiotic. They are effective against bacteria, mold, especially, bacteria which are resistant to many kinds of antibiotic. The suitable method and time to get the antibiotic were determined. We also determined identical and biological characteristics of the fungi. Both spores and antibiotic of the filamentous fungi can kill silkworm and diamondback moth.